



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LORENA DE JAGER

**ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO E DO SISTEMA  
RENINA-ANGIOTENSINA NAS DISFUNÇÕES  
CARDIOVASCULARES DECORRENTES DO  
PARKINSONISMO POR 6-HIDROXIDOPAMINA EM RATOS**

---

Londrina  
2022

LORENA DE JAGER

**ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO E DO SISTEMA  
RENINA-ANGIOTENSINA NAS DISFUNÇÕES  
CARDIOVASCULARES DECORRENTES DO  
PARKINSONISMO POR 6-HIDROXIDOPAMINA EM RATOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia (Instituição Associada Universidade Estadual de Londrina), como requisito à obtenção do título de doutora.

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marli Cardoso Martins-Pinge

Co-orientador: Prof. Dr. Phileno Pingue Filho

Londrina  
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

J24e Jager, Lorena de.  
Envolvimento do óxido nítrico e do sistema renina-angiotensina nas disfunções cardiovasculares decorrentes do parkinsonismo por 6-hidroxidopamina em ratos / Lorena de Jager. - Londrina, 2022.  
119 f. : il.

Orientador: Marli Cardoso Martins-Pinge.  
Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2022.  
Inclui bibliografia.

1. Doença de Parkinson - Tese. 2. alterações cardiovasculares - Tese. 3. reatividade vascular - Tese. 4. óxido nítrico sintase - Tese. I. Martins-Pinge, Marli Cardoso. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

CDU 574

LORENA DE JAGER

**ENVOLVIMENTO DO ÓXIDO NÍTRICO E DO SISTEMA  
RENINA-ANGIOTENSINA NAS DISFUNÇÕES  
CARDIOVASCULARES DECORRENTES DO  
PARKINSONISMO POR 6-HIDROXIDOPAMINA EM RATOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia (Instituição Associada Universidade Estadual de Londrina), como requisito à obtenção do título de doutora.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Angeliza Zanesco  
Universidade Metropolitana de Santos -  
UNIMES

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Cristina Antoniali Silva  
Universidade Estadual Paulista - UNESP

---

Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup>. Ernane Torres Uchoa  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup>. Fernando Augusto Lavezzo Dias  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Londrina, 30 de agosto de 2022.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marli Carodoso Martins Pinge, pela oportunidade, incentivo e apoio durante todos esses anos, além de todo o ensinamento compartilhado.

Aos meus pais, irmãos e ao Vitor, pela dedicação e incentivo à minha formação profissional e pessoal.

Ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação Ciências Fisiológicas pela oportunidade de aprendizado e de realização dos meus experimentos.

A todos os professores e colegas de departamento, que de forma direta ou indireta, contribuíram com a minha formação e com a realização deste trabalho.

Às minhas amigas Amanda, Ana Elisa, Ana Paula, Mariana, Marina e Stephanie, pela amizade e companheirismo desde a graduação até a pós graduação.

Aos professores convidados para banca, obrigada pela presença e contribuições.

Aos professores colaboradores desta tese que me auxiliaram com as metodologias complementares: Prof. Dr. Waldiceu Verri e suas alunas Fernanda Rasquel e Mariana Bertozzi pela dosagem de estresse oxidativo; Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Graziela e sua aluna Camila Vidigal pelos experimentos de reatividade vascular; ao professor Carlos Cesar Crestani e aos técnicos pela colaboração nas dosagens de dopamina.

Aos colegas do laboratório, pela amizade, colaborações e auxílio durante a realização deste trabalho. Em especial a Blendinha e Gabi, que foram essências e companheiras no dia-a-dia do Lab. As IC's do Lab, Lorena e Pamela que me auxiliaram na execução dos experimentos.

Aos técnicos e demais servidores do departamento e da UEL.

Ao apoio financeiro: Capes.

JAGER, Lorena de. **Envolvimento do óxido nítrico e do sistema renina-angiotensina nas disfunções cardiovasculares decorrentes do parkinsonismo por 6-hidroxidopamina em ratos.** 2022. 119 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Ciências Fisiológicas. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

## RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum. Atualmente tem-se dado ênfase aos sintomas não-motores, mais especificamente no sistema cardiovascular: hipotensão postural, hipotensão pós-prandial, labilidade da pressão arterial, e, possivelmente, fadiga e intolerância ao exercício; devido ao seu comprometimento na qualidade de vida dos pacientes. Vários estudos têm mostrado o envolvimento do óxido nítrico (NO) nos processos que levam à neurodegeneração na DP, e o uso de inibidores da isoforma induzível da NO-sintase (iNOS) promove neuroproteção e atenua a queda de dopamina (DA) em modelos experimentais de parkinsonismo. Além disso, o NO também parece estar envolvido nas alterações cardiovasculares no parkinsonismo induzido por 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Do mesmo modo, estudos mostram que o aumento de angiotensina II (Ang II) pode levar ao aumento do estresse oxidativo, exacerbando o processo neurodegenerativo da DP e que o uso de inibidores da Ang II ou enzima conversora de angiotensina (ECA) se mostrou efetivo na proteção contra a redução dopaminérgica. Sendo assim, o objetivo foi avaliar os efeitos da inibição da iNOS e da Ang II na função cardiovascular e autonômica em animais submetidos ao parkinsonismo por 6-OHDA na substância negra pars compacta (SNpc), assim como esclarecer os mecanismos envolvidos na hiporreatividade à fenilefrina em anéis com endotélio nesses animais. Para isso, o estudo foi dividido em duas partes. No estudo 1: os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para microinfusão bilateral da neurotoxina 6-OHDA (6 mg/mL em 0,2% de ácido ascórbico em solução salina estéril) ou solução veículo para o grupo Sham. Do dia da estereotaxia até o dia da cateterização da artéria femoral, os animais receberam tratamento com inibidor da iNOS – S-methylisothiourrea (SMT - 10 mg/kg – ip) ou solução salina (0,9% - ip). Os animais foram divididos em 4 grupos: Sham + veículo; Sham + tratamento; 6-OHDA + veículo e 6-OHDA + tratamento. Após 6 dias, foram submetidos a cateterização da artéria femoral e, 24h depois, o registro dos parâmetros basais cardiovasculares foi realizado. Em outro grupo de animais, o efeito da injeção endovenosa para o inibidor da iNOS – S-methylisothiourrea - SMT (3 mg/kg – ip) durante os parâmetros dos registros cardiovasculares foi realizado após 7 dias da lesão bilateral por 6-OHDA. E, para investigar os mecanismos relacionados à hiporreatividade à fenilefrina, foi realizado o protocolo (grupo 6-OHDA e grupo Sham) da reatividade vascular da aorta após 7 dias da infusão bilateral de 6-OHDA ou veículo, no qual foram feitas curvas concentração-efeito cumulativas (CCEC) para fenilefrina (Fenil) na presença dos bloqueadores Nw-nitro-arginine-methyl-ester (L-NAME) ( $10^{-5}$  M), SMT ( $10^{-6}$  M) e indometacina ( $10^{-5}$  M). No estudo 2: os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para microinfusão bilateral de 6-OHDA. No dia da estereotaxia até o dia da cateterização da artéria femoral, os animais receberam um dos seguintes tratamentos: inibidor do receptor da Ang II – Losartan (10mg/kg) ou água (gavagem); inibidor da ECA - Enalapril (10mg/kg) ou água (gavagem). Os

animais foram divididos em 4 grupos: Sham+veículo; Sham+Tratamento; 6-OHDA+veículo e 6-OHDA+tratamento. Após 6 dias, foram submetidos a cateterização da artéria femoral e, 24h depois, o registro dos parâmetros basais cardiovasculares foi realizado. Em outro grupo de animais, o efeito da injeção endovenosa (inibidor da Ang II – Losartan (10mg/kg); inibidor da ECA - Enalapril (10mg/kg)) durante o registro dos parâmetros basais foi realizado após 7 dias de lesão bilateral por 6-OHDA. Os resultados do Estudo 1 confirmam a eficácia da lesão por 6-OHDA pela redução de DA nos animais 6-OHDA. No entanto, o tratamento com o SMT não foi capaz de reverter essa perda de DA. Em relação aos parâmetros basais, os valores de PAS e PAM são menores nos animais 6-OHDA em relação ao seu controle Sham, sem efeito do tratamento com SMT. Na análise da variabilidade da PAS, foi observado diminuição na variância, no componente VLFabs e no componente LFabs nos grupos 6-OHDA quando comparados aos seus controles, independente do tratamento com SMT. Também, foi observado que, após injeção endovenosa de SMT, houve aumento da PA e queda na FC, no entanto a resposta não foi diferente entre os grupos Sham e 6-OHDA. Na função vascular, ao investigarmos os mecanismos da hiporreatividade a fenilefrina, foi visto que a R<sub>máx</sub> à Fenil aumentou com a incubação com SMT, mostrando que possivelmente a via envolvida na hiporreatividade vascular dos animais com parkinsonismo é a iNOS. No estudo 2, nosso modelo de parkinsonismo foi comprovado pela diminuição dos níveis de DA no estriado dos animais lesados pela infusão de 6-OHDA após 7 dias. No entanto, tanto o tratamento com Losartan como o tratamento com Enalapril subsequente à lesão pela neurotoxina não mostraram proteção significativa contra a perda de DA na região do estriado. No protocolo de Losartan e Enalapril, há presença de alterações na análise do barorreflexo. E também redução na PAM e PAS após tratamento com Losartan e redução da PAS com o Enalapril. Também, em relação ao estresse oxidativo, foi observado aumento dos componentes pró-oxidantes no coração e aumento do ânion superóxido no grupo 6-OHDA. Na aorta torácica, foi observado diminuição do ânion superóxido no grupo 6-OHDA. Dessa forma, o conjunto dos resultados apresentados neste estudo sugerem que parte da disfunção cardiovascular em animais submetidos ao parkinsonismo por 6-OHDA possa ser periférica e ter a participação da iNOS endotelial e que a participação do SRA nas alterações cardiovasculares no parkinsonismo bilateral por 6-OHDA em ratos machos seja pequena e restrita à pressão arterial.

**Palavras-chave:** doença de parkinson; alterações cardiovasculares; reatividade vascular; óxido nítrico sintase; S-methylisothiourea; pressão arterial; sistema-renina-angiotensina e estresse oxidativo.

JAGER, Lorena de. **Involvement of nitric oxide and the renin-angiotensin system in cardiovascular disorders resulting from 6-hydroxydopamine parkinsonism in rats**. 2022. 119 p. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Ciências Fisiológicas. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease. Currently, emphasis has been given to non-motor symptoms, more specifically in the cardiovascular system: postural hypotension, postprandial hypotension, blood pressure lability, and possibly fatigue and exercise intolerance; due to its commitment to the quality of life of patients. Several studies have shown the involvement of nitric oxide (NO) in the processes that lead to neurodegeneration in PD, and the use of inhibitors of the inducible isoform of NO-synthase (iNOS) promotes neuroprotection and attenuates the dopamine (DA) loss in experimental models of parkinsonism. In addition, NO also appears to be involved in cardiovascular changes in 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induced parkinsonism. Moreover, studies show that the increase in angiotensin II (Ang II) can lead to increased oxidative stress, exacerbating the neurodegenerative process of PD and that the use of Ang II or angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors has been shown to be effective in protecting against dopaminergic reduction. Therefore, the aim was to evaluate the effects of iNOS and Ang II inhibition on cardiovascular and autonomic function in animals subjected to parkinsonism by 6-OHDA in the substantia nigra pars compacta (SNpc), as well as to clarify the mechanisms involved in hyporeactivity to phenylephrine in rings with endothelium in these animals. For this, the study was divided into two parts. In study 1: the animals underwent stereotaxic surgery for bilateral microinfusion of the neurotoxin 6-OHDA (6 mg/mL in 0.2% ascorbic acid in sterile saline solution) or vehicle solution for the Sham group. On the day of stereotaxis until the day of femoral artery catheterization, the animals received treatment with an iNOS inhibitor – S-methylisothiourea (SMT - 10 mg/kg – ip) or saline solution (0.9% - ip). The animals were divided into 4 groups: Sham+vehicle; Sham+treatment; 6-OHDA+vehicle and 6-OHDA+treatment. After 6 days, they underwent catheterization of the femoral artery and, 24 hours later, the recording of baseline cardiovascular parameters was performed. In another group of animals, the effect of intravenous injection on MAP and HR for the iNOS inhibitor – S-methylisothiourea - SMT (3 mg/kg – ip) was performed 7 days after bilateral 6-OHDA lesion. And, to investigate the mechanisms related to hyporeactivity to phenylephrine, the protocol (6-OHDA group and Sham group) of vascular reactivity of the aorta after 7 days of bilateral infusion of 6-OHDA or vehicle was performed, in which cumulative concentration-effect curves (CCEC) for phenylephrine (Phenyl) in the presence of N<sup>w</sup>-nitro-arginine-methyl-ester (L-NAME) (10<sup>-5</sup> M), SMT (10<sup>-6</sup> M) and indomethacin (10<sup>-5</sup> M). In study 2: the animals underwent stereotaxic surgery for bilateral microinfusion of 6-OHDA. On the day of stereotaxis until the day of femoral artery catheterization, the animals received one of the following treatments: Ang II inhibitor – Losartan (10mg/kg) or water (gavage); ACE inhibitor - Enalapril (10mg/kg) or water (gavage). The animals were divided into 4 groups: Sham+vehicle; Sham+treatment; 6-OHDA+vehicle and 6-OHDA+treatment. After 6

days, they underwent catheterization of the femoral artery and, 24 hours later, the recording of baseline cardiovascular parameters was performed. In another group of animals, the effect of intravenous injection for the following inhibitors: Ang II inhibitor – Losartan (10mg/kg); ACE inhibitor - Enalapril (10mg/kg) was performed 7 days after stereotaxic surgery for bilateral infusion of 6-OHDA. The results of study 1 confirm the efficacy of 6-OHDA injury by reducing DA in 6-OHDA animals. However, treatment with SMT was not able to reverse the loss of DA. In relation to baseline parameters, SBP and MAP values are lower in 6-OHDA animals compared to their Sham control, with no effect of treatment with SMT. In the analysis of SBP variability, a decrease in variance, VLFabs component and LFabs component was observed in the 6-OHDA groups when compared to their controls, regardless of treatment with SMT. It was also observed that, after intravenous injection of SMT, there was an increase in BP and a decrease in HR, however the response was not different between the Sham and 6-OHDA groups. In vascular function, when investigating the mechanisms of hyporeactivity to phenylephrine, it was seen that the Rmax to Phenyl increased with incubation with SMT, showing that possibly iNOS could be involved in the vascular hyporeactivity of animals with parkinsonism. In study 2, our model of parkinsonism was confirmed by the decrease in DA levels in the striatum after 7 days of 6-OHDA lesion. However, both treatment with Losartan and treatment with Enalapril did not show significant protection against loss of DA in the striatal region. In the Losartan and Enalapril protocol, there are alterations in the baroreflex analysis. And also reduction in MAP and SBP after treatment with Losartan and reduction in SBP with Enalapril. Also, in relation to oxidative stress, an increase in the pro-oxidant components in the heart and an increase in the superoxide anion in the 6-OHDA group was observed. In the thoracic aorta, a decrease in superoxide anion was observed in the 6-OHDA group. Thus, the set of results presented in this study suggest that part of the cardiovascular dysfunction in animals submitted to 6-OHDA parkinsonism may be peripheral and have the participation of endothelial iNOS and that the participation of the RAS in the cardiovascular alterations in bilateral parkinsonism by 6-OHDA in male rats is small and restricted to blood pressure.

**Key words:** parkinson's disease; cardiovascular changes; vascular reactivity; nitric oxide synthase; s-methylisothiourrea; blood pressure; renin-angiotensin system and oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Esquema ilustrativo da via nigroestriatal de uma pessoa saudável (A) e de um portador da doença de Parkinson (B) .....20
- Figura 2** – Representação esquemática dos protocolos experimentais .....38
- Figura 3** – Representação do protocolo experimental para registro dos parâmetros cardiovasculares .....40
- Figura 4** – Concentração de dopamina (DA) no estriado após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou infusão de 6-OHDA e tratamento com SMT (10mg/kg i.p.) ou salina (0,9%, i.p.). Os dados foram analisados por ANOVA 2 vias e estão representados como média  $\pm$  EPM. Sham-Salina n = 8; 6-OHDA-Salina n = 8; Sham-SMT n = 7; 6-OHDA-SMT = 7. \*\*\*\* p<0,0001. a = efeito da lesão de parkinsonismo; p<0,05 vs Sham .....45
- Figura 5** – Parâmetros basais nos grupos após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou infusão de 6-OHDA e tratamento com SMT (10mg/kg i.p) ou salina (0,9%, i.p.). (A) Pressão arterial média; (B) Frequência cardíaca; (C) Pressão arterial sistólica e (D) Pressão arterial diastólica. Os dados foram analisados por ANOVA 2 vias e estão representados como média  $\pm$  EPM. Sham-Sal n = 8; 6-OHDA-Sal n = 8; Sham-SMT n = 7; 6-OHDA-SMT = 7. a = efeito da lesão de parkinsonismo; p<0,05 vs Sham .....47
- Figura 6** – Análise espectral da pressão arterial sistólica (PAS) após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou infusão de 6-OHDA e tratamento com SMT (10mg/kg i.p) ou salina (0,9%, i.p.). (A) Variância; (B) LFabs e (C) VLFabs. Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias e estão representados como média  $\pm$  EPM. Sham-Sal n = 8; 6-OHDA-Sal n = 8; Sham-SMT n = 7; 6-OHDA-SMT = 7. PAS = Pressão arterial sistólica; LF = baixa frequência; HF = alta frequência; VLF = muito baixa frequência. a = efeito da lesão de parkinsonismo; p<0,05 vs Sham .....49
- Figura 7** – Análise espectral do intervalo de pulso (IP) Parâmetros basais nos grupos após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou

infusão de 6-OHDA e tratamento com SMT (10mg/kg i.p) ou salina (0,9%, i.p.). Análise da modulação autonômica em (A) variância de IP, (B) LFnu, (C) HFnu e (D) LF/HF. Os dados foram analisados por Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn e estão apresentados como mediana + espaço interquartil. Sham-Sal n = 8; 6-OHDA-Sal n = 8; Sham-SMT n = 7; 6-OHDA-SMT = 7. IP = intervalo de pulso, HF = componente de alta frequência, LF = componente de baixa frequência. ....50

**Figura 8 –** Análise do barorreflexo espontâneo após infusão bilateral de 6-OHDA e 7 dias de tratamento com SMT (10mg/kg; ip) ou salina (0,9%, i.p.). (A) Sequências “up” (Up gain); (B) Sequências “down” (Down gain); (C) Ganho Total; (D) BEI. Os dados foram analisados por ANOVA 2 vias e estão representados como média ± EPM. Sham-Sal n = 8; 6-OHDA-Sal n = 8; Sham-SMT n = 7; 6-OHDA-SMT = 7.....51

**Figura 9 –** Concentração de dopamina (DA) no estriado após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou infusão de 6-OHDA. Os dados foram analisados por teste T não pareado e estão representados como média ± EPM. Sham n = 11; 6-OHDA n = 7. \*\*\*\* p<0,0001 .....52

**Figura 10 –** Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (a) e na frequência cardíaca (FC) (b), após a administração endovenosa de salina (tempo - 20) e de SMT (3 mg/kg – tempo 0) em animais com ou sem lesão por 6-OHDA. Os valores estão expressos em média + EPM, os dados foram analisados por RMANOVA two-way, seguido do pós teste de Bonferroni). Sham n = 11; 6-OHDA n = 7 .....54

**Figura 11 –** Concentração de dopamina (DA) no estriado após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou infusão de 6-OHDA. Os dados foram analisados por teste T não pareado e estão representados como média ± EPM. Sham n = 8; 6-OHDA n = 10. \*\*\*\* p<0,0001 .....55

**Figura 12 –** Curvas concentração efeito cumulativa para fenilefrina em

anéis com endotélio incubados com indometacina, L-NAME e SMT de machos Sham (Figura A) ou 6-OHDA (Figura B). Dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M., n = 10. ANOVA de 1 via, \*p < 0,05 L-NAME vs Fenil; #p < 0,05 SMT vs Fenil .....57

- Figura 13** – A) Concentração de dopamina (DA) no estriado após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou infusão de 6-OHDA. B) Expressão da eNOS; C) Expressão da iNOS e D) Expressão da nNOS. Os dados foram analisados por teste T não pareado e estão representados como média  $\pm$  EPM. Sham n = 8; 6-OHDA n = 10. \*\*\*\* p<0,0001. N = 5 a 8/grupo .....58
- Figura 14** – Representação esquemática dos protocolos experimentais .....68
- Figura 15** – Representação do protocolo experimental para registro dos parâmetros cardiovasculares .....70
- Figura 16** – Concentração de dopamina (DA) no estriado após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou infusão de 6-OHDA e tratamento com Losartan (10mg/kg - gavagem) ou H<sub>2</sub>O (gavagem). Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias e estão representados como média  $\pm$  EPM. Sham-H<sub>2</sub>O n = 10; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O n = 11; Sham-Losartan n = 7; 6-OHDA-Losartan = 8. a = efeito da lesão de parkinsonismo; p<0,05 vs Sham .....74
- Figura 17** – Parâmetros basais nos grupos após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou infusão de 6-OHDA e tratamento com Losartan (10mg/kg - gavagem) ou H<sub>2</sub>O (gavagem). (A) Pressão arterial média; (B) Frequência cardíaca; (C) Pressão arterial sistólica e (D) Pressão arterial diastólica. Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias e estão representados como média  $\pm$  EPM. Sham-H<sub>2</sub>O n = 11; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O n = 11; Sham-Losartan n = 7; 6-OHDA-Losartan = 8. a = efeito da lesão de parkinsonismo; p<0,05 vs Sham; b = efeito do tratamento com Losartan; p<0,05 .....76
- Figura 18** – Análise espectral da pressão arterial sistólica (PAS) após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou infusão de 6-OHDA e tratamento com Losartan (10mg/kg - gavagem) ou H<sub>2</sub>O (gavagem). (A) Variância; (B) LFabs e (C) VLFabs. Os dados

foram analisados por ANOVA de 2 vias e estão representados como média  $\pm$  EPM. Sham-H<sub>2</sub>O n = 11; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O n = 11; Sham-Losartan n = 7; 6-OHDA-Losartan = 8. PAS = Pressão arterial sistólica; LF = baixa frequência; HF = alta frequência; VLF = muito baixa frequências a = efeito da lesão de parkinsonismo; p<0,05 vs Sham; b = efeito do tratamento com Losartan; p<0,05 .....77

**Figura 19** – Análise espectral do intervalo de pulso (IP) Parâmetros basais nos grupos após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou infusão de 6-OHDA e tratamento com Losartan (10mg/kg – gavagem) ou H<sub>2</sub>O (gavagem). Análise da modulação autonômica em (A) variância de IP, (B) LFnu, (C) HFnu e (D) LF/HF. Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias e estão representados como média  $\pm$  EPM. Sham-H<sub>2</sub>O n = 11; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O n = 11; Sham-Losartan n = 7; 6-OHDA-Losartan = 8. IP = intervalo de pulso, HF = componente de alta frequência, LF = componente de baixa frequência. ....78

**Figura 20** – Análise do barorreflexo espontâneo após infusão bilateral de 6-OHDA e tratamento com Losartan (10mg/kg – gavagem) ou H<sub>2</sub>O (gavagem). (A) Sequências “up” (Up gain); (B) Sequências “down” (Down gain); (C) Ganho Total; (D) BEI. Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias e estão representados como média  $\pm$  EPM. Sham-H<sub>2</sub>O n = 11; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O n = 11; Sham-Losartan n = 7; 6-OHDA-Losartan = 8 a = efeito da lesão de parkinsonismo; p<0,05 vs Sham .....80

**Figura 21** – Concentração de dopamina (DA) no estriado após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou infusão de 6-OHDA e tratamento com Enalapril (10mg/kg - gavagem) ou H<sub>2</sub>O (gavagem). Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias e estão representados como média  $\pm$  EPM. Sham-H<sub>2</sub>O n = 11; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O n = 11; Sham-Enalapril n = 9; 6-OHDA-Enalapril = 8. \*\*\*p<0,001 a = efeito da lesão de parkinsonismo; p<0,05 vs Sham.....81

**Figura 22** – Parâmetros basais nos grupos após 7 dias de lesão bilateral

com veículo ou infusão de 6-OHDA e tratamento com Enalapril (10mg/kg - gavagem) ou H<sub>2</sub>O (gavagem). (A) Pressão arterial média; (B) Frequência cardíaca; (C) Pressão arterial sistólica e (D) Pressão arterial diastólica. Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias e estão representados como média ± EPM. Sham-H<sub>2</sub>O n = 11; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O n = 11; Sham-Enalapril n = 9; 6-OHDA-Enalapril = 8. a = efeito da lesão de parkinsonismo; p<0,05 vs Sham; b = efeito do tratamento com Losartan; p<0,05

.....82

**Figura 23** – Análise espectral da pressão arterial sistólica (PAS) após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou infusão de 6-OHDA e tratamento com Enalapril (10mg/kg – gavagem) ou H<sub>2</sub>O (gavagem). (A) Variância; (B) LFabs e (C) VLFabs. Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias e estão representados como média ± EPM. Sham-H<sub>2</sub>O n = 11; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O n = 11; Sham-Enalapril n = 9; 6-OHDA-Enalapril = 8. PAS = Pressão arterial sistólica; LF = baixa frequência; HF = alta frequência; VLF = muito baixa frequência. a = efeito da lesão de parkinsonismo; p<0,05 vs Sham; b = efeito do tratamento com Losartan; p<0,05

.....84

**Figura 24** – Análise espectral do intervalo de pulso (IP) Parâmetros basais nos grupos após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou infusão de 6-OHDA e tratamento com Enalapril (10mg/kg – gavagem) ou H<sub>2</sub>O (gavagem). Análise da modulação autonômica em (A) variância de IP, (B) LFnu, (C) HFnu e (D) LF/HF. Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias e estão representados como média ± EPM Sham-H<sub>2</sub>O n = 11; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O n = 11; Sham-Enalapril n = 9; 6-OHDA-Enalapril = 8. IP = intervalo de pulso, HF = componente de alta frequência, LF = componente de baixa frequência

.....85

**Figura 25** – Análise do barorreflexo espontâneo após infusão bilateral de 6-OHDA e tratamento com Losartan (10mg/kg – gavagem) ou H<sub>2</sub>O (gavagem). (A) Sequências “up” (Up gain); (B) Sequências “down” (Down gain); (C) Ganho Total; (D) BEI. Os

dados foram analisados por ANOVA de 2 vias seguido de pós-teste de Tukey e estão representados como média  $\pm$  EPM. Sham-H<sub>2</sub>O n = 11; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O n = 11; Sham-Enalapril n = 9; 6-OHDA-Enalapril = 8. a = efeito da lesão de parkinsonismo .....87

**Figura 26** – Concentração de dopamina (DA) no estriado após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou infusão de 6-OHDA. Os dados foram analisados por teste T não pareado e estão representados como média  $\pm$  EPM. Sham n = 7; 6-OHDA n = 6. \*\*\*\* p<0,0001. ....88

**Figura 27** – Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (a) e na frequência cardíaca (FC) (b), após a administração endovenosa de salina (tempo - 20) e de Losartan (10 mg/kg – tempo 0) em animais com ou sem lesão por 6-OHDA. Os valores estão expressos em média + EPM, os dados foram analisados por RMANOVA two-way, seguido do pós teste de Bonferroni). Sham n = 7; 6-OHDA n = 6.....90

**Figura 28** – Concentração de dopamina (DA) no estriado após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou infusão de 6-OHDA. Os dados foram analisados por teste T não pareado e estão representados como média  $\pm$  EPM. Sham n = 8; 6-OHDA n = 6. \*\*\*\* p<0,00018 .....91

**Figura 29** – Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (a) e na frequência cardíaca (FC) (b), após a administração endovenosa de salina (tempo - 20) e de Enalapril (10 mg/kg – tempo 0) em animais com ou sem lesão por 6-OHDA. Os valores estão expressos em média + EPM, os dados foram analisados por RMANOVA two-way, seguido do pós teste de Bonferroni). Sham n = 8; 6-OHDA n = 6.....93

**Figura 30** – Concentração de dopamina (DA) no estriado após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou infusão de 6-OHDA. Os dados foram analisados por teste T não pareado e estão representados como média  $\pm$  EPM. Sham n = 8; 6-OHDA n = 6. \*\*\*\* p<0,0001. ....94

**Figura 31** – Efeitos da indução do parkinsonismo no balanço redox da aorta

abdominal. Parâmetros antioxidantes expressos pela análise de FRAP e ABTS e pró-oxidantes expressos pelos ensaios de NBT e T-BARS. Os ensaios foram realizados em ratos Sham e com lesão bilateral de 6-OHDA. Teste t-Student. Valores expressos como média  $\pm$  EPM, n=6-8 por grupo. ....95

**Figura 32** – Efeitos da indução do parkinsonismo no balanço redox da aorta torácica. Parâmetros antioxidantes expressos pela análise de FRAP e ABTS e pró-oxidantes expressos pelos ensaios de NBT e T-BARS. Os ensaios foram realizados em ratos Sham e com lesão bilateral de 6-OHDA. Teste t-Student. Valores expressos como média  $\pm$  EPM, n=6-8 por grupo. ....96

**Figura 33** – Efeitos da indução do parkinsonismo no balanço redox no coração. Parâmetros antioxidantes expressos pela análise de FRAP e ABTS e pró-oxidantes expressos pelos ensaios de NBT e T-BARS. Os ensaios foram realizados em ratos Sham e com lesão bilateral de 6-OHDA. Teste t-Student. Valores expressos como média  $\pm$  EPM, n=6-8 por grupo .....97

**Figura 34** – Efeitos da indução do parkinsonismo no balanço redox no músculo gastrocnêmio. Parâmetros antioxidantes expressos pela análise de FRAP e ABTS e pró-oxidantes expressos pelos ensaios de NBT e T-BARS. Os ensaios foram realizados em ratos Sham e com lesão bilateral de 6-OHDA. Teste t-Student. Valores expressos como média  $\pm$  EPM, n=6-8 por grupo. ....98

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Resposta máxima (Rmax) e pD2 (logaritmo negativo da concentração agonista resultando em 50% da resposta máxima) para fenilefrina em anéis com endotélio incubados com indometacina, L-NAME e SMT em machos 6-OHDA ou Sham.....	56
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	(radical 2,2'azinobis- (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid))
ANG I	Angiotensina I
ANG II	Angiotensina II
AT1	Receptor do tipo I
AT2	Receptor do tipo II
BH4	Tetrahidrobiopterina
CCEC	Curvas concentração efeito cumulativa
COX	Enzima enzima ciclo-oxigenase
DA	Dopamina
DAT	Transportador de Dopamina
DP	Doença de Parkinson
eNOS	Óxido Nítrico Sintase endotelial
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
FC	Frequência Cardíaca
FENIL	Fenilefrina
FMN	Flavina Mononucleótido
FRAP	Ferric reducing antioxidante power
GW274150	((2-((1-iminoethyl)amino)ethyl)-L-homocysteine))
HP	Hipotensão Postural
HO	Hipotensão Ortostática
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzível
L-NAME	Nw-nitro-arginina-metil-ester
HF	Alta Frequência
LF	Baixa Frequência
LF/HF	Balanco Simpato-Vagal
LPS	Lipopolissacarídeo
mtNOS	Óxido Nítrico Sintase mitocondrial
MTPT	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NBT	Nitroblue tetrazolium

NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
nNOS	Óxido Nítrico Sintase neuronal
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAM	Pressão Arterial Média
PAP	Pressão Arterial Pulsátil
PAS	Pressão Arterial Sistólica
pD <sub>2</sub>	Logaritmo negativo da concentração agonista resultando em 50% da resposta máxima
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
R <sub>máx</sub>	Resposta máxima
RVP	Resistência Vascular Periférica
SMT	S-metilisotiouréia
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SN <sub>pc</sub>	Substância Negra Pars Compacta
SNP	Sistema Nervoso Parassimpático
SNS	Sistema Nervoso Simpático
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
TBARS	Ácido Tiobarbitúrico
VLF	Very low frequency
6-OHDA	6-hidroxidopamina
7-NI	7-nitroindazol

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	31
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	32
3.1	GERAL .....	32
3.2	ESPECÍFICOS .....	32
<b>4</b>	<b>ESTUDOS</b> .....	34
4.1	ESTUDO 1 .....	34
4.1.1	Introdução.....	34
4.1.2	Materiais e Métodos .....	37
4.1.3	Resultados.....	45
4.1.4	Discussão .....	59
4.2	ESTUDO 2 .....	65
4.2.1	Introdução.....	65
4.2.2	Materiais e Métodos .....	66
4.2.3	Resultados.....	74
4.2.4	Discussão .....	99
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	103
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	104
	<b>APÊNDICES</b> .....	115
	APENDICE A – Tabela com dados brutos Estudo 1.....	115
	APENDICE B – Tabela com dados brutos Estudo 2.....	116
	<b>ANEXO</b> .....	119
	ANEXO A – Comitê de Ética .....	119

## 1. INTRODUÇÃO – REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 DOENÇA DE PARKINSON: DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA

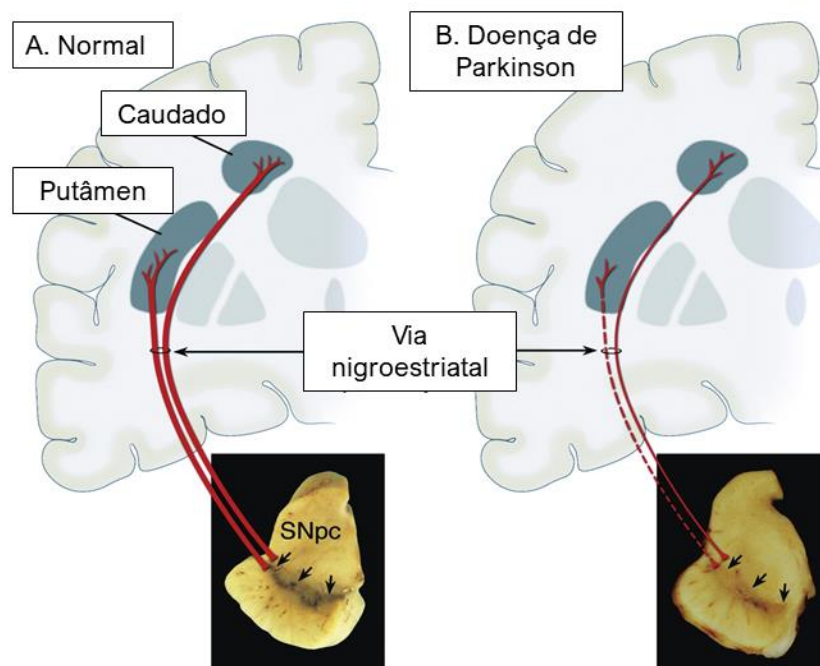
A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa complexa, relacionada à idade, associada à deficiência de dopamina e déficits motores e não motores. É caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra pars compacta (SNpc), localizada no mesencéfalo, e apresenta a formação de agregados de  $\alpha$ -sinucleína, denominados corpos de Lewy, que não são achados específicos da DP e são encontrados em outras doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer e a doença de Huntington (KALIA; LANG, 2015). Afeta o estado físico, social, psicológico e funcional dos indivíduos e tem como manifestações clínicas, a bradicinesia, tremor em repouso, rigidez, instabilidade postural e anormalidades da marcha (RODRIGUEZ-OROZ *et al.*, 2009; SIAN *et al.*, 1999).

A incidência de DP varia de 5 em 100.000 a mais de 35 em 100.000 novos casos por ano (TWELVES; PERKINS; COUNSELL, 2003). A incidência aumenta de 5 a 10 vezes da 6ª para a 9ª década de vida. A prevalência de DP também aumenta com a idade. Em uma meta-análise de 4 populações norte-americanas, a prevalência aumentou de menos de 1% de homens e mulheres de 45 a 54 anos para 4% de homens e 2% de mulheres com 85 anos ou mais (MARRAS *et al.*, 2018). Prevê-se que a prevalência global de DP dobre até 2040 (DORSEY *et al.*, 2018), tornando-se o distúrbio neurodegenerativo de crescimento mais rápido, inclusive à frente da doença de Alzheimer (FEIGIN *et al.*, 2017). Acompanhado a esse aumento, os encargos sociais e econômicos da DP também irão se elevar. A deterioração da qualidade de vida tanto do indivíduo com a DP quanto dos cuidadores progride e gera um impacto econômico e aumento dos encargos financeiros para a família do indivíduo e para a sociedade em termos de assistência social e custos de prestação de cuidados de saúde (GUMBER; RAMASWAMY; THONGCHUNDEE, 2019).

### 1.2 DOPAMINA E SISTEMA NIGROESTRIATAL

A via dopaminérgica nigroestriatal é composta por neurônios dopaminérgicos cujos corpos celulares se localizam na SNpc e seus axônios se projetam para o caudado-putamen, ou corpo estriado (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). A redução dos

neurônios da SNpc leva a redução de fibras dopaminérgicas que se projetam para o estriado dorsal, gerando então, uma diminuição das concentrações de dopamina (DA) (Figura 1). Ainda, há diminuição da atividade de enzimas envolvidas na síntese de DA, como a tirosina hidroxilase (TH) e DOPA-descarboxilase (SIAN *et al.*, 1999). A deficiência de dopamina (DA) nos núcleos da base leva as disfunções motoras relacionadas à DP (BLANDINI, 2013; MOORE *et al.*, 2005). Quando a perda de neurônios dopaminérgicos atinge de 60-80% é que os sintomas motores clínicos se tornam mais evidentes (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). No entanto, a DP também pode se desenvolver em outras regiões centrais envolvendo neurônios não dopaminérgicos, 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), estando relacionadas às alterações neuroquímicas e neuropatológicas da DP (SCHULZ; FALKENBURGER, 2004; SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2020).



**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).

Diversos estudos vêm sendo realizados para se entender a complexidade e a

etiologia da DP. Estes mostram que a DP se manifesta de forma lenta e progressiva que se inicia anos antes do diagnóstico poder ser realizado (KALIA; LANG, 2015). Tal complexidade é acompanhada pela dificuldade em se fazer um diagnóstico definitivo nos estágios iniciais da doença e as dificuldades no manejo dos sintomas em estágios posteriores (KALIA; LANG, 2015). O diagnóstico clínico da DP é baseado principalmente em características motoras, como um tremor de repouso assimétrico lentamente progressivo, rigidez e bradicinesia (SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2020). Além dos sintomas motores, há a presença de sintomas neuropsiquiátricos, distúrbios do sono, sintomas autonômicos, alterações gastrointestinais e sensoriais (CHAUDHURI; SCHAPIRA, 2009). Os sintomas não-motores da DP podem preceder os sintomas motores em mais de uma década (CHAUDHURI; SCHAPIRA, 2009; SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2020), o que nos mostra da relevância em se estudar as disfunções não motoras da DP.

Alterações na fisiologia cardiovascular são frequentes em pacientes com DP, e podem preceder o desenvolvimento das características motoras e o diagnóstico de DP (PALMA *et al.*, 2013). Strano e colaboradores (2016) demonstram que insuficiência autonômica cardiovascular sutil a evidente pode ocorrer em pacientes logo após o diagnóstico de DP (STRANO *et al.*, 2016).

A etiologia da DP envolve fatores ambientais e genéticos, que convergem em um conjunto comum de vias, incluindo disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, agregação de proteínas, autofagia prejudicada e neuroinflamação (DORSZEWSKA *et al.*, 2021; SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2020). As formas hereditárias da DP representam 5-10% de todos os casos (POEWE *et al.*, 2017).

### 1.3 MODELOS EXPERIMENTAIS

Modelos de experimentação animal são utilizados como instrumentos de estudo para compreensão das diferentes fases/estados de doenças e/ou condições humanas. 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 (DUTY; JENNER, 2011; JACKSON-LEWIS; BLESA; PRZEDBORSKI, 2012).

Em relação à DP, há diferentes modelos que são capazes de induzir ao parkinsonismo ou que mimetizam um ou mais sintomas da DP. Existem os modelos

farmacológicos, como por exemplo a Reserpina e o Haloperidol, os modelos genéticos e os modelos induzidos por neurotoxina (DUTY; JENNER, 2011; JACKSON-LEWIS; BLESA; PRZEDBORSKI, 2012). Dentro desta última classe, temos os modelos: 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), Rotenona, o paraquat, o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), lipopolissacarídeo (LPS) e metanfetamina. As diferentes neurotoxinas utilizadas para indução do parkinsonismo em animais objetivam lesar a via nigroestriatal, (DUTY; JENNER, 2011; JACKSON-LEWIS; BLESA; PRZEDBORSKI, 2012).

Até o momento, nenhum modelo animal disponível é capaz de reproduzir todas as alterações observadas em humanos portadores da DP (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; DUTY; JENNER, 2011). Entretanto, cada modelo possui características complementares, que auxiliam no esclarecimento da fisiopatologia e favorecem a reflexão acerca de novas abordagens de estudo no meio científico (FRANCARDO, 2018).

Um dos modelos clássicos e mais utilizados para a indução de parkinsonismo é o modelo de lesão com a toxina 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) na SNpc. A neurotoxina 6-OHDA, por não atravessar a barreira hematoencefálica, deve ser administrada diretamente no local a ser lesionado, entre eles, a SNpc, o estriado ou o feixe prosencéfalo medial. A 6-OHDA, após a infusão, é captada pelos transportadores de DA (DAT), ficando concentrada nos terminais nervosos de DA, inibindo o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, o que leva a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que conduz a morte neuronal dos neurônios dopaminérgicos (ZIGMOND; SMEYNE, 2014). A lesão com 6-OHDA não induz a produção de corpos de Lewy (JACKSON-LEWIS; BLESA; PRZEDBORSKI, 2012). A neurotoxina de 6-OHDA também pode ser administrada diretamente no estriado. A administração de 6-OHDA na SNpc induz à degeneração das células produtoras de DA da substância negra, 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, 2018).

No modelo bilateral de 6-OHDA é observado redução de DA após 7 dias de lesão, com presença de alterações comportamentais no animal, entre elas: redução na frequência de locomoção; diminuição do número de vezes em que o animal se apoia nas patas traseiras (“rearing frequency”) e aumento do tempo de imobilidade (ARIZA

*et al.*, 2010). Desta maneira, o modelo de parkinsonismo por 6-OHDA foi o modelo de escolha para mimetizar a depleção dopaminérgica característica da DP.

#### 1.4 ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES NA DOENÇA DE PARKINSON

Um subconjunto dos sinais e sintomas não motores da DP está associado à função alterada de um ou mais componentes do sistema nervoso autônomo (SNA), denominado disautonomia (METZGER; EMBORG, 2019). O sistema nervoso autônomo (SNA) regula a atividade de todos os órgãos do corpo, incluindo 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). 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). Hipotensão ortostática, hiperidrose e disfunção gastrointestinal (GI) são manifestações comuns da disautonomia da DP que afetam muito a qualidade de vida do paciente (TOMIC *et al.*, 2017). As opções de tratamento para as disautonomias são limitadas ao alívio dos sintomas porque a etiologia dessas características e a DP em geral ainda são desconhecidas.

Estima-se que 80% dos pacientes com DP apresentam anormalidades na frequência cardíaca e na pressão arterial (GOLDSTEIN *et al.*, 2000). A variabilidade da frequência cardíaca (VFC) diminui na DP, e uma frequência cardíaca (FC) máxima mais baixa pode estar presente no momento do diagnóstico da DP (PALMA *et al.*, 2013). A hipotensão ortostática, incapacidade de regular a PA com mudanças no posicionamento do corpo, acomete 40% dos pacientes com DP e causa tontura e síncope, aumentando o risco de quedas e lesões nos pacientes (JAIN; GOLDSTEIN, 2012). Outras manifestações podem coexistir em indivíduos com a DP, entre elas: hipotensão pós prandial, labilidade da PA, hipertensão supina e, possivelmente fadiga e intolerância ao exercício (JAIN; GOLDSTEIN, 2012). As anormalidades da FC parecem ser decorrentes de respostas parassimpáticas disfuncionais, enquanto a incapacidade de regular a PA está relacionada à perda da regulação simpática (JAIN; GOLDSTEIN, 2012). Extensas pesquisas clínicas ilustram que a hipotensão ortostática da DP está relacionada tanto com a perda da inervação simpática pós-

ganglionares para o coração quanto com a insuficiência do barorreflexo (JAIN; GOLDSTEIN, 2012; METZGER; EMBORG, 2019). 60% dos pacientes com DP apresentam perda da inervação simpática cardíaca ao diagnóstico (KASHIHARA; IMAMURA; SHINYA, 2010).

Estudos anteriores de nosso laboratório mostram que em animais com lesão bilateral por 6-hidroxidopamina (6-OHDA), ocorre uma diminuição nos parâmetros basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), os quais são acompanhados de redução da modulação simpática na pressão arterial sistólica (ARIZA *et al.*, 2015). Além disso, as respostas ao baroreflexo e ao quimioreflexo estão alteradas em animais com parkinsonismo por 6-OHDA (ARIZA *et al.*, 2015; FALQUETTO *et al.*, 2017). Também, Falquetto e colaboradores observaram diminuição do número de neurônios relacionados ao controle cardiovascular no tronco encefálico de ratos induzidos ao parkinsonismo por 6-OHDA (FALQUETTO *et al.*, 2017). A injeção bilateral de 6-OHDA no estriado de ratos promove perda de periodicidade circadiana, especialmente na FC (BOULAMERY *et al.*, 2010). Como há presença de alterações cardiovasculares com o modelo por 6-OHDA que mimetizam algumas das disfunções presentes em pacientes com DP, este tornou-se uma ferramenta útil para se estudar aspectos cardiovasculares na DP.

### 1.5 ÓXIDO NÍTRICO E A DP

O óxido nítrico (NO) está envolvido nos processos que levam a neurodegeneração na DP em humanos e em modelos experimentais (BARTH WAL, M. K.; SRIVASTAVA; DIKSHIT, 2001; DEL-BEL *et al.*, 2011; MOLINA *et al.*, 1998; YUSTE *et al.*, 2012). Ele é caracterizado como um gás lipossolúvel com meia vida de aproximadamente 4-10 segundos e produzido por praticamente todas as células do organismo (LI; POULOS, 2005). O NO atua em diversos processos fisiológicos como vasodilatação, memória, neuroproteção, peristaltismo, defesa imunológica, ereção peniana, secreções endócrinas e exócrinas bem como participa de vários sistemas como o cardiovascular, reprodutivo, sistema imune e sistema nervoso central (SNC) (LI; POULOS, 2005). No entanto, em situações patológicas, grandes quantidades de NO são produzidas e são potencialmente tóxicas.

O NO é produzido por meio de enzimas especializadas chamadas de óxido nítrico sintases (NOS). As enzimas catalisam a formação de NO a partir de L-arginina, O<sub>2</sub> e

requer cofatores como tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>), ferro heme, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleótido (FMN) e cálcio (Ca<sup>2+</sup>/calmodulina) (TEJERO; SHIVA; GLADWIN, 2020). Há 4 isoformas diferentes responsáveis pela produção de NO: NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS), NOS mitocondrial (mtNOS) e NOS induzível (iNOS) (GIULIVI, 2003; MOLINA *et al.*, 1998).

A nNOS (NOS neuronal ou NOS I) é encontrada em neurônios periféricos e centrais, células gliais, células endoteliais, fibroblastos adventíciais, cardiomiócitos, células musculares lisas e algumas células epiteliais. É expressa de forma constitutiva e sua taxa de produção é maior que da eNOS, é regulada pelo complexo cálcio/calmodulina (Ca<sup>2+</sup>/CaM) e muito susceptível à inibição pelo próprio NO. A nNOS produz NO de forma pulsátil o que ajuda a regular a neurotransmissão, a regulação central da pressão sanguínea, relaxamento do músculo liso e a vasodilatação através dos nervos nitrérgicos periféricos.

A eNOS (NOS endotelial ou NOS III) é encontrada nas células endoteliais, plaquetas, eritrócitos, cardiomiócitos e nas células musculares lisas. No entanto, é expressa predominantemente no endotélio. É uma isoforma constitutiva e o NO produzido por ela além de regular o fluxo sanguíneo basal nos vasos sanguíneos, atua de forma tônica inibindo a ativação de plaquetas e a adesão de moléculas inflamatórias no endotélio (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012).

A NOS mitocondrial (mtNOS) é um novo membro da família NOS. Foi identificada como isoforma da NOS I e está presente no interior da membrana mitocondrial (ELFERING; SARKELA; GIULIVI, 2002). O NO é produzido localmente na mitocôndria porém a produção intramitocondrial excessiva inibe a atividade do complexo I e IV na cadeia respiratória produzindo ERO (BROOKES, 2004).

A iNOS (NOS induzível ou NOS II) está presente em células nucleadas como macrófagos, neutrófilos, células do músculo liso vascular, fibroblastos, células endoteliais e epiteliais e células da glia. A via induzível, iNOS é independente de cálcio e é expressa em condições patológicas em diversas células relacionadas ao sistema imune (DAFF, 2010; MOLINA *et al.*, 1998). Apesar de ser liberada principalmente em situações inflamatórias, estudos também mostraram que a iNOS também pode ser expressa sob situações fisiológicas (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012). A iNOS quando comparada às outras duas isoformas produz grandes quantidades de NO e sua atividade se mantém até a completa utilização do seu substrato. Devido a essa

extensiva e prolongada produção de NO juntamente com o superóxido formado por ele ou por outras fontes, pode levar a produção exacerbada de peroxinitrito que é uma molécula altamente oxidante e tóxica levando à injúria celular (TEJERO; SHIVA; GLADWIN, 2020).

Há várias evidências, tanto em humanos quanto em modelos animais, que mostram o envolvimento do NO e das NOS na etiologia da DP. No entanto, os mecanismos pelos quais o NO contribui para a neurodegeneração não são bem compreendidos. Sabe-se que a indução da DP está relacionada ao aumento do estresse oxidativo no cérebro, o que leva a danos aos neurônios da substância negra (DIAS; JUNN; MOURADIAN, 2013). A administração de inibidores da NOS, como o Nw-nitro-arginina-metil-éster (L-NAME) atenua a queda de DA e de seus metabólitos em ratos com injeção unilateral de 6-OHDA (BARTH WAL, M.; SRIVASTAVA; DIKSHIT, 2001). A administração de 7-Nitroindazol (7-NI) ou de S-methylisothiurea (SMT), inibidores da nNOS e iNOS respectivamente, foram capazes de proteger dos efeitos neurotóxicos da lesão por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), sugerindo então a participação do NO produzido por essas vias na DP (ARAS *et al.*, 2014a; DI MONTE *et al.*, 1996; SCHULZ *et al.*, 1995). A administração de GW274150 ((2-((1-iminoethyl)amino)ethyl)-L-homocysteine - inibidor seletivo da iNOS) após lesão unilateral por 6-OHDA atenuou de forma significativa a perda de DA no estriado de ratos Sprague-Dawley (BROOM *et al.*, 2011). Também, a degeneração de neurônios dopaminérgicos leva a diminuição das concentrações de nNOS na substância negra de ratos com lesão por injeção unilateral de 6-OHDA (DEL BEL *et al.*, 2002), enquanto a administração de MPTP em camundongos promove a elevação da iNOS (LIBERATORE *et al.*, 1999). Em humanos, foi encontrado aumento da expressão de iNOS na SNpc em amostras cerebrais post-mortem de indivíduos com DP (HUNOT *et al.*, 1996). Sendo assim, evidências indicam que as NOS podem participar da neurodegeneração de neurônios dopaminérgicos em modelos animais de DP. Portanto, o uso de inibidores de NOS no tratamento da DP vem sendo discutido (BROOM *et al.*, 2011; MARTINS-PINGE; JAGER; CAMPOS, 2022).

Em relação ao controle central do sistema cardiovascular, observou-se que a nNOS está aumentada no núcleo paraventricular do hipotálamo, área de controle cardiovascular, levando a um aumento do tônus GABAérgico na função cardiovascular e contribuindo para os menores valores de PA basal em ratos machos induzidos ao parkinsonismo pela 6-OHDA (TUROSSI AMORIM, Eric Diego *et al.*, 2019). No

entanto, não descartamos a hipótese de que mecanismos periféricos participem dessas disfunções cardiovasculares. A maior parte dos estudos com modelos de parkinsonismo que avaliaram o envolvimento do NO, avaliaram as concentrações de NO cerebral. Em relação ao NO periférico existem poucos dados. Há redução na expressão da nNOS entérica de animais induzidos unilateralmente por 6-OHDA (BLANDINI; ARMENTERO; MARTIGNONI, 2008). Nosso grupo de estudos, observou diferenças nas concentrações tissulares de NO em animais sedentários ou submetidos a treinamento físico antes da lesão por 6-OHDA, estando aumentado na aorta de animais 6-OHDA comparado aos seus controles (DE JAGER *et al.*, 2018). No entanto, ainda não se sabe qual isoforma estaria participando dessas alterações.

Periféricamente, o NO atua como um potente vasodilatador para aumentar o fluxo sanguíneo, e sua síntese e biodisponibilidade pelo endotélio vascular contribui para uma maior vasodilatação para adaptação em diferentes condições pelo sistema cardiovascular (DI FRANCESCO MARINO *et al.*, 2009; GREEN *et al.*, 2004; MCALLISTER; LAUGHLIN, 2006). Alterações em sua produção podem prejudicar as respostas hemodinâmicas e comprometer a saúde cardiovascular. Além de importantes propriedades vasodilatadoras, também desempenha um papel central na manutenção da homeostase vascular (CYR *et al.*, 2020). No endotélio, as isoformas atuam de maneiras diferentes. A atividade da eNOS é iniciada em resposta a estímulos físicos e químicos, onde atua como um controlador homeostático de muitas funções cardiovasculares, incluindo a inibição da inflamação vascular e em condições fisiológicas é caracterizada como uma enzima benéfica contra doença (LEE *et al.*, 2016; LIND *et al.*, 2017). Em contraste, a expressão da iNOS ocorre em decorrência de estímulos inflamatórios ou microbianos. Sabe-se que diferentes estados patológicos induzem disfunção endotelial, principalmente por meio da diminuição na vasodilatação dependente do endotélio (TOUSOULIS *et al.*, 2011). Dados do nosso laboratório mostraram diminuição da resposta do tônus simpático através da diminuição pressórica ao bloqueio  $\alpha$ -adrenérgico (com prazosin) em um modelo animal de parkinsonismo induzido por 6-OHDA (ARIZA *et al.*, 2015). Investigações prévias do nosso laboratório (dados não publicados) mostraram hiporreatividade da aorta de ratos submetidos a lesão bilateral por 6-OHDA na SNpc ao agonista adrenérgico fenilefrina, provavelmente por mecanismo dependente do endotélio. No entanto, não sabemos qual o possível mecanismo para essa alteração no tônus.

## 1.6 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

O sistema renina-angiotensina (SRA) tem um importante papel no controle de funções cardiovasculares, renais e cerebrais (CERRARIO, 1990). O sistema clássico inicia-se com a conversão de pró-renina em renina, a qual converte angiotensinogênio em angiotensina I (Ang I). Esta, por meio da enzima conversora de angiotensina (ECA), é metabolizada em angiotensina II (Ang II), que é o principal efetor dessa cascata, atuando sobre os receptores do tipo I (AT1) e receptores do tipo II (AT2). Os efeitos da Ang II nos receptores AT1 incluem a vasoconstrição, liberação de catecolaminas e aldosterona, enquanto que através dos receptores AT2 a Ang II promove efeitos anti-inflamatórios e anti-fibróticos (PEREZ-LLORET *et al.*, 2017). A Ang II é o principal mediador do SRA, capaz de modular a resistência vascular periférica (RVP) e promover vasoconstrição, levando a aumento da pressão arterial (PA), e por meio do efeito indireto, aumentando a liberação de aldosterona, regula o equilíbrio hidroeletrólítico (SIMÕES E SILVA; FLYNN, 2012). Ainda, a Ang II é substrato gerador de outros peptídeos, como angiotensina III, angiotensina IV e angiotensina (1-7). Esta última possui funções frequentemente contrárias às atribuídas a Ang II (CAT; TOUYZ, 2011).

Estudos têm observado o envolvimento do sistema renina-angiotensina (SRA) na DP, sabe-se que o cérebro possui um SRA local e estudos têm sugerido a modulação de DA estriatal por meio de Ang II e seus receptores (MCKINLEY *et al.*, 2003; PAN, 2004). Dados da literatura têm mostrado que o SRA cerebral pode estar envolvido na degeneração de neurônios dopaminérgicos e na progressão da DP (MERTENS *et al.*, 2011; PEREZ-LLORET *et al.*, 2017). Administração de inibidor da ECA, o captopril, antes e após a lesão por 6-OHDA preveniu a perda de DA e reduziu o estresse oxidativo (LOPEZ-REAL *et al.*, 2005). Este efeito também observado no modelo de parkinsonismo por MPTP (MUÑOZ *et al.*, 2006; SONSALLA *et al.*, 2013). A administração crônica de Perindopril, outro inibidor da ECA, promoveu aumento de DA estriatal, tanto em animais controle como em animais induzidos ao parkinsonismo por MPTP (JENKINS *et al.*, 1999). Estudos também mostram que a inibição do receptor AT1 apresenta um papel neuroprotetor. O pré-tratamento com losartan reduziu a denervação dopaminérgica no estriado de camundongos induzidos ao parkinsonismo por MPTP (GRAMMATOPOULOS *et al.*, 2007). O candesartan, outro inibidor AT1, 7 dias antes e durante 11 dias após a lesão por 6-OHDA também foi

capaz de induzir neuroproteção em ratos Wistar (MERTENS *et al.*, 2011). Em pacientes portadores de cardiopatia isquêmica tratados com inibidores do SRA e bloqueadores dos receptores de Ang-II, foi observado um risco menor de desenvolverem a DP em relação ao grupo controle não tratado (JO *et al.*, 2022). No entanto, a participação de inibidores do SRA nos parâmetros cardiovasculares e autonômicos em modelos de parkinsonismo ainda não foram avaliados.

### 1.7 ESTRESSE OXIDATIVO

O aumento da produção de NO pode favorecer ao aumento de estresse oxidativo, o qual está envolvido nos processos neurodegenerativos da DP. Sabe-se também que o aumento de angiotensina II também pode levar ao aumento do estresse oxidativo. Diversas evidências implicam o estresse oxidativo como um fator chave da complexa cascata degenerativa nos processos de perda dopaminérgica na DP (DIAS; JUNN; MOURADIAN, 2013; TRIST; HARE; DOUBLE, 2019). O estresse oxidativo surge da desregulação da atividade redox celular, onde a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) supera a depuração por enzimas antioxidantes endógenas e chaperonas moleculares (TRIST; HARE; DOUBLE, 2019). O acúmulo de ERO após o desequilíbrio redox celular medeia o dano neuronal. Embora as ERO constituam importantes moléculas sinalizadoras que regulam a transcrição gênica fisiológica e as interações proteicas (SCHIEBER; CHANDEL, 2014), o acúmulo de ERO pode resultar em danos oxidativos a lipídios, proteínas, DNA e RNA, dependendo da localização subcelular da produção de ROS, comprometendo a função neuronal e integridade estrutural (SCHIEBER; CHANDEL, 2014). Dados coletados de pacientes com DP no estágio inicial demonstram que o aumento do estresse oxidativo é uma característica dos estágios iniciais da doença, ocorrendo antes da perda significativa de neurônios dopaminérgicos (FERRER *et al.*, 2011). Isso implica em uma geração descontrolada de ERO como um potencial fator causador da morte do neurônio dopaminérgico ao invés de ser uma resposta secundária à neurodegeneração progressiva. Ainda, o estresse oxidativo desempenha um papel central no progresso da DP de diferentes maneiras: (a) afetando a estabilidade do ácido nucleico pela oxidação do RNA, aumentando a mutação do DNA mitocondrial (mtDNA) e iniciando a síntese de translesão; (b) perturbando a homeostase da proteína acelerando a agregação de  $\alpha$ -sinucleína, agregação de parkina e dissociação de proteassoma; (c)

modulando a liberação de DA pela ativação de canais de potássio sensíveis a ATP e inativando os de receptores nicotínicos neuronais de acetilcolina (nAChRs); e (d) influenciando as autodefesas celulares a promover os efeitos citoprotetores do oncogene DJ1(DJ-1) e fosfatase e homólogo de tensina PINK1 enquanto induz a desregulação de Akt (revisado em TRIST; HARE; DOUBLE,2019).

Além do estresse oxidativo, o estresse nitrosativo também pode contribuir para a disfunção neuronal, principalmente do óxido nítrico e espécies relacionadas geradas pela nNOS e iNOS, que são superreguladas durante a neuroinflamação e geralmente são detectadas em condições relacionadas à DP (TRIST; HARE; DOUBLE, 2019). Modificações oxidativas e nitrosativas podem afetar especialmente a  $\alpha$ -syn, aumentando sua propensão à agregação, que pode ser auxiliada ainda mais por derivados dopaminérgicos e altos níveis de ferro intracelular, como normalmente detectados no SN de pacientes com DP. Espécies de  $\alpha$ -syn agregadas, especialmente oligômeros, podem desempenhar vários papéis prejudiciais durante a progressão da DP, como contribuir ainda mais para o comprometimento da respiração aeróbica mitocondrial e disfunção do sistema ubiquitina-proteassoma (TRIST; HARE; DOUBLE, 2019).

Considerando que: o modelo por 6-OHDA promove alterações cardiovasculares que tem a participação do NO; que a isoforma iNOS e a ANG II parecem estar diretamente envolvidas na perda de neurônios dopaminérgicos da SNpc, o estudo 1 teve como objetivo avaliar a participação da isoforma iNOS, por meio de tratamento agudo e crônico com inibidor seletivo e, na função cardiovascular e autonômica, assim como avaliar a reatividade vascular em anéis de aorta de ratos com parkinsonismo induzido por 6- OHDA.

Dados disponíveis na literatura demonstram que a administração de inibidores da ECA e dos receptores AT-1 promovem neuroproteção contra os processos degenerativos da DP, entretanto, carecem de estudos que avaliam a participação do SRA de maneira periférica e o envolvimento deste sistema nos parâmetros cardiovasculares. Dessa forma, o objetivo do estudo 2 foi avaliar o envolvimento da Ang II em ratos com infusão bilateral de 6-OHDA. Além disso, como a relação entre estresse oxidativo e DP é avaliado principalmente de maneira central e que dados da literatura demonstram alterações no sistema cardiovascular em pacientes com DP, também investigamos a presença de estresse oxidativo nos órgãos relacionados ao sistema cardiovascular.

## 2. JUSTIFICATIVA

Os distúrbios neurológicos são a principal fonte de incapacidade em todo o mundo, e o distúrbio neurológico que mais cresce no mundo é a doença de Parkinson. De 1990 a 2015, o número de pessoas com doença de Parkinson dobrou para mais de 6 milhões. Impulsionado principalmente pelo envelhecimento, esse número deverá dobrar novamente para mais de 12 milhões até 2040. A DP é um distúrbio complexo que afeta diferentes sistemas no nosso organismo, tendo grande impacto na qualidade de vida do indivíduo com a DP. Além dos sintomas motores, os sintomas da disautonomia, especialmente nos estágios avançados da doença, são muitas vezes responsáveis por limitações e contribui para uma má qualidade de vida dos indivíduos acometidos pela doença.

Como há evidências que sugerem a participação do NO e do SRA no SNC na DP, e que há ainda poucos estudos na literatura que avaliam de forma periférica o envolvimento desses sistemas nas disfunções cardiovasculares, a compreensão da fisiopatologia cardiovascular na PD é importante visto que esse conhecimento é necessário para o avanço da pesquisa de novos tratamentos para a melhoria da qualidade de vida desses pacientes, além do fato de que, poderá elucidar um possível diagnóstico precoce da DP.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o envolvimento da isoforma da iNOS e do sistema renina angiotensina nos efeitos cardiovasculares e autonômicos em ratos acordados, consequentes ao parkinsonismo induzido por 6-OHDA.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

##### 3.2.1 Estudo 1:

- Avaliar o envolvimento do NO por meio de tratamento com inibidor específico da iNOS sobre os parâmetros cardiovasculares e autonômicos em ratos 6-OHDA e Sham;
- Avaliar a expressão das isoformas da NOS (eNOS, nNOS e iNOS) na aorta torácica de ratos 6-OHDA e Sham;
- Investigar os possíveis mecanismos envolvidos na hiporreatividade a fenilefrina na aorta torácica de ratos 6-OHDA;

##### 3.2.2 Estudo 2:

- Avaliar o envolvimento da Angiotensina II, por meio de tratamento com inibidor de receptor AT1 ou inibidor da ECA, sobre os parâmetros cardiovasculares e autonômicos em ratos 6-OHDA e Sham;
- Analisar os parâmetros de estresse oxidativo na aorta torácica, aorta abdominal, coração e músculo gastrocnêmio em ratos 6-OHDA e Sham.

Esta tese foi dividida em 2 estudos que serão descritos na forma de artigo científico.

**Estudo 1:** Participação da isoforma iNOS nas disfunções cardiovasculares de ratos machos submetidos ao parkinsonismo por 6-OHDA

**Estudo 2:** Envolvimento do sistema renina angiotensina na função cardiovascular de ratos machos induzidos ao parkinsonismo por 6-OHDA

## 4. ESTUDOS

### 4.1 ESTUDO 1: Participação da isoforma iNOS nas disfunções cardiovasculares de ratos machos submetidos ao parkinsonismo por 6-OHDA

#### 4.1.1 Introdução

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum e estima-se que a DP afeta 1% da população acima de 60 anos (LAU; BRETELER, 2006). É responsável por alterações no estado físico, social, psicológico e funcional dos indivíduos. A DP é caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra pars compacta (SNpc), que é responsável pela maior parte das disfunções motoras relacionadas a doença (BLANDINI, 2013; MOORE *et al.*, 2005). Os sintomas cardinais motores envolvem tremor, rigidez, bradicinesia e instabilidade postural, mas o quadro clínico apresenta outros sintomas não-motores, que são bastante relevantes e impactantes no quadro clínico do paciente (BALESTRINO; SCHAPIRA, 2020; RODRIGUEZ-OROZ *et al.*, 2009; SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017; SIAN *et al.*, 1999). Dentre eles estão as alterações cardiovasculares: hipotensão arterial ortostática (HO), hipotensão arterial pós-prandial, alteração da variabilidade da pressão arterial (PA) e, possivelmente, fadiga e intolerância ao exercício físico (JAIN; GOLDSTEIN, 2012; NICARETTA; ROSSO; MATTOS, 2011; SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017).

Um dos modelos clássicos para indução de parkinsonismo é por meio da lesão com a neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) diretamente na SNpc ou no estriado (ZIGMOND; SMEYNE, 2014). Ariza e colaboradores mostraram que em ratos com lesão bilateral por 6-OHDA na SNpc, há diminuição nos parâmetros basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), os quais são acompanhados de redução da modulação simpática na pressão arterial sistólica (PAS) (ARIZA *et al.*, 2015). Também, as respostas ao barorreflexo e ao quimiorreflexo estão alteradas nestes animais (ARIZA *et al.*, 2015). No modelo de lesão por 6-OHDA foi observado menor sensibilidade baroreflexa e diminuição do número de neurônios envolvidos no controle cardiovascular no tronco encefálico (FALQUETTO *et al.*, 2017). Dessa forma, a utilização do modelo de parkinsonismo por 6-OHDA, pode ser uma ferramenta útil para se estudar os aspectos cardiovasculares na DP.

O óxido nítrico (NO) está envolvido nos processos que levam a

neurodegeneração na DP em humanos e em modelos experimentais (BARTHWAL, M.; SRIVASTAVA; DIKSHIT, 2001; DEL BEL *et al.*, 2002; MOLINA *et al.*, 1998; YUSTE *et al.*, 2012). O NO atua em diversos processos fisiológicos, porém em situações patológicas, grandes quantidades de NO são produzidas e são potencialmente tóxicas. O NO é produzido por meio das sintases de óxido nítrico (NOS), que catalisam a formação de NO a partir de L-arginina, O<sub>2</sub> e NADPH. Há diferentes isoformas para a produção de NO: NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS), NOS mitocondrial (mtNOS) e NOS induzível (iNOS) (GIULIVI, 2003; MOLINA *et al.*, 1998). A isoforma nNOS e a eNOS são constitutivamente expressas e são dependentes de cálcio. Em contraste, a iNOS é independente de cálcio e é expressa sob condições patológicas em diversas células relacionadas ao sistema imune (DAFF, 2010; MOLINA *et al.*, 1998).

Há várias evidências, tanto em humanos quanto em modelos animais, que mostram o envolvimento do NO e das NOS na etiologia da DP. A administração de inibidores da NOS, como o Nw-nitro-arginina-metil-ester (L-NAME) atenua a queda de DA e de seus metabólitos em ratos com injeção unilateral de 6-OHDA (BARTHWAL, M.; SRIVASTAVA; DIKSHIT, 2001). A administração de 7-Nitroindazol (7-NI) ou de S-methylisothiurea (SMT), inibidores da nNOS e iNOS respectivamente, foram capazes de proteger dos efeitos neurotóxicos da lesão por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), sugerindo então a participação do NO produzido por essas vias na DP (ARAS *et al.*, 2014b; DI MONTE *et al.*, 1996; SCHULZ; FALKENBURGER, 2004). A administração de GW274150 ((2-((1-iminoethyl)amino)ethyl)-L-homocysteine - inibidor seletivo da iNOS) após lesão unilateral por 6-OHDA atenuou de forma significativa a perda de DA no estriado de ratos Sprague-Dawley (BROOM *et al.*, 2011). Também, a degeneração de neurônios dopaminérgicos leva a diminuição das concentrações de nNOS na substância negra de ratos com lesão por injeção unilateral de 6-OHDA, enquanto a administração de MPTP em camundongos promove a elevação da iNOS (CZARNECKA *et al.*, 2013; LIBERATORE *et al.*, 1999). Em humanos, foi encontrado aumento da expressão de iNOS na SNpc em amostras cerebrais post-mortem de indivíduos com DP (HUNOT *et al.*, 1996). Sendo assim, evidências indicam que as NOS podem participar da neurodegeneração de neurônios dopaminérgicos em modelos animais de DP. Portanto, o uso de inibidores de NOS no tratamento da DP vem sendo discutido (BROOM *et al.*, 2011; MARTINS-PINGE; JAGER; CAMPOS, 2022).

A maior parte dos estudos com modelos de parkinsonismo que avaliaram o envolvimento do NO, avaliaram as concentrações de NO cerebral. Em relação ao NO periférico existem poucos dados. Há redução na expressão da nNOS entérica de animais induzidos unilateralmente por 6-OHDA (BLANDINI, 2013). Nosso grupo de estudos, observou diferenças nas concentrações tissulares de NO em animais sedentários ou submetidos a treinamento físico antes da lesão por 6-OHDA, estando aumentado na aorta de animais 6-OHDA comparado aos seus controles (DE JAGER, L. *et al.*, 2018). No entanto, ainda não se sabe qual isoforma estaria participando dessas alterações.

O NO também apresenta importantes propriedades vasodilatadoras, anti-inflamatórias e antioxidantes que desempenha um papel central na manutenção da homeostase vascular (CYR *et al.*, 2020). No endotélio, as isoformas atuam de maneiras diferentes. A atividade da eNOS é iniciada em resposta a estímulos físicos e químicos, onde atua como um controlador homeostático de muitas funções cardiovasculares, incluindo a inibição da inflamação vascular e em condições fisiológicas é caracterizada como uma enzima benéfica contra doença (LIND *et al.*, 2017; YUN *et al.*, 2011). Em contraste, a expressão da iNOS ocorre em decorrência de estímulos inflamatórios ou microbianos. Sabe-se que diferentes estados patológicos induzem disfunção endotelial, principalmente por meio da diminuição na vasodilatação dependente do endotélio (TOUSOULIS *et al.*, 2011). Dados do nosso laboratório mostraram diminuição da resposta do tônus simpático através da diminuição pressórica ao bloqueio  $\alpha$ -adrenérgico (com prazosin) em um modelo animal de parkinsonismo induzido por 6-OHDA (ARIZA *et al.*, 2015). No entanto, não sabemos se essa alteração no tônus se deve a um efeito central ou periférico. Neste estudo testaremos a hipótese de que a diminuição do tônus simpático em modelo de parkinsonismo em ratos tenha sua origem periféricamente e iremos avaliar se há envolvimento da iNOS nessa alteração de tônus.

Dessa forma, considerando que: o modelo por 6-OHDA promove alterações cardiovasculares que tem a participação do NO; que a isoforma iNOS parece estar diretamente envolvida na perda de neurônios dopaminérgicos da SNpc; este estudo tem como objetivo avaliar a participação da isoforma iNOS, por meio de inibidor seletivo, na função cardiovascular e autonômica, assim como avaliar a reatividade vascular reatividade vascular em anéis de aorta de ratos com parkinsonismo induzido por 6- OHDA.

#### 4.1.2 Materiais e Métodos

##### Aprovação Ética e Animais

Todos os protocolos experimentais estão de acordo com a Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (CONCEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (nº do processo: 174/2018). Foram utilizados ratos Wistar machos adultos, pesando entre 280-320g no início do protocolo. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura e ventilação adequados ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), em um ciclo claro-escuro de 12h. Os animais tinham água e ração ad libitum. Os experimentos foram conduzidos durante a fase clara do ciclo.

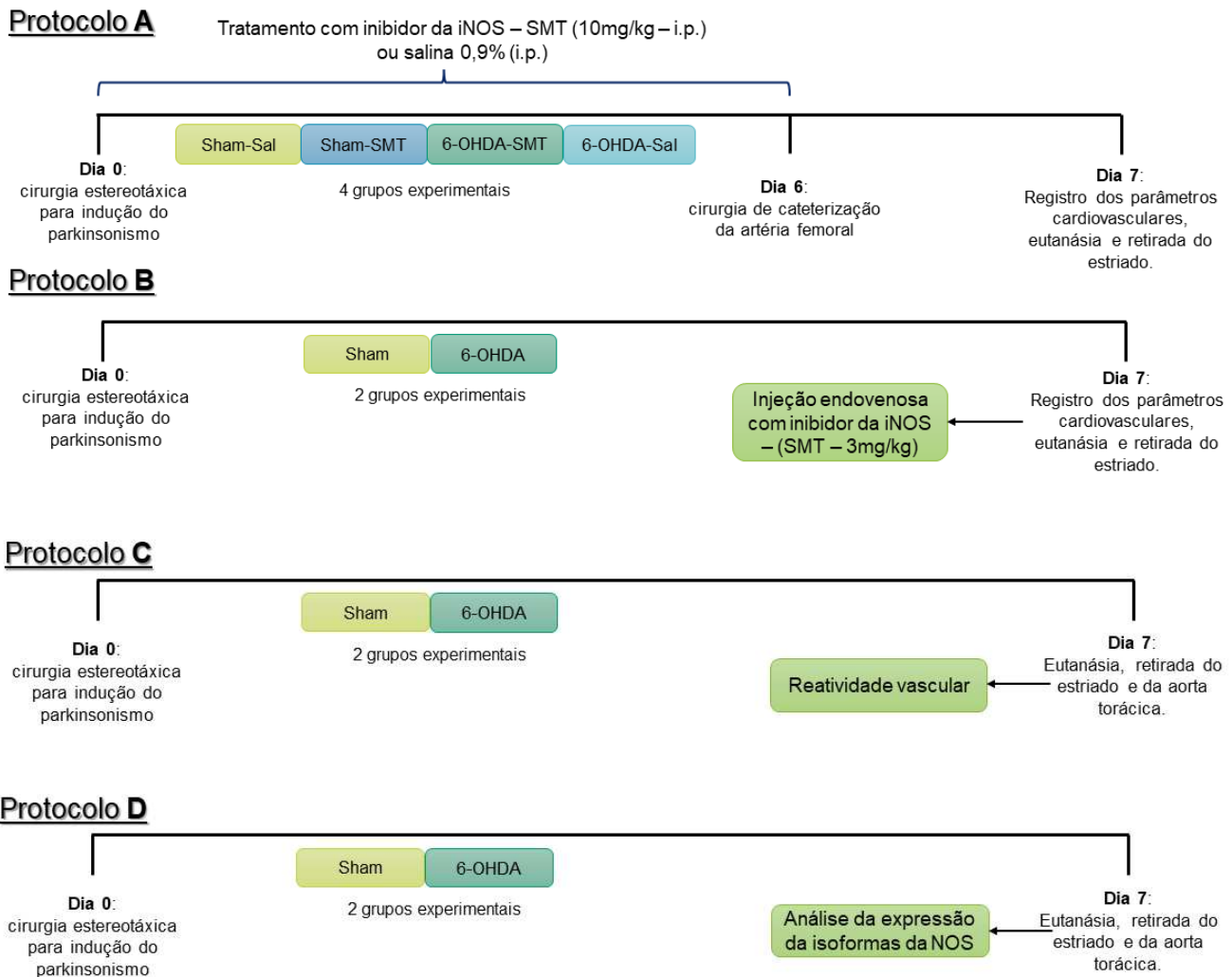
##### Protocolos experimentais

Para realização deste estudo diferentes protocolos foram utilizados. Parte dos animais foram utilizados para análise dos parâmetros cardiovasculares e outra parte para análise da reatividade vascular. Todos os animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica para indução do parkinsonismo.

Os animais foram divididos nos seguintes protocolos:

- A) tratamento com inibidor da iNOS – S-methylisothiourea (SMT - 10 mg/kg – ip) (GHAYYOOMI *et al.*, 2015; IRAVANI *et al.*, 2002), durante 7 dias, seguido de registro dos parâmetros basais. Grupo controle: Salina estéril 0.9%. Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: Sham-Salina; Sham-SMT; 6-OHDA-Salina e 6-OHDA-SMT.
- B) Injeção endovenosa do inibidor da iNOS – S-methylisothiourea (SMT - 3 mg/kg – ip) (COSTA *et al.*, 2016; GHAYYOOMI *et al.*, 2015; IRAVANI *et al.*, 2002), durante o registro dos parâmetros basais de PAM e FC. Os animais foram divididos em 2 grupos experimentais: Sham e 6-OHDA.
- C) Avaliação da reatividade vascular em anéis de aorta com endotélio. Os animais foram divididos em 2 grupos experimentais: Sham e 6-OHDA.
- D) Análise da expressão das isoformas da NOS da aorta torácica. Os animais foram divididos em 2 grupos experimentais: Sham e 6-OHDA.

O delineamento experimental para os protocolos pode ser encontrado na Figura 2.



**Figura 2.** Representação esquemática dos protocolos experimentais.

### Indução do parkinsonismo por 6-OHDA

Para a indução do parkinsonismo, todos animais de ambos os protocolos foram submetidos à anestesia com Cloridrato de Cetamina e Cloridrato de Xilasina (100 e 6,7 mg/kg, i.p.; Ceva Santé Animale, São Paulo, Brasil). Em seguida, foram colocados em um aparelho estereotático (David Kopf), e perfurações no crânio dos animais foram realizadas com uma broca de baixa rotação, permitindo a microinfusão da neurotoxina 6-OHDA (6 mg/mL em 0,2% de ácido ascórbico em solução salina estéril) diretamente na SNpc. Para tal procedimento, as seguintes coordenadas estereotáticas foram utilizadas como referência, 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; WATSON, 1998). A microinfusão foi realizada com o auxílio de uma agulha conectada a um tubo de polietileno adaptado a uma microseringa de 10  $\mu$ l (Hamilton, EUA) encaixada em uma bomba de infusão. Após a infusão da toxina (3 minutos), a agulha permanecia no local por mais 2 minutos para evitar o refluxo da substância. Em seguida, a pele do escalpo foi suturada e foram colocados em gaiolas com ambiente aquecido para recuperação da anestesia e posteriormente encaminhados à sala de manutenção dos animais. O grupo Sham foi submetido ao mesmo procedimento cirúrgico, porém com a infusão da solução veículo. Como medida profilática, após a cirurgia os animais receberam 24.000 UI de Pentabiótico Veterinário (Fontoura-Wyeth, Brasil) aplicados em 0,2 mL (i.m) (ARIZA *et al.*, 2010).

#### Tratamento crônico de 7 dias com SMT 10mg/kg (Protocolo A)

Os animais do protocolo A, a partir do dia da cirurgia estereotáxica (dia 0) até o dia da cateterização (dia 6) receberam injeção intraperitoneal (ip) de salina 0,9% ou do inibidor seletivo da iNOS - SMT na concentração de 10mg/kg. As cirurgias de estereotaxia foram realizadas no período da manhã e o tratamento com veículo ou SMT foi realizado no período da tarde entre 16h e 18h. Os animais foram pesados diariamente.

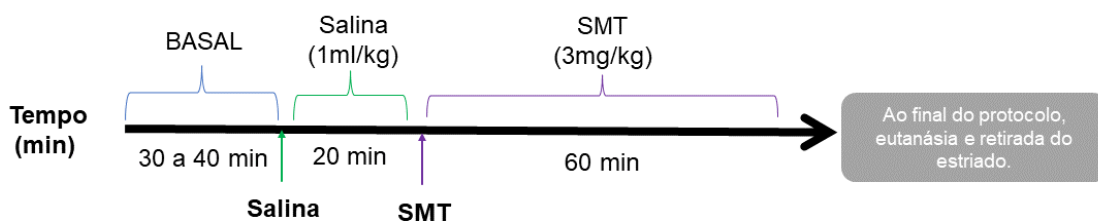
#### Registro dos parâmetros cardiovasculares

Após 6 dias da cirurgia estereotáxica e 24 horas antes dos registros, os animais foram novamente submetidos à anestesia com Cloridrato de Cetamina e Cloridrato de Xilasina (100 e 6,7 mg/kg, i.p.; Ceva Santé Animale, São Paulo, Brasil) e cateteres de tygon foram inseridos na artéria femoral. O cateter foi exteriorizado na região dorsal do animal para registrar a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) no estado consciente. No dia seguinte, os parâmetros basais foram obtidos após um período de adaptação do animal ao ambiente. A pressão arterial média (PAM) e FC foram registradas por meio de um transdutor de pressão (MLT0830) acoplado ao sistema de aquisição de dados Powerlab system4/20T (ADInstruments®). Estas gravações foram realizadas com os animais não anestesiados e movendo-se

livremente. Após o registro, os animais foram submetidos a eutanásia por decapitação e amostras do tecido cerebral foram isoladas. O estriado de cada animal foi dissecado manualmente e pesado. As amostras foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até posterior análise.

Registro dos parâmetros cardiovasculares com tratamento agudo de SMT 3mg/kg (Protocolo B)

Outro grupo de animais, divididos em grupo Sham e 6-OHDA, foram submetidos a cirurgia estereotáxica para infusão bilateral de 6-OHDA. Após 6 dias, foram submetidos a cateterização de artéria e veia femoral descritas anteriormente. Após 24 horas da cateterização, os parâmetros cardiovasculares basais foram obtidos durante pelo menos 30 minutos antes do início do protocolo experimental. Durante o registro, os animais não estavam anestesiados. Conforme esquema da figura 3, após o registro basal, uma injeção in bolus de salina 0,9% (1mL/Kg) foi administrada, seguida após 20 minutos de uma injeção in bolus de SMT (3mg/kg), um inibidor seletivo das isoforma induzível ou iNOS (CASTARDO-DE-PAULA *et al.*, 2017). Após 1h de registro, os animais foram eutanasiados por decapitação e amostras do tecido cerebral foram isoladas. O estriado de cada animal foi dissecado manualmente e pesado. As amostras foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até posterior análise. A representação do protocolo experimental para o registro dos parâmetros está na Figura 3.



**Figura 3.** Representação do protocolo experimental para o registro dos parâmetros cardiovasculares.

Análise Espectral da pressão arterial sistólica (PAS) e intervalo de pulso (IP)

A partir dos registros de pressão arterial pulsátil (PAP) adquiridos pelo software 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. Os dados de PAS e de IP no domínio da frequência foram convertidos para o programa computacional Cardioseries v2.4 (<http://www.danielpenteado.com>), por meio do qual a análise da variabilidade foi realizada. 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 estacionaridade dos valores de IP e PAS de cada segmento foi examinada visualmente e os segmentos com artefatos ou transientes foram excluídos. Os segmentos 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 ( $\text{ms}^2$  ou  $\text{mmHg}^2$ ) e normalizadas (nu). 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 (TEZINI; DIAS; SOUZA, 2013).

#### Análise do barorreflexo espontâneo

A sensibilidade barorreflexa (SBR) foi avaliada no domínio da frequência por meio do Método da Sequência. Utilizando-se o programa computacional CardioSeries v2.4 (<http://www.danielpenteado.com>), séries temporais batimento-a-batimento com valores de IP e PAS foram utilizados para análise da SBR. As séries temporais foram analisadas em busca de sequências de quatro ou mais batimentos nos quais aumentos progressivos da PAS foram acompanhados por aumentos progressivos do IP ou reduções progressivas da PAS foram acompanhadas por reduções progressivas do IP. Para detecção das alterações da PAS e do IP foram utilizados os limiares de 0 mmHg e 0 ms, respectivamente. Após 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.

#### *Avaliação da função vascular da aorta torácica isolada à fenilefrina, indometacina e SMT*

Para o protocolo C, a avaliação da reatividade da aorta torácica com o objetivo de esclarecer os mecanismos envolvidos com hiporreatividade à fenilefrina (dados não publicados) foi realizado. Os animais foram divididos em dois grupos: Sham e 6-OHDA. Após 7 dias da cirurgia estereotáxica, os ratos foram submetidos a eutanásia por decapitação e amostras do tecido cerebral foram isoladas. E, após toracotomia, a porção torácica da aorta foi removida, dissecada e seccionada em quatro anéis transversais (5 mm de comprimento), nos quais o endotélio foi preservado (Endo+). Conforme descrito anteriormente, após a estabilização, os anéis de aorta foram encubados com solução de cloreto de potássio (90 mM) por 15 min para avaliar a viabilidade muscular. A integridade do endotélio vascular também foi testada após novo período de estabilização, adicionando 0,1  $\mu$ M de acetilcolina (ACh) nos anéis de aorta previamente contraídos com 0,3  $\mu$ M de fenilefrina (Fenil). O endotélio foi considerado intacto quando o relaxamento induzido pela ACh foi maior que 70% em relação a contração, e removido, quando o relaxamento foi menor que 5%.

Para investigar os mecanismos envolvidos na disfunção endotelial, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas CCEC para Fenil (agonista  $\alpha$ 1-adrenérgico - 1nM-30 $\mu$ M, em anéis Endo+ pré-incubados com indometacina (inibidor não seletivo das cicloxigenases, 1  $\mu$ M), L-NAME (inibidor não seletivo das enzimas óxido nítrico sintases (NOS), 30  $\mu$ M) e SMT (inibidor seletivo da NOS induzível, 30  $\mu$ M).

As curvas entre os grupos Sham e 6-OHDA foram comparadas através da resposta máxima (Rmax) para cada droga e da pD2, que corresponde ao -log da concentração do agonista necessária para alcançar 50% da Rmax. Ambas foram calculadas utilizando uma análise de regressão não-linear (GraphPad Prism software, USA).

#### *Determinação dos níveis de DA por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)*

As amostras do estriado dissecado foram suspensas com ácido perclórico 0,1M com 0,02% de metabissulfito de sódio como antioxidante, em concentração de 5 µL/mg de material cerebral. Após sonicação, os homogenatos foram centrifugados a 13.000 rpm durante 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi injetado em uma estação de cromatografia líquida de alto desempenho com detector eletroquímico. Esta determinação permite confirmar a eficácia da lesão por 6-OHDA na SNPc, caracterizada por diminuição na concentração de DA.

*Expressão das isoformas da eNOS, nNOS e iNOS na aorta torácica de ratos com parkinsonismo por 6-OHDA através de transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR)*

O RNA total foi extraído de aorta torácica após 7 dias de indução de parkinsonismo por 6-OHDA usando o reagente TRIzol®. O RNA total foi isolado de acordo com as instruções do fabricante. A pureza do RNA total foi medida com um espectrofotômetro e a razão de absorção do comprimento de onda (260/280 nm) ficou entre 1,8 e 2,0 para todas as preparações. A transcrição reversa do RNA total para cDNA e qPCR foi realizada utilizando o sistema GoTaq® 2-Step RT-qPCR (Promega) e primers específicos (Invitrogen). Os primers utilizados foram *Gapdh-forward*: 5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGA ATG-3'. *Gapdh-reverse*: 5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3'. *iNOS-sense*: GGATATCTTCGGTGCGGTCTT. *iNOS-antisense*: CTGTA ACTCTTCTGGGTGTCAGA. *nNOS-sense*: CGCTACGCGGGCTACAAGCA. *nNOS-antisense*: GCACGTCGAAGCGGCCTCTT. *eNOS-forward*: 5':-CGACTATCCTGTATGGCTCTGAG-3'. *eNOS-reverse*: 5':-GATCCCCATTGCCAAATGTGC-3'. O nível de mRNA da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*) foi usado como gene de referência para normalizar os dados. Os dados brutos foram normalizados para a expressão de *Gapdh* e analisados pelo método 2- $\Delta\Delta C_t$  calculando a expressão relativa ao controle salina.

*Análise estatística*

Os resultados foram avaliados em relação a normalidade dos dados por meio do teste Shapiro Wilk. Para variáveis que apresentaram distribuição normal, análise

paramétrica foi conduzida e os valores são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para os dados que apresentaram distribuição normal, foi utilizada ANOVA 2 vias, seguido de pós-teste de Tukey quando houve interação entre as variáveis. Para dados que não passaram na normalidade, foi realizada a transformação dos dados para log. Se após a transformação, os dados foram considerados não paramétricos, comparações múltiplas foram realizadas usando o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn e os valores foram representados como a mediana  $\pm$  valores de intervalo interquartil. Para as curvas dose resposta, ANOVA 2 vias para medidas repetidas foi utilizado.

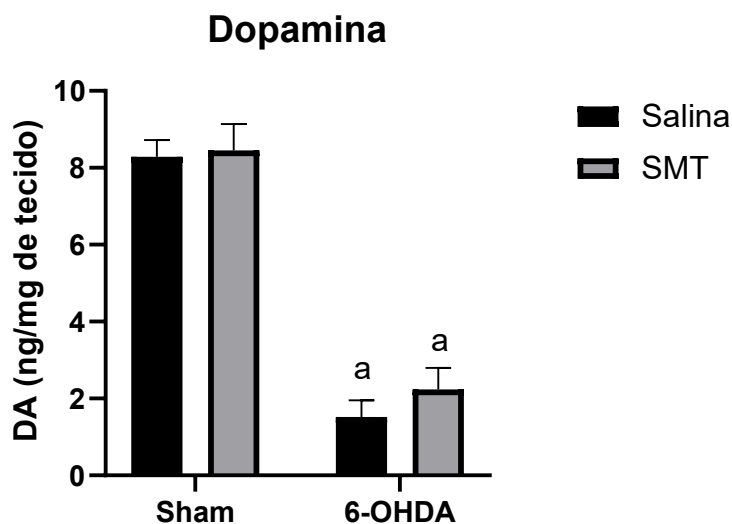
Os dados referentes a reatividade vascular foram submetidos a uma análise exploratória para avaliar a distribuição normal (Shapiro-Wilk test e Kolmogorov-Smirnova test) e homogeneidade de variância (Levene's test) dos dados. Os mecanismos envolvidos com a hiporreatividade à fenilefrina em anéis com endotélio de machos 6-OHDA foram analisados por ANOVA 1 via, seguida de teste de Tukey.

### 4.1.3 RESULTADOS

#### 4.1.3.1 Protocolo A - Tratamento de 7 dias com SMT ou solução veículo, com ou sem lesão por 6-OHDA

##### Determinação das concentrações de DA estriatal após o tratamento de 7 dias com SMT (10mg/kg)

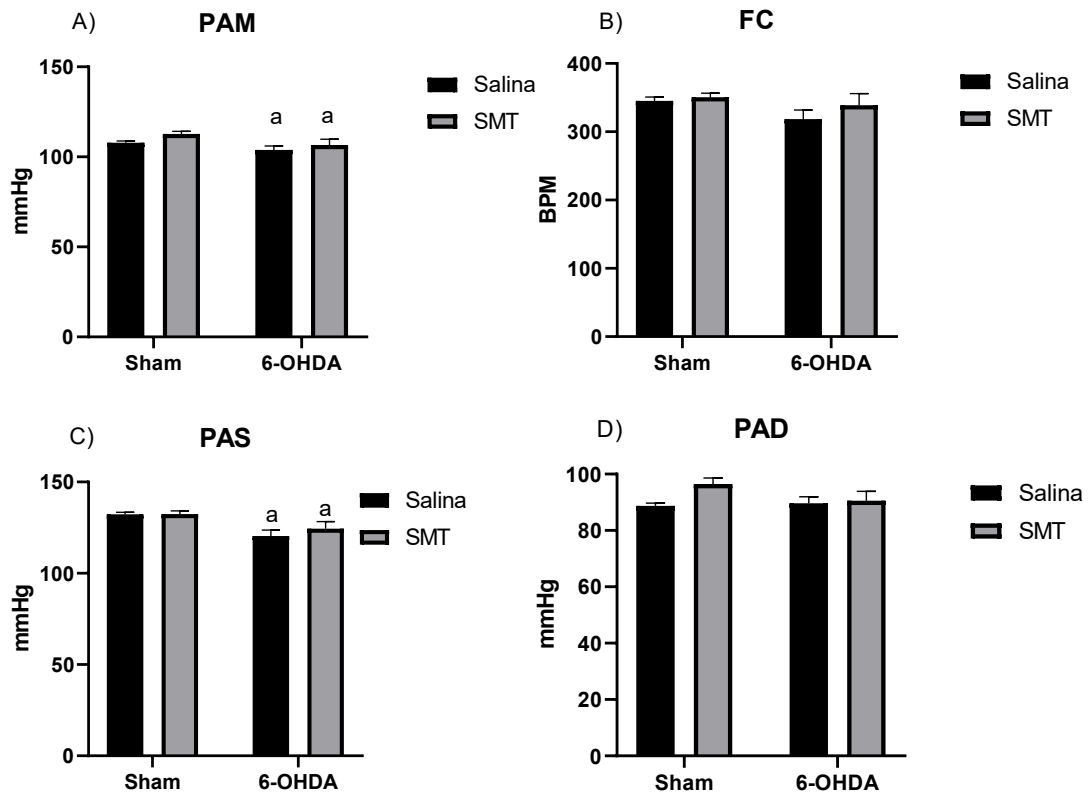
Na análise neuroquímica das concentrações de DA houve efeito da indução do parkinsonismo ( $F(1, 26) = 151,0; p < 0,0001$ ), mas não houve efeito do tratamento com SMT ( $F(1, 26) = 0,7050; p = 0,4088$ ). Também, não houve interação entre a cirurgia de indução do parkinsonismo e o tratamento com SMT ( $F(1, 26) = 0,2669; p = 0,6098$ ). A análise neuroquímica mostrou que a concentração de dopamina após 7 dias de lesão foi menor nos grupos 6-OHDA-Salina e 6-OHDA-SMT em relação aos grupos Sham-Salina e Sham-SMT (Sham-Sal:  $8,29 \pm 0,44$ ; 6-OHDA-Sal:  $1,52 \pm 0,44$ ; Sham-SMT:  $8,46 \pm 0,68$ ; 6-OHDA-SMT:  $2,23 \pm 0,56$ ), independente do tratamento com SMT.



**Figura 4.** Concentração de dopamina (DA) no estriado após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou infusão de 6-OHDA e tratamento com SMT (10mg/kg i.p.) ou salina (0,9%, i.p.). Os dados foram analisados por ANOVA 2 vias e estão representados como média  $\pm$  EPM. Sham-Salina n = 8; 6-OHDA-Salina n = 8; Sham-SMT n = 7; 6-OHDA-SMT = 7. **a** = efeito da lesão de parkinsonismo;  $p < 0,0001$  vs Sham.

Análise dos parâmetros cardiovasculares basais de animais tratados com SMT ou veículo, com ou sem lesão por 6-OHDA

A análise dos valores basais de PAM (Fig. 5A; Sham-Sal:  $107,8 \pm 0,96$ ; 6-OHDA-Sal:  $103,9 \pm 2,19$ ; Sham-SMT:  $112,7 \pm 1,49$ ; 6-OHDA-SMT:  $106,5 \pm 3,28$ ) mostram que não houve interação entre a indução de parkinsonismo e o tratamento com o inibidor da iNOS, mas houve efeito da indução de parkinsonismo ( $F(1, 26) = 5,690$ ;  $p=0,0246$ ), sendo assim, ambos grupos 6-OHDA são diferentes do Sham. Em relação a FC (Fig. 5B; Sham-Sal:  $345,2 \pm 5,61$ ; 6-OHDA-Sal:  $318,3 \pm 13,54$ ; Sham-SMT:  $350,4 \pm 6,19$ ; 6-OHDA-SMT:  $338,9 \pm 16,97$ ) e PAD (Fig. 5D; Sham-Sal:  $88,72 \pm 0,99$ ; 6-OHDA-Sal:  $89,59 \pm 2,34$ ; Sham-SMT:  $96,45 \pm 2,20$ ; 6-OHDA-SMT:  $90,58 \pm 3,33$ ), não houve interação e não houve efeito do parkinsonismo e do tratamento com SMT. Para a PAS (Fig. 5C; Sham-Sal:  $132,3 \pm 1,10$ ; 6-OHDA-Sal:  $120,4 \pm 3,26$ ; Sham-SMT:  $132,4 \pm 1,81$ ; 6-OHDA-SMT:  $124,4 \pm 3,381$ ), não houve interação entre as variáveis, houve efeito da indução de parkinsonismo ( $F(1, 26) = 13,49$ ;  $p=0,0011$ ) e os grupos 6-OHDA-Sal e 6-OHDA SMT apresentam valores de PAS menores que os seus controles Sham.

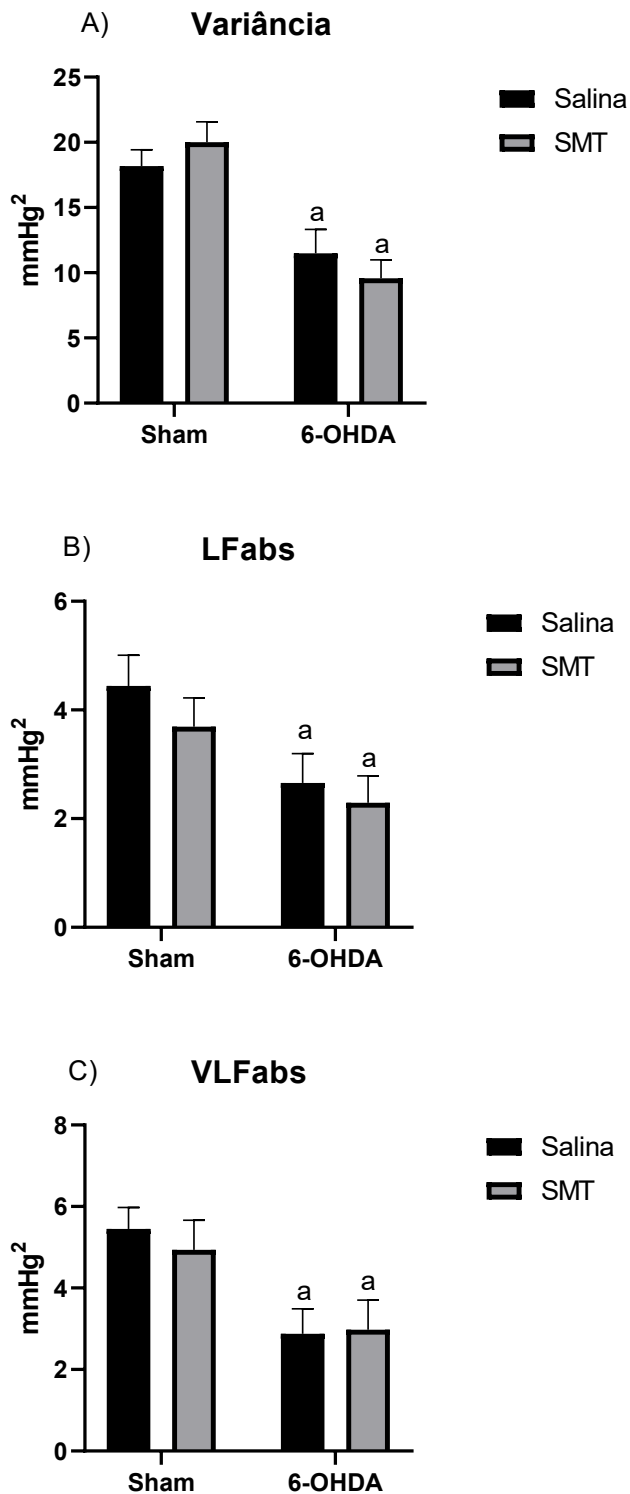


**Figura 5.** Parâmetros basais nos grupos após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou infusão de 6-OHDA e tratamento com SMT (10mg/kg i.p) ou salina (0,9%, i.p.). (A) Pressão arterial média; (B) Frequência cardíaca; (C) Pressão arterial sistólica e (D) Pressão arterial diastólica. Os dados foram analisados por ANOVA 2 vias e estão representados como média  $\pm$  EPM. Sham-Sal n = 8; 6-OHDA-Sal n = 8; Sham-SMT n = 7; 6-OHDA-SMT = 7. **a** = efeito da lesão de parkinsonismo;  $p < 0,05$  vs Sham.

### Análise da variabilidade da PAS

A análise espectral da PAS (Fig. 6) foi realizada para investigar as influências autonômicas nos parâmetros cardiovasculares. A análise espectral da PAS é composta pela análise da variância, componente LF absoluto (LFabs) e o componente VLF absoluto (VLFabs).

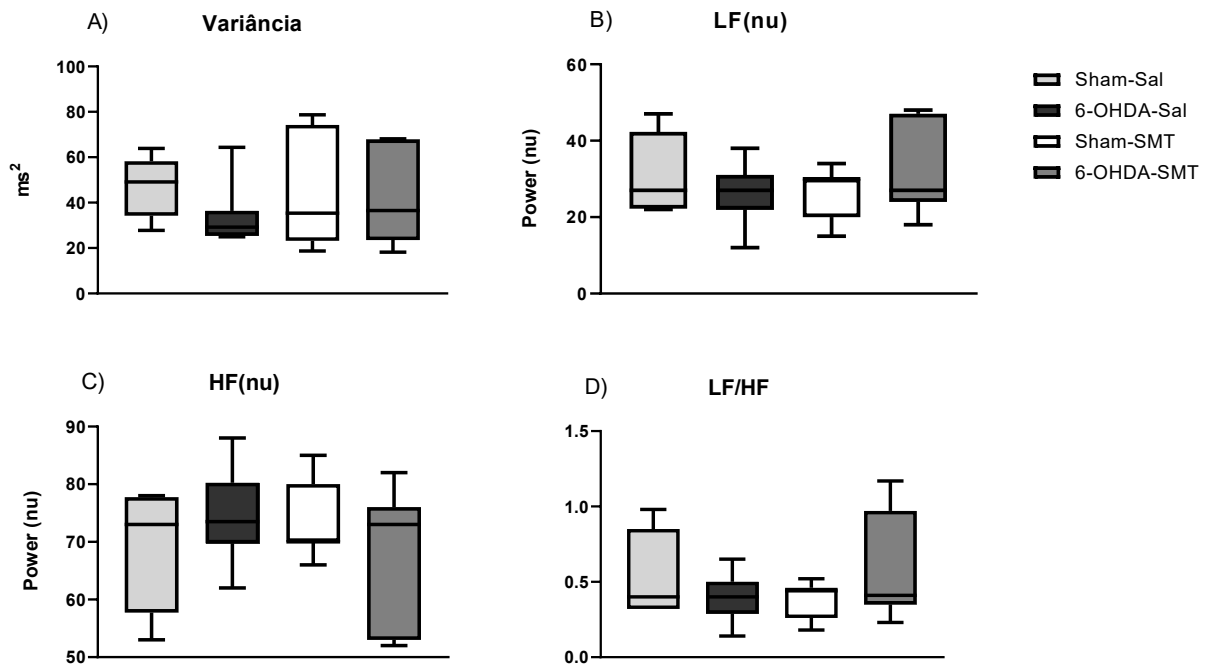
Para as três variáveis analisadas, não houve interação entre a indução do parkinsonismo com o tratamento com inibidor da iNOS e houve somente efeito da indução de parkinsonismo (PAS-Variância -  $F(1, 26) = 30,62$ ;  $p < 0,0001$ ; PAS-Lfabs -  $F(1, 26) = 8,719$  -  $p = 0,0066$ ; PAS VLF-abs -  $F(1, 26) = 12,30$ ;  $p = 0,0017$ ). Para as três variáveis, o grupo 6-OHDA apresenta menores valores de variância (Fig. 6A - Sham-Sal:  $18,17 \pm 1,26$ ; 6-OHDA-Sal:  $11,50 \pm 1,83$ ; Sham-SMT:  $20,01 \pm 1,57$ ; 6-OHDA-SMT:  $9,57 \pm 1,42$ ); componente Lfabs (Fig. 6B; Sham-Sal:  $4,44 \pm 0,57$ ; 6-OHDA-Sal:  $2,65 \pm 0,54$ ; Sham-SMT:  $3,70 \pm 0,53$ ; 6-OHDA-SMT:  $2,29 \pm 0,50$ ) e componente VLFabs (Sham-Sal:  $5,54 \pm 0,53$ ; 6-OHDA-Sal:  $2,88 \pm 0,61$ ; Sham-SMT:  $4,94 \pm 0,72$ ; 6-OHDA-SMT:  $2,97 \pm 0,73$ ) em relação aos seus controles, independente do tratamento.



**Figura 6.** Análise espectral da pressão arterial sistólica (PAS) após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou infusão de 6-OHDA e tratamento com SMT (10mg/kg i.p) ou salina (0,9%, i.p.). (A) Variância; (B) LFabs e (C) VLFabs. Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias seguido de pós-teste de Tukey e estão representados como média  $\pm$  EPM. Sham-Sal n = 8; 6-OHDA-Sal n = 8; Sham-SMT n = 7; 6-OHDA-SMT = 7. PAS = Pressão arterial sistólica; LF = baixa frequência; HF = alta frequência; VLF = muito baixa frequência. **a** = efeito da lesão de parkinsonismo;  $p < 0,05$  vs Sham.

### Análise da variabilidade do IP

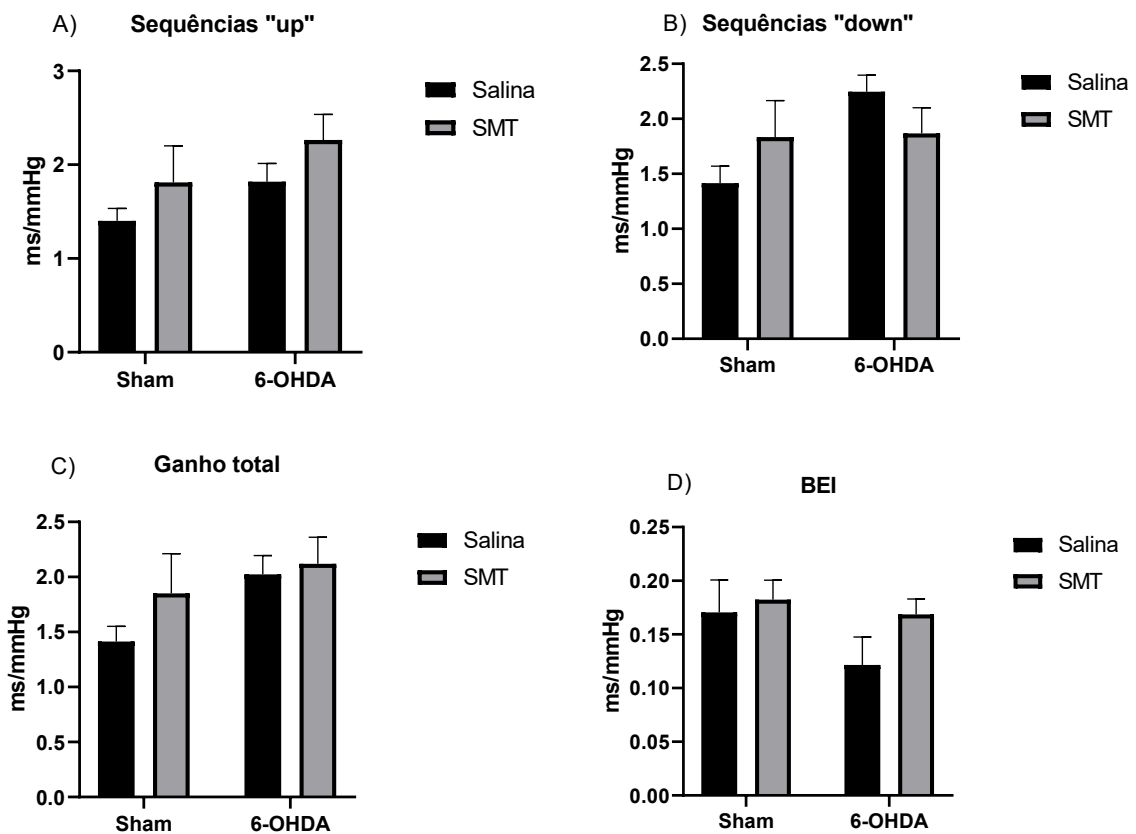
A modulação autonômica cardíaca foi avaliada por análise espectral de IP (Fig. 7). Foram avaliadas a variância (Fig. 7A - Sham-Sal:  $47,37 \pm 4,53$ ; 6-OHDA-Sal:  $33,79 \pm 4,63$ ; Sham-SMT:  $45,76 \pm 9,05$ ; 6-OHDA-SMT:  $43,46 \pm 8,59$ ), componente LF (Fig. 7B - Sham-Sal:  $30,63 \pm 3,65$ ; 6-OHDA-Sal:  $26,29 \pm 3,02$ ; Sham-SMT:  $26,29 \pm 2,53$ ; 6-OHDA-SMT:  $31,57 \pm 4,35$ ), componente HF (Fig. 7C - Sham-Sal:  $69,38 \pm 3,56$ ; 6-OHDA-Sal:  $74,63 \pm 2,77$ ; Sham-SMT:  $73,71 \pm 2,53$ ; 6-OHDA-SMT:  $68,43 \pm 4,34$ ) e a relação dos componentes LF e HF (Fig. 7D - Sham-Sal:  $0,53 \pm 0,10$ ; 6-OHDA-Sal:  $0,40 \pm 0,06$ ; Sham-SMT:  $0,38 \pm 0,05$ ; 6-OHDA-SMT:  $0,57 \pm 0,13$ ). Em relação a variância do IP, não houve diferenças significativas entre os grupos.



**Figura 7.** Análise espectral do intervalo de pulso (IP) Parâmetros basais nos grupos após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou infusão de 6-OHDA e tratamento com SMT (10mg/kg i.p) ou salina (0,9%, i.p.). Análise da modulação autonômica em (A) variância de IP, (B) LFnu, (C) HFnu e (D) LF/HF. Os dados foram analisados por Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn e estão apresentados como mediana + espaço interquartil. Sham-Sal n = 8; 6-OHDA-Sal n = 8; Sham-SMT n = 7; 6-OHDA-SMT = 7. IP = intervalo de pulso, HF = componente de alta frequência, LF = componente de baixa frequência.

Análise do barorreflexo espontâneo

A sensibilidade do barorreflexo foi avaliada com os dados das sequências “up” (Fig.8A - Sham-Sal:  $1,40 \pm 0,13$ ; 6-OHDA-Sal:  $1,85 \pm 0,19$ ; Sham-SMT:  $1,81 \pm 0,39$ ; 6-OHDA-SMT:  $2,26 \pm 0,27$ ), sequências “down” (fig. 6B - Sham-Sal:  $1,42 \pm 0,15$ ; 6-OHDA-Sal:  $2,24 \pm 0,15$ ; Sham-SMT:  $1,83 \pm 0,33$ ; 6-OHDA-SMT:  $1,86 \pm 0,23$ ), ganho total (fig. 6C- Sham-Sal:  $1,41 \pm 0,13$ ; 6-OHDA-Sal:  $2,10 \pm 0,17$ ; Sham-SMT:  $1,85 \pm 0,36$ ; 6-OHDA-SMT:  $2,12 \pm 0,24$ ) e índice de eficácia do barorreflexo (fig. 6D - Sham-Sal:  $0,17 \pm 0,03$ ; 6-OHDA-Sal:  $0,12 \pm 0,02$ ; Sham-SMT:  $0,18 \pm 0,02$ ; 6-OHDA-SMT:  $0,17 \pm 0,01$ ). Não houve alteração para o barorreflexo em nenhuma das análises.

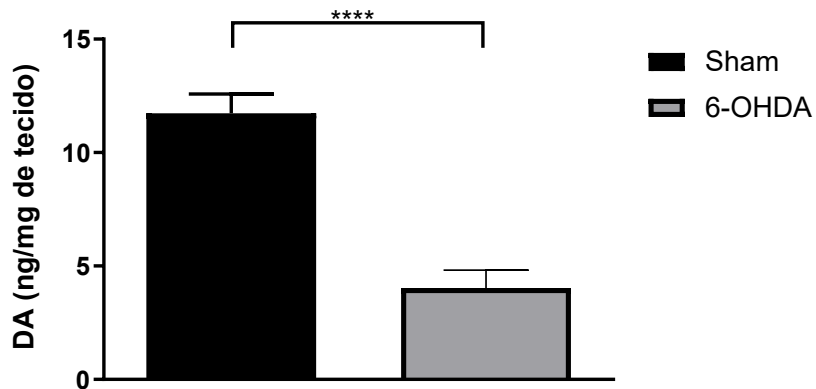


**Figura 8.** Análise do barorreflexo espontâneo após infusão bilateral de 6-OHDA e 7 dias de tratamento com SMT (10mg/kg; ip) ou salina (0,9%, i.p.). (A) Sequências “up” (Up gain); (B) Sequências “down” (Down gain); (C) Ganho Total; (D) BEI. Os dados foram analisados por ANOVA 2 vias e estão representados como média  $\pm$  EPM. Sham-Sal n = 8; 6-OHDA-Sal n = 8; Sham-SMT n = 7; 6-OHDA-SMT = 7.

#### 4.1.3.2 Protocolo B - Análise dos parâmetros cardiovasculares basais (PAM e FC) em animais com ou sem lesão por 6-OHDA, após injeção endovenosa de salina (1mg/Kg) e de SMT (3mg/Kg)

##### Determinação das concentrações de DA estriatal após 7 dias de lesão bilateral por 6-OHDA

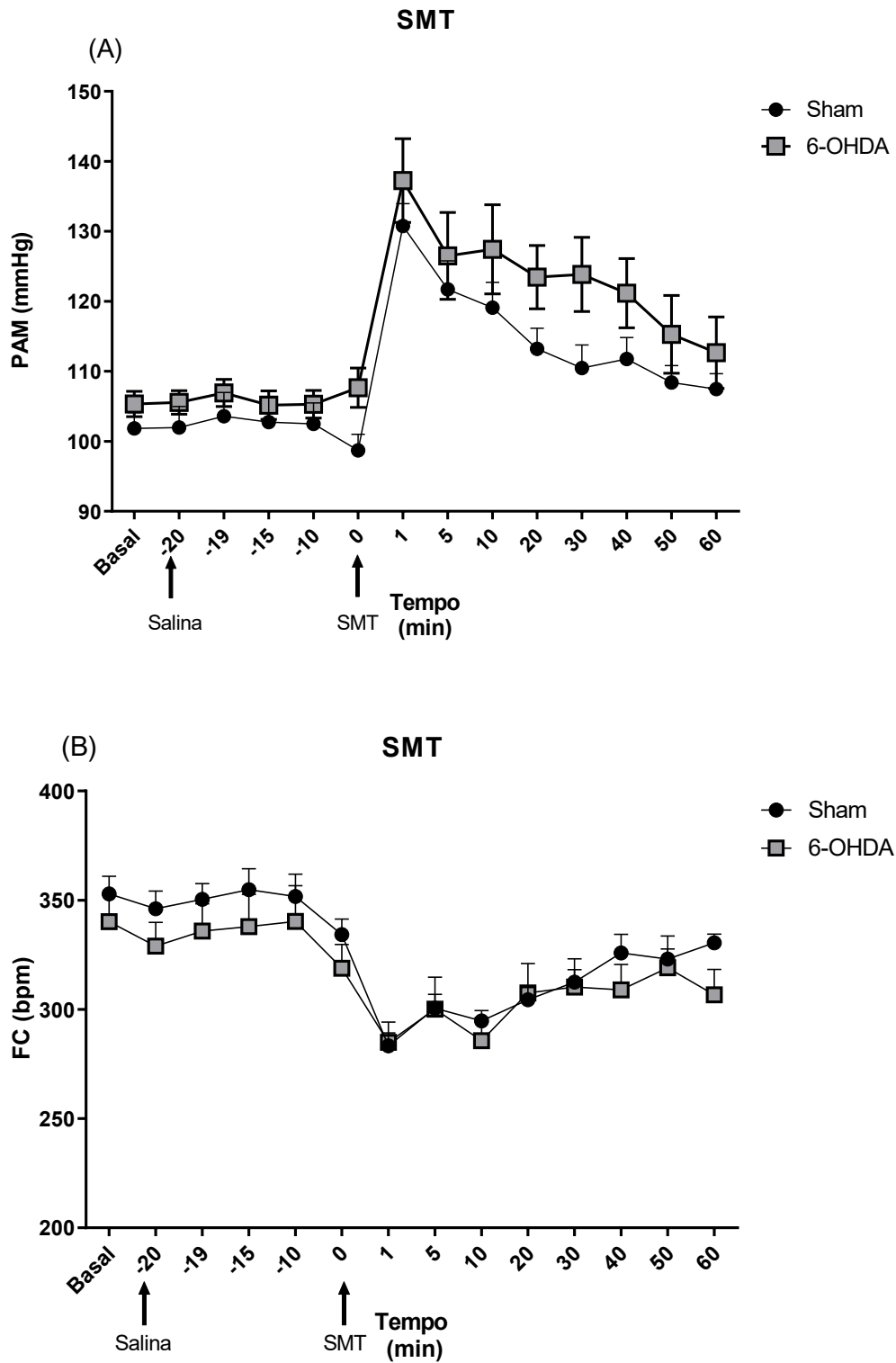
A análise neuroquímica mostrou que a concentração de dopamina após 7 dias de lesão foi menor nos grupos 6-OHDA em relação ao seu controle Sham ( $p < 0,0001$ ; Sham:  $11,73 \pm 0,85$ ; 6-OHDA:  $4,03 \pm 0,78$ ). Estes resultados confirmam a eficácia da lesão bilateral por 6-OHDA na SNpc (Fig. 9).



**Figura 9.** Concentração de dopamina (DA) no estriado após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou infusão de 6-OHDA. Os dados foram analisados por teste T não pareado e estão representados como média  $\pm$  EPM. Sham n = 11; 6-OHDA n = 7. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

*Análise dos parâmetros cardiovasculares basais (PAM e FC) em animais com ou sem lesão por 6-OHDA, após injeção endovenosa de salina (1mg/Kg) e de SMT (3mg/Kg)*

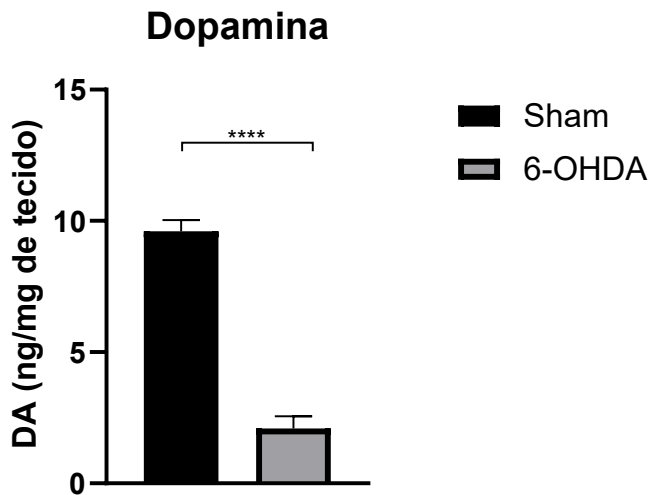
Foi realizada a injeção in bolus de salina 0,9% (1mg/kg) após 30 minutos de registro basal da PAM e FC e, após 20 minutos, a injeção in bolus de SMT (3mg/kg) foi efetuada, seguido do registro por 1h dos parâmetros cardiovasculares. No tempo -20, foi realizada a administração de salina e no tempo 0, a administração de SMT. A evolução temporal dos valores médios da PAM e FC entre os grupos experimentais após a administração in bolus de salina e SMT está representada na Figura 10. Após injeção de salina não houve alterações nos parâmetros cardiovasculares de PAM e FC em todos os grupos experimentais. A administração de SMT levou ao aumento da PAM e diminuição da FC para todos os animais (Fig. 10), porém não houve diferença entre o grupo Sham com o 6-OHDA em nenhum dos tempos avaliados.



**Figura 10.** Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (a) e na frequência cardíaca (FC) (b), após a administração endovenosa de salina (tempo -20) e de SMT (3 mg/kg – tempo 0) em animais com ou sem lesão por 6-OHDA. Os valores estão expressos em média + EPM, os dados foram analisados por RMANOVA two-way, seguido do pós teste de Bonferroni). Sham n = 11; 6-OHDA n = 7.

#### 4.1.3.3 PROTOCOLO C - Análise da função vascular em anéis de aorta após 7 dias de lesão bilateral de 6-OHDA para investigação da hiporreatividade dependente de endotélio

##### Determinação das concentrações de DA estriatal após 7 dias de lesão bilateral por 6-OHDA



**Figura 11.** Concentração de dopamina (DA) no estriado após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou infusão de 6-OHDA. Os dados foram analisados por teste T não pareado e estão representados como média  $\pm$  EPM. Sham n = 8; 6-OHDA n = 10. \*\*\*\* p<0,0001.

A análise neuroquímica mostrou que a concentração de dopamina após 7 dias de lesão foi menor nos grupos 6-OHDA em relação ao grupo Sham ( $p < 0.0001$ ). Esses dados confirmam a eficácia da lesão por 6-OHDA na SNPc (Fig. 7).

##### Análise da função vascular em anéis de aorta após 7 dias de lesão bilateral de 6-OHDA

Para esclarecer os mecanismos envolvidos com hiporreatividade à fenilefrina evidenciada em anéis com endotélio dos machos 6-OHDA anteriormente, foram feitas CCEC para Fenil na presença dos bloqueadores L-NAME ( $10^{-5}$  M), SMT ( $10^{-6}$  M) e indometacina ( $10^{-5}$  M). Neste trabalho, foi observado menor  $R_{m\acute{a}x}$  no grupo 6-OHDA em relação ao Sham (Tabela 1).

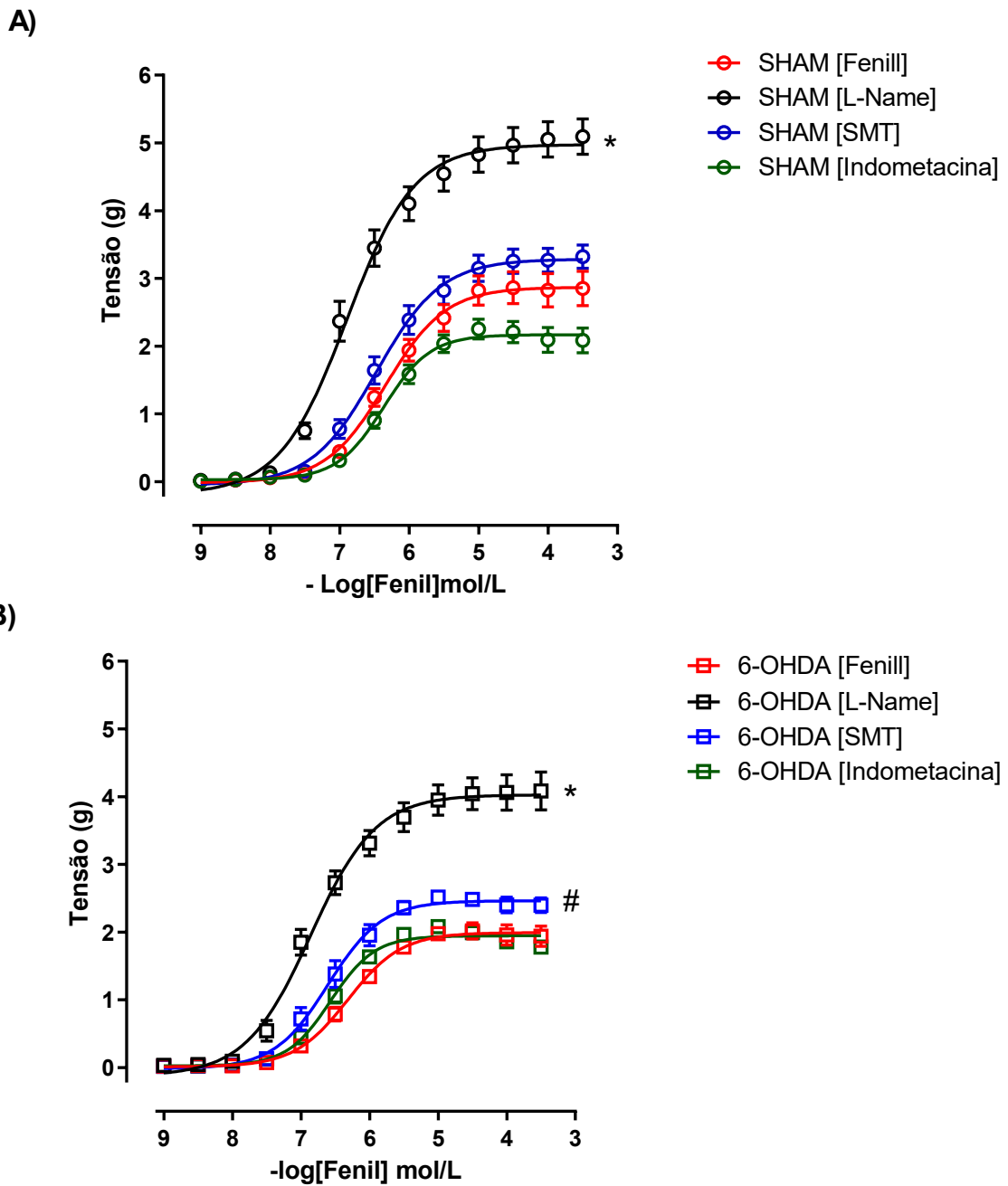
Em relação ao grupo Sham (Fig. 12A), a incubação com indometacina e com SMT não interferiram com a  $R_{m\acute{a}x}$ , entretanto a incubação com L-NAME ( $p < 0,05$ )

aumentou a R<sub>máx</sub> nos anéis SHAM. Em relação à pD<sub>2</sub>, houve aumento na pD<sub>2</sub> somente com a incubação com L-NAME nos anéis SHAM (p<0,05). O aumento da R<sub>máx</sub> e da pD<sub>2</sub> com o bloqueio com L-NAME nos anéis Sham era esperado, visto que houve a inibição de todas as NO sintases. Para o grupo 6-OHDA (Fig. 12B), a incubação com indometacina não alterou a R<sub>máx</sub> à Fenil em anéis 6-OHDA; enquanto a incubação com L-NAME aumentou a R<sub>máx</sub> à Fenil em anéis 6-OHDA (p<0,05), assim como SMT (p=0,040), demonstrando que a via envolvida na hiporreatividade destes animais se dá pela iNOS. Em relação à pD<sub>2</sub>, houve aumento na pD<sub>2</sub> somente com a incubação com L-NAME nos anéis 6OHDA (p<0,05).

**Tabela 1.** Resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e pD<sub>2</sub> (logaritmo negativo da concentração agonista resultando em 50% da resposta máxima) para fenilefrina em anéis com endotélio incubados com indometacina, L-NAME e SMT em machos 6-OHDA ou Sham.

	SHAM		6-OHDA	
	R <sub>máx</sub>	pD <sub>2</sub>	R <sub>máx</sub>	pD <sub>2</sub>
<b>FENIL</b>	2,90 ± 0,22 [10]	6,32 ± 0,07 [10]	2,05 ± 0,09 [8]	6,30 ± 0,09 [8]
<b>INDOMETACINA</b>	2,24 ± 0,14 [10]	6,34 ± 0,07 [10]	2,08 ± 0,04 [8]	6,57 ± 0,10 [8]
<b>L-NAME</b>	4,77 ± 0,24* [10]	6,88 ± 0,08* [10]	3,92 ± 0,20* [8]	6,87 ± 0,07* [8]
<b>SMT</b>	3,24 ± 0,17 [10]	6,44 ± 0,10 [10]	2,51 ± 0,05# [8]	6,58 ± 0,11 [8]

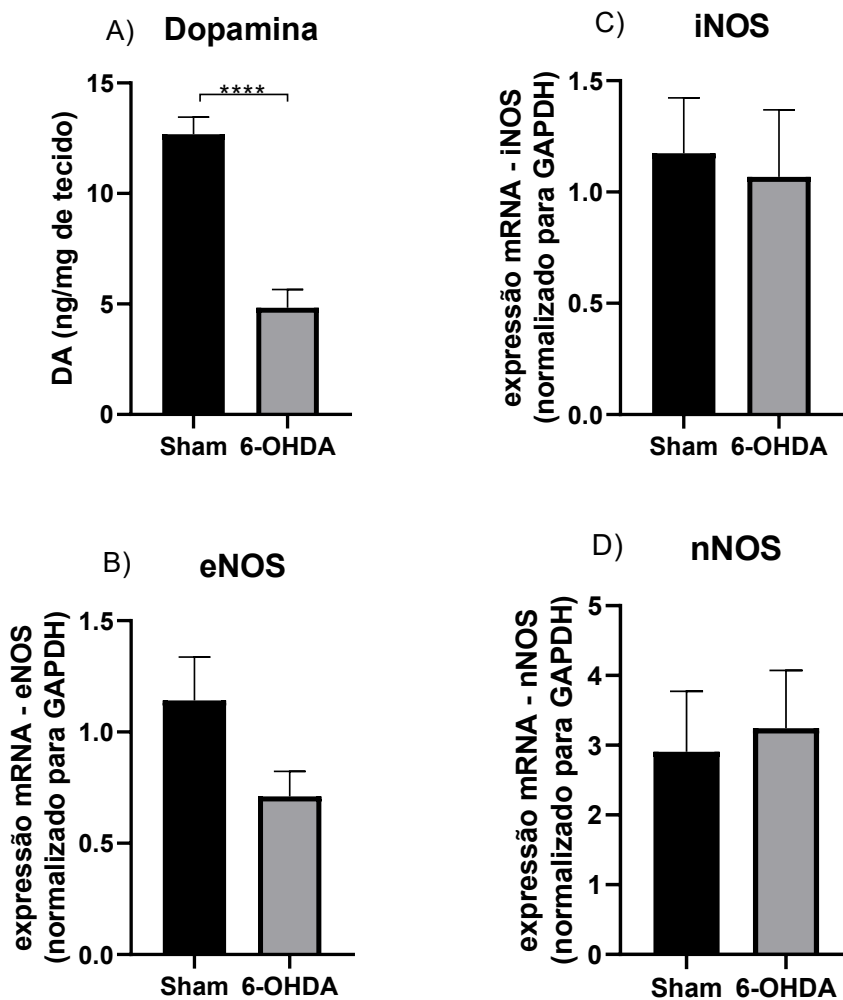
Dados são representados como média ± E.P.M. Números em colchetes representam o número de animais/grupo. ANOVA 1 via, \*p < 0,05 L-NAME vs FENIL; #SMT vs FENIL. &\*p<0,05 Sham vs 6-OHDA.



**Figura 12.** Curvas concentração efeito cumulativa para fenilefrina em anéis com endotélio incubados com indometacina, L-NAME e SMT de machos Sham (Figura A) ou 6-OHDA (Figura B). Dados são expressos como média  $\pm$  E.P.M.,  $n = 10$ . ANOVA de 1 via, \* $p < 0,05$  L-NAME vs Fenil; # $p < 0,05$  SMT vs Fenil.

#### 4.1.3.4 Expressão das isoformas eNOS, iNOS, nNOS na aorta torácica de ratos com ou sem lesão bilateral por 6-OHDA após 7 dias

Para este grupo experimental, houve redução da DA após 7 dias de lesão bilateral por 6-OHDA ( $p < 0,0001$ ; Sham:  $12,68 \pm 0,78$ ; 6-OHDA:  $4,83 \pm 0,82$ ). No entanto, não houve diferença na expressão da iNOS (Sham:  $1,17 \pm 0,25$ ; 6-OHDA:  $1,07 \pm 0,30$ ); eNOS (Sham:  $1,14 \pm 0,20$ ; 6-OHDA:  $0,71 \pm 0,11$ ); nNOS ( $2,09 \pm 0,87$ ; 6-OHDA:  $3,25 \pm 0,83$ ) na aorta torácica entre os animais 6-OHDA e o Sham.



**Figura 13.** A) Concentração de dopamina (DA) no estriado após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou infusão de 6-OHDA. B) Expressão da eNOS; C) Expressão da iNOS e D) Expressão da nNOS. Os dados foram analisados por teste T não pareado e estão representados como média  $\pm$  EPM. Sham n = 8; 6-OHDA n = 10. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . N = 5 a 8/grupo.

#### 4.1.4 DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliou-se os efeitos do tratamento com um inibidor seletivo da iNOS, o SMT, nos aspectos cardiovasculares e autonômicos de ratos não-anestesiados após lesão bilateral da SNpc pela infusão de 6-OHDA ou salina (sham). Assim como, investigou-se quais os mecanismos envolvidos na disfunção endotelial encontrados neste mesmo modelo experimental. A confirmação do modelo de parkinsonismo foi observada pela diminuição nas concentrações de DA no estriado nos animais lesados. No entanto, o tratamento com o SMT não foi capaz de reverter essa perda de DA no modelo bilateral por 6-OHDA. Em relação aos parâmetros basais, os valores de PAS e PAM são menores nos animais 6-OHDA em relação ao seu controle Sham, sem efeito do tratamento com SMT. Na análise da variabilidade da PAS, foi observado diminuição na variância, no componente VLFabs e no componente LFabs nos grupos 6-OHDA quando comparados aos seus controles, independente do tratamento com SMT. Também, foi observado que, após injeção endovenosa de SMT, houve aumento da PA e queda na FC, no entanto a resposta não foi diferente entre os grupos Sham e 6-OHDA. Na análise da função vascular, ao investigarmos os mecanismos, foi visto que a R<sub>máx</sub> a Fenil aumentou devido a incubação com SMT em animais 6-OHDA, mostrando que possivelmente a via envolvida na hiporreatividade vascular dos animais com parkinsonismo é a iNOS. Dessa forma, o conjunto dos resultados apresentados neste estudo sugerem que parte da disfunção cardiovascular em animais submetidos ao parkinsonismo por 6-OHDA possa ser periférica e ter a participação da iNOS endotelial.

O modelo de parkinsonismo por 6-OHDA, é um modelo clássico, que apresenta alterações comportamentais e motoras. No presente estudo, pode-se observar que houve queda de aproximadamente 60-70% nas concentrações de DA após 7 dias de infusão de 6-OHDA, o que corrobora com outros estudos utilizando o mesmo modelo (ARIZA *et al.*, 2010; ARIZA *et al.*, 2015; DE JAGER *et al.*, 2018; AMORIM *et al.*, 2019). Este é o grau de depleção encontrado em modelos animais que tentam mimetizar as fases iniciais da DP, em conjunto com o aparecimento dos sintomas motores (DUTY; JENNER, 2011; RODRIGUEZ-OROZ *et al.*, 2009). No entanto, o tratamento com SMT não alterou as concentrações de DA estriatal após 7 dias da lesão. A maior parte dos estudos com modelos de parkinsonismo utilizou inibidores da cNOS ou seletivos para

nNOS, sendo este o primeiro trabalho a utilizar um inibidor da iNOS nesse modelo de lesão bilateral.

Em camundongos induzidos ao parkinsonismo por MPTP e tratados com SMT (4x10 mg/kg com intervalos de 12h por dia) ou com 7-NI (4x50 mg/kg com intervalos de 12h por 2 dias), houve diminuição na perda de neurônios dopaminérgicos na SN após 7 dias do MPTP (ARAS *et al.*, 2014). Broom e colaboradores (2011), administraram GW274150 (inibidor da iNOS) em diferentes doses por via oral duas vezes ao dia por 7 dias a partir do dia 2 após a indução da lesão por 6-OHDA unilateral no prosencéfalo medial de ratos Sprague-Dawley (BROOM *et al.*, 2011). A dose de 10 mg/kg atenuou significativamente a perda de células TH-positivas no hemisfério lesionado por 6-OHDA em comparação com o hemisfério não lesionado. Em relação a DA estriatal, houve a preservação do seu conteúdo, mas o grau de preservação foi menor do que o observado ao considerar o número de células TH-positivas na SNpc (BROOM *et al.*, 2011). Liberatore e colegas (2000), no modelo MPTP em camundongos, observaram uma resposta semelhante, em que duas vezes mais neurônios TH-positivos sobreviveram na SNpc em camundongos knockout para iNOS<sup>-/-</sup> e, a ausência de iNOS não conseguiu proporcionar qualquer proteção contra a perda de conteúdo de dopamina estriatal (LIBERATORE *et al.*, 1999). Ainda, também em camundongos knockout para iNOS<sup>-/-</sup> após 7 dias, observou-se proteção na toxicidade do MPTP comparado ao controle, porém não alterou as concentrações de DA estriatal (DEHMER *et al.*, 2000). Em nosso estudo, somente a DA estriatal foi avaliada. Além disso, a ausência do efeito pode ser decorrente do fato que nosso modelo ser realizado de maneira bilateral e há diminuição bastante acentuada dos neurônios dopaminérgicos bilateralmente e em um curto período.

Em relação aos parâmetros cardiovasculares, houve redução nos valores basais de PAS e PAM, bem como alterações na modulação autonômica dos parâmetros cardiovasculares, com redução da variância na PAS em animais 6-OHDA, o que corrobora com outros estudos (ARIZA *et al.*, 2015; DE JAGER *et al.*, 2018; AMORIM *et al.*, 2019). Nossos resultados mostram uma variação menor na modulação do domínio do tempo de PAS, e nos componentes de LFabs e VLFabs de animais 6-OHDA-Sal e 6-OHDA-SMT em relação aos seus controles, não havendo alteração pelo tratamento. A variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e variabilidade da pressão arterial (VPA) são medidas que podem avaliar a modulação do SNA sobre o sistema cardiovascular em condições patológicas. Mudanças nos

padrões da VCF funcionam como um indicador de saúde, uma pessoa saudável geralmente apresenta maior variabilidade de FC, de modo que a redução da variabilidade de FC pode funcionar como um indicador de várias doenças (VANDERLEI *et al.*, 2009). Também, há evidências que indicam que alterações na VPA está associada ao desenvolvimento, progressão e gravidade de danos cardíacos, vasculares e renais e a um risco aumentado de eventos cardiovasculares e mortalidade, independentemente da PA média estar elevada (PARATI; OCHOA; BILO, 2012). Estudos mostram que pacientes com DP apresentam redução na VFC e também apresentam valores de LF mais baixos do que os pacientes do grupo controle (DEVOS *et al.*, 2003; OKA *et al.*, 2020; SALSONE *et al.*, 2016; SOLLA *et al.*, 2015; STRANO *et al.*, 2016). Sorensen e colaboradores observaram atividade simpática atenuada em pacientes com DP, com redução nos componentes relacionados ao sistema simpático na VFC (SORENSEN; MEHLSSEN; JENNUM, 2013). Evidências mostram perda de nervos noradrenérgicos simpáticos no coração e rins de pacientes com DP (GOLDSTEIN, 2007) Ainda, ratos com parkinsonismo por 6-OHDA apresentam resposta diminuída ao bloqueador beta-adrenérgico, sugerindo uma transmissão sináptica vascular simpática prejudicada (ARIZA, D. *et al.*, 2015). Nossos dados de variabilidade corroboram com os dados de PA, pois a queda na variância e a queda numérica do componente LF justificam a queda da PAS. A variância refere-se à potência total da PAS. Considerando que os principais reguladores da PA são controlados de forma predominante pelo simpático, essas alterações também indicam comprometimento no sistema simpático nesse modelo experimental. Parte desse comprometimento pode ser de origem central, visto que dados prévios de nosso grupo observaram um aumento no tônus simpático inibitório decorrente de uma maior expressão e atividade da nNOS no núcleo paraventricular do hipotálamo (TUROSSI AMORIM, E.D. *et al.*, 2019).

No nosso trabalho, foi observado alteração no VLF dos animais 6-OHDA em relação ao seu controle. As alterações no componente VLFabs também foram encontradas em fêmeas submetidas ao parkinsonismo por 6-OHDA (DE CAMPOS *et al.*, 2020). O componente VLF é um índice menos utilizado cujo papel fisiológico não está bem estabelecido e parece estar relacionado ao sistema renina-angiotensina-aldosterona, termorregulação e tônus vasomotor periférico (VANDERLEI *et al.*, 2009). Não foram observadas diferenças na modulação autonômica da frequência cardíaca, avaliada pela análise espectral do IP, estando em concordância com a ausência de

alterações nos valores de FC basais entre os grupos. O mesmo ocorreu para as variáveis do barorreflexo espontâneo. Nesse sentido, os dados do presente estudo apontam para uma disfunção vascular e não cardíaca.

Para avaliar o efeito agudo da inibição da isoforma da iNOS nos parâmetros basais de PA e FC, utilizou-se o SMT na dose de 3mg/Kg. A resposta pressórica à administração de SMT está de acordo com dados estabelecidos para machos anestesiados, em que doses entre 1 e 10 mg/Kg promoveram respostas máximas em 5 minutos (SOUTHAN; SZABÓ; THIEMERMANN, 1995). Na dose de 3 mg/kg, a mesma utilizada no presente estudo, a ação inibitória sobre a iNOS se mantém por 6h (SU; YANG; CHEN, 2007). Após inibição endovenosa pela iNOS, foi observado aumento da PAM e redução da FC, com ativação do SNA simpático no grupo Sham e 6-OHDA, mas sem diferença na resposta para os dois grupos.

Investigações prévias do nosso laboratório, mostram diminuição da resposta do tônus simpático através da diminuição pressórica ao bloqueio  $\alpha$ -adrenérgico (com prazosin) (ARIZA *et al.*, 2015). No presente estudo, por meio da reatividade vascular da aorta torácica, avaliou-se se esse efeito poderia ser decorrente de uma alteração periférica, no qual foi observado diminuição da resposta ao agonista alfa1-adrenérgico (fenilefrina) na presença de endotélio. O sistema vascular é regulado pelo sistema nervoso simpático, que influencia principalmente a vasculatura através de mudanças na liberação das principais catecolaminas endógenas: noradrenalina e adrenalina, dos terminais dos nervos simpáticos e da medula adrenal (THOMAS, 2011). Alguns autores relatam que a menor reatividade vascular se deve a diminuição plasmática de noradrenalina. No entanto, apesar da noradrenalina ser um potente vasoconstritor, o tônus vascular é regulado por uma combinação de vários mediadores vasoconstritores e dilatadores. Posteriormente, ao investigarmos os mecanismos, observou-se que a incubação com L-NAME aumentou a  $R_{máx}$  a Fenil, tanto em anéis 6-OHDA quanto em anéis Sham, o que era esperado visto que endotélio não estaria tendo a sua participação, promovendo o aumento da resposta contrátil. O L-NAME sofre hidrólise e forma L-NG-nitroarginina (L-NNA), esta, interage de forma não covalente com as três isoformas da NOS (VÍTEČEK *et al.*, 2012). No entanto, a incubação com SMT (inibidor da iNOS) promoveu aumento da  $R_{máx}$  somente nos animais 6-OHDA, sugerindo uma participação da iNOS na hiporreatividade a fenilefrina.

Os prostanoídes são uma família de mediadores lipídicos bioativos produzidos pela COX a partir do ácido araquidônico. A PGI<sub>2</sub>, um dos prostanoídes mais

importantes no controle da homeostasia do sistema cardiovascular, é um potente vasodilatador (MENDES *et al.*, 2012). Foi importante avaliar a PGI<sub>2</sub> para mostrar que a atividade da NOS sintase é mais importante na produção do NO e na modulação da reatividade do que a PGI<sub>2</sub>, visto que não houve alteração após o uso de indometacina. A indometacina é um potente inibidor não-seletivo da enzima ciclo-oxigenase (COX). A COX corresponde a uma classe de enzimas conservadas evolutivamente e tem duas isoformas principais: a COX-1 e a COX-2. Seus subprodutos têm papel fundamental na inflamação e na percepção da dor. Há uma grande discussão entre a inibição seletiva ou não da COX pelo fato de a mesma, além de participar dos eventos inflamatórios, ter papel fundamental na manutenção da homeostase do organismo (MENDES *et al.*, 2012). Neste caso, a indometacina foi utilizada por dois motivos: avaliar a participação de outro fator relaxante de endotélio (PGI<sub>2</sub>) e avaliar se há envolvimento da COX 2 e seu envolvimento na inflamação, visto que a COX-2 pode estar expressa em situações de inflamação (MENDES *et al.*, 2012).

A hiporreatividade dependente de endotélio sugere uma concentração maior de NO e que o NO estaria modulando esta hiporreatividade. Ao realizarmos a inibição das COX, não houve diferença entre Sham e 6-OHDA, mas, ao realizarmos a inibição da iNOS, há diferença entre os dois grupos. Sendo assim, podemos concluir que a iNOS tem participação na disfunção endotelial. Porém, como sua inibição não reverte a resposta completamente, provavelmente há outra isoforma da NOS envolvida nesta disfunção e mais estudos são necessários para avaliar o envolvimento das outras isoformas.

Os principais fatores que ativam a expressão ou transcrição de iNOS são patógenos e estímulos inflamatórios que atuam, principalmente por meio das vias MAPK e NF- $\kappa$ B mediadas por lipopolissacarídeos (LPS). A superexpressão de iNOS aumenta as concentrações de NO, e esse nível elevado de NO está implicado na fisiopatologia da DP (MINHAS; BANSAL; BANSAL, 2020). Como consequência da superexpressão de iNOS, há aumento da produção de NO, que eventualmente reage com o radical superóxido para produzir espécies reativas de nitrogênio (RNS), como trióxido de dinitrogênio (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) e peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). Esses RNS ativam vias de inflamação e estresse oxidativo que levam a DP (MINHAS; BANSAL; BANSAL, 2020). Na DP, a nitração de  $\alpha$ -sinucleína e a nitração de Parkin e tirosina contribuem para a neurodegeneração (DANIELSON; ANDERSEN, 2008; NAKAMURA; LIPTON, 2016). Mais especificamente no sistema cardiovascular, foi proposto que a expressão de

iNOS esteja associada a estados de doença, bem como que sua regulação positiva e aumento da ativação promovem a produção de peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) e podem contribuir para a disfunção endotelial (DAYAL *et al.*, 2014; SHAH, 2000; VIARO; NOBRE; EVORA, 2000). Embora as células saudáveis na vasculatura não apresentem níveis significativos de iNOS, vários processos patológicos mostram aumento da atividade de iNOS nos vasos sanguíneos (GUNNETT *et al.*, 2005; OLLER *et al.*, 2017). De Jager e colaboradores, mostraram aumento das concentrações de NO na aorta torácica de animais 6-OHDA após 7 dias de lesão (DE JAGER *et al.*, 2018). Acredita-se que esse aumento de NO na aorta seja decorrente da via da iNOS e como a iNOS gera concentrações maiores de NO que a eNOS, esse excesso de NO possa ter causado essa disfunção endotelial. O excesso de NO é capaz de limitar a resposta dos vasos sanguíneos aos vasodilatadores e diminuir a sensibilidade ao NO (EGUCHI *et al.*, 2002).

No entanto, não houve diferença na expressão das NOS sintases na aorta torácica entre os animais 6-OHDA e o Sham. A quantidade de NO produzida pela iNOS depende tanto do nível de expressão da enzima no tipo celular específico como da sua atividade enzimática. As isoformas da NOS possuem numerosos sítios de ligação para cofatores regulatórios e domínios para vários fatores de transcrição, citocinas e endotoxinas em sua região promotora (KAVYA *et al.*, 2006). A regulação do NO e os efeitos mediados por NO ocorre por meio de múltiplos mecanismos, incluindo marcação da eNOS, disponibilidade de fatores que regulam a atividade da NOS ou por meio da modulação das interações proteína-proteína da NOS. A resposta complexa das células endoteliais a estímulos fisiopatológicos entre diferentes leitos vasculares ou entre diferentes modelos animais de distúrbios vasculares complexos, é um reflexo da complexidade da regulação do NO nas células endoteliais (CHATTERJEE; CATRAVAS, 2008). Nosso trabalho sugere, então, que a modulação do NO sobre a responsividade pressora à Fenil pode estar relacionada ao aumento da atividade da enzima NOS.

Nossos achados indicam que o tratamento com inibidor seletivo da iNOS não promoveu proteção em relação a diminuição de DA no estriado e que as alterações nos parâmetros basais e autonômicos estão mais relacionadas a PAS. No entanto, nosso estudo demonstrou que as alterações na resposta vascular nos animais 6-OHDA estão relacionadas com a isoforma da iNOS.

## **4.2 ESTUDO 2: Envolvimento do sistema renina angiotensina na função cardiovascular de ratos machos induzidos ao parkinsonismo por 6-OHDA**

### **4.2.1 Introdução**

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum e atinge aproximadamente de 2 a 3% da população acima dos 65 anos (POEWE *et al.*, 2017). É caracterizada pela degeneração de neurônios dopaminérgicos na substância negra parte compacta (SNpc) e apresenta a formação de agregados de  $\alpha$ -sinucleína, denominados corpos de Lewy. A DP é um distúrbio complexo de etiologia multifatorial, envolvendo tanto fatores ambientais como genéticos, além de incluir disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, agregação de proteínas, autofagia prejudicada e neuroinflamação (TRIST; HARE; DOUBLE, 2019). O estresse oxidativo pode ser resultado de disfunção mitocondrial, ou de uma capacidade antioxidante reduzida ou até mesmo devido ao metabolismo da DP que produz espécies reativas de oxigênio (ERO) (BLANDINI, 2013; MOORE *et al.*, 2005).

Além dos sintomas motores clássicos da doença, pacientes com a DP também apresentam alterações no sistema cardiovascular, como: diminuição da variação da frequência cardíaca, variabilidade na pressão arterial, hipotensão ortostática e hipotensão pós-prandial, entre outras (SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017; NICARETTA; ROSSO; DE MATOS, 2011; JAIN; GOLDSTEIN, 2012). Em modelos experimentais de indução de parkinsonismo por meio da lesão com a neurotoxina 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), é observado alterações autonômicas e cardiovasculares. Mais especificamente, há alteração nos parâmetros basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), os quais são acompanhados de redução da modulação simpática na pressão arterial sistólica (ARIZA *et al.*, 2015). Assim como, as respostas ao barorreflexo e ao quimiorreflexo estão alteradas nestes animais (ARIZA *et al.*, 2015). Também, foi observado perda de periodicidade circadiana, especialmente na FC, em ratos com infusão bilateral de 6-OHDA no estriado anterior e posterior (BOULAMERY *et al.*, 2010).

Estudos têm evidenciado o envolvimento do SRA cerebral na degeneração de neurônios dopaminérgicos e na progressão da DP (MERTENS *et al.*, 2010; PEREZ-LLORET *et al.*, 2017). O sistema renina-angiotensina (SRA) tem um importante papel no controle de funções cardiovasculares, renais e cerebrais (FERRARIO, 1990). O

sistema clássico inicia-se com a conversão de pró-renina em renina, a qual converte angiotensinogênio em angiotensina I (Ang I). Esta, por meio da enzima conversora de angiotensina (ECA), é metabolizada em angiotensina II (Ang II), que é o principal efetor dessa cascata, atuando sobre os receptores do tipo I (AT1) e receptores do tipo II (AT2). Os efeitos da Ang II nos receptores AT1 incluem a vasoconstrição, liberação de catecolaminas e aldosterona, enquanto que através dos receptores AT2 a Ang II promove efeitos anti-inflamatórios e anti-fibróticos (INAGAMI *et al.*, 1999; PEREZ-LLORET *et al.*, 2017). Administração de inibidor da ECA, o captopril, antes e após a lesão por 6-OHDA preveniu a perda de DA e reduziu o estresse oxidativo (LOPEZ-REAL *et al.*, 2005). O mesmo foi observado para animais induzidos ao parkinsonismo por MPTP (MUÑOZ *et al.*, 2006; SONSALLA *et al.*, 2013). A administração crônica de Perindopril, outro inibidor da ECA, promoveu aumento de DA estriatal, tanto em animais controle como em animais induzidos ao parkinsonismo por MPTP (JENKINS *et al.*, 1999). A inibição do receptor AT1 também apresenta um papel neuroprotetor. O pré-tratamento com losartan reduziu a denervação dopaminérgica no estriado de camundongos induzidos ao parkinsonismo por MPTP (GRAMMATOPOULOS *et al.*, 2007). O candesartan, outro inibidor AT1, 7 dias antes e durante 11 dias após a lesão por 6-OHDA também foi capaz de induzir neuroproteção em ratos Wistar (MERTENS *et al.*, 2011). No entanto, a participação de inibidores do SRA nos parâmetros cardiovasculares de animais com parkinsonismo ainda não foi avaliado. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é avaliar o envolvimento do SRA através da inibição do receptor AT1 e do inibidor da ECA nos parâmetros cardiovasculares e autonômicos.

#### **4.2.2 Materiais e Métodos**

##### *Aprovação Ética e Animais*

Todos os protocolos experimentais estão de acordo com a Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (CONCEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (nº do processo: 174/2018). Foram utilizados ratos Wistar machos adultos, pesando entre 280-320g no início do protocolo. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura e ventilação adequados ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), em um ciclo claro-escuro de 12h. Os animais tinham

água e ração ad libitum. Os experimentos foram conduzidos durante a fase clara do ciclo.

### Protocolos experimentais

Para avaliar o papel do SRA, os seguintes tratamentos foram realizados:

**A** – Tratamento com inibidor do receptor AT1 – Losartan (10 mg/kg – gavagem) (GRAMMATOPOULOS *et al.*, 2007), durante 7 dias, seguido de registro dos parâmetros basais Grupo controle: água. Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: Sham-H<sub>2</sub>O; Sham-Losartan; 6-OHDA--H<sub>2</sub>O e 6-OHDA-Losartan.

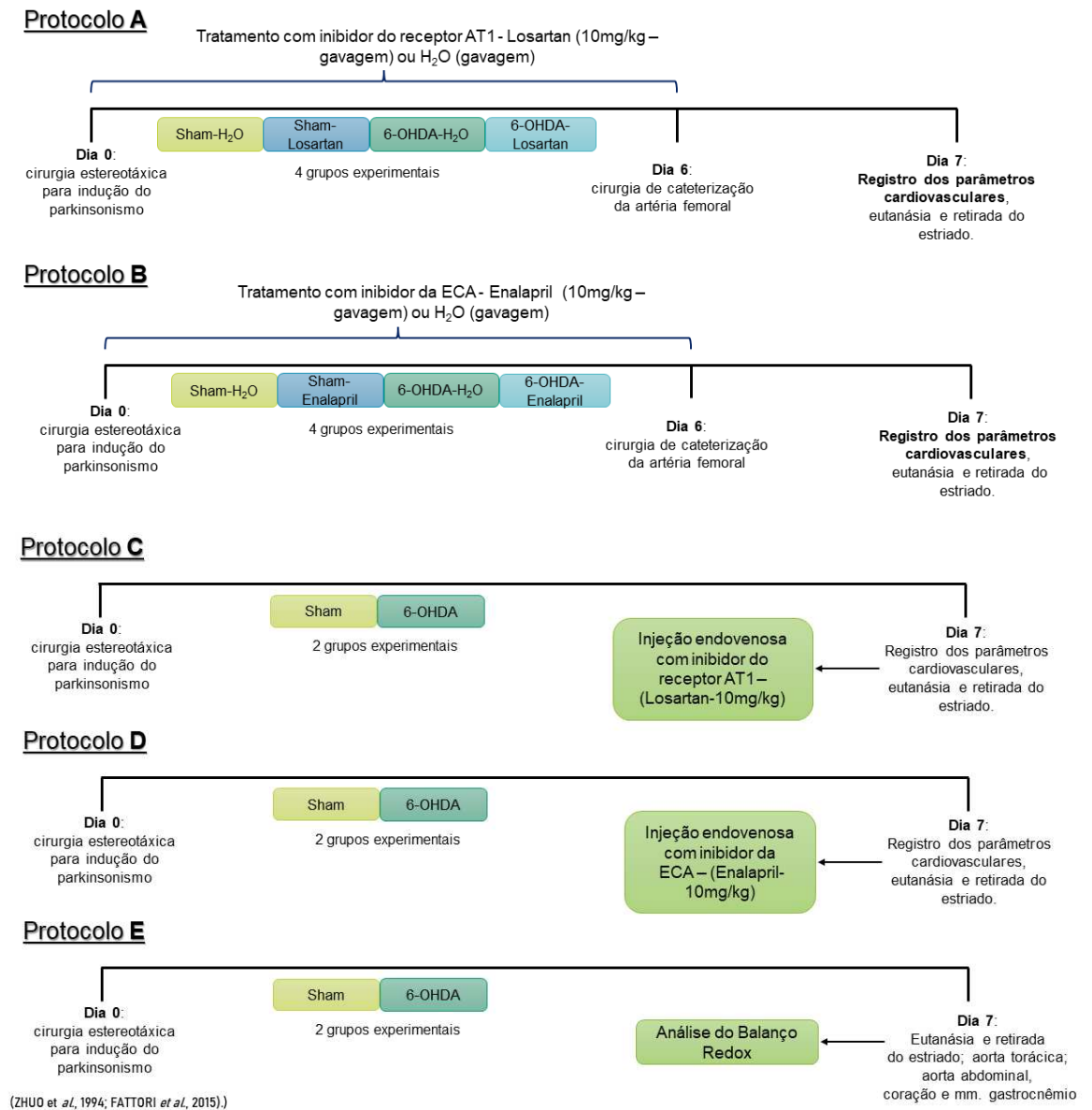
**B** – Tratamento com inibidor da ECA – Enalapril (10 mg/kg – gavagem) (DALPIAZ *et al.*, 2013), durante 7 dias, seguido de registro dos parâmetros basais. Grupo controle: água. Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: Sham-H<sub>2</sub>O; Sham-Enalapril; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O e 6-OHDA-Enalapril.

**C** - Injeção endovenosa in bolus com inibidor do receptor AT1 – Losartan (10 mg/kg) durante o registro dos parâmetros basais de PAM e FC. Os animais foram divididos em 2 grupos experimentais: Sham e 6-OHDA.

**D** - Injeção endovenosa in bolus com inibidor da ECA – Enalapril (10 mg/kg) durante o registro dos parâmetros basais de PAM e FC. Os animais foram divididos em 2 grupos experimentais: Sham e 6-OHDA.

**E**- Avaliação do estresse oxidativo na aorta torácica, aorta abdominal coração e músculo gastrocnêmio.

O delineamento experimental para os protocolos pode ser encontrado na Figura 14.



**Figura 14.** Representação esquemática dos protocolos experimentais.

### Indução do parkinsonismo por 6-OHDA

Para a indução do parkinsonismo, todos animais de ambos os protocolos foram submetidos à anestesia com Cloridrato de Cetamina e Cloridrato de Xilasina (100 e 6,7 mg/kg, i.p.; Ceva Santé Animale, São Paulo, Brasil). Em seguida, foram colocados em um aparelho estereotático (David Kopf), e perfurações no crânio dos animais foram realizadas com uma broca de baixa rotação, permitindo a microinfusão da neurotoxina 6-OHDA (6 mg/mL em 0,2% de ácido ascórbico em solução salina estéril) diretamente na SNpc. Para tal procedimento, as seguintes coordenadas

estereotáticas foram utilizadas como referência, 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; WATSON, 1998). A microinfusão foi realizada com o auxílio de uma agulha conectada a um tubo de polietileno adaptado a uma microseringa de 10  $\mu$ l (Hamilton, EUA) encaixada em uma bomba de infusão. Após a infusão da toxina (3 minutos), a agulha permanecia no local por mais 2 minutos para evitar o refluxo da substância. Em seguida, a pele do escalpo foi suturada e foram colocados em gaiolas com ambiente aquecido para recuperação da anestesia e posteriormente encaminhados à sala de manutenção dos animais. O grupo Sham foi submetido ao mesmo procedimento cirúrgico, porém com a infusão da solução veículo. Como medida profilática, após a cirurgia os animais receberam 24.000 UI de Pentabiótico Veterinário (Fontoura-Wyeth, Brasil) aplicados em 0,2 mL (i.m.) (ARIZA *et al.*, 2010).

#### Tratamento de 7 dias com Losartan ou Enalapril

Os animais do protocolo A e B, a partir do dia da cirurgia estereotática (dia 0) até o dia da cateterização (dia 6) receberam via gavagem Losartan, Enalapril ou água (controle). As cirurgias de estereotaxia foram realizadas no período da manhã e o tratamento foi realizado no período da tarde entre 16h e 18h. Os animais foram pesados diariamente.

#### Cateterização de artéria femoral

Após 6 dias da cirurgia estereotática, os animais foram novamente submetidos à anestesia com Cloridrato de Cetamina e Cloridrato de Xilasina (100 e 6,7 mg/kg, i.p.; Ceva Santé Animale, São Paulo, Brasil) para a cirurgia da cateterização da artéria femoral, com o objetivo de monitorização da PA e FC no dia seguinte.

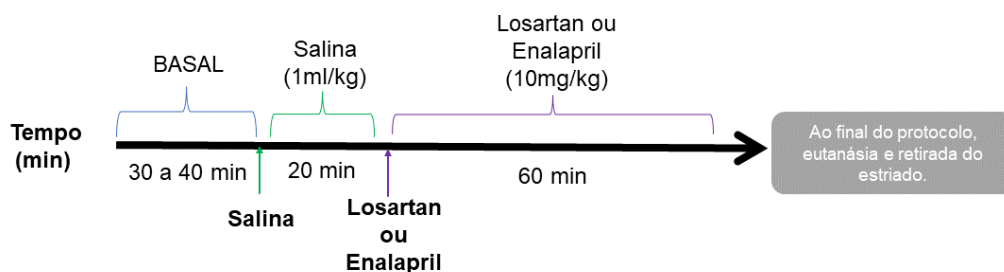
#### Registro dos parâmetros cardiovasculares

Após 24 horas da cateterização, os parâmetros basais foram obtidos após um período de adaptação do animal ao ambiente. A pressão arterial média (PAM) e FC foram registradas por meio de um transdutor de pressão (MLT0830) acoplado ao

sistema de aquisição de dados Powerlab system4/20T (ADInstruments®). Estas gravações foram realizadas com os animais não anestesiados e com livre movimentação. Após o registro, os animais foram submetidos a eutanásia por decapitação e amostras do tecido cerebral foram isoladas. O estriado de cada animal foi dissecado manualmente e pesado. As amostras foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até posterior análise.

### Registro dos parâmetros cardiovasculares com tratamento agudo de Losartan ou Enalapril 10mg/kg

Os animais dos protocolos C e D, divididos em grupo Sham e 6-OHDA, foram submetidos a cirurgia estereotáxica para infusão bilateral de 6-OHDA. Após 6 dias, foram submetidos a cateterização de artéria e veia femoral descritas anteriormente. Após 24 horas da cateterização, os parâmetros cardiovasculares basais foram obtidos durante pelo menos 30 minutos antes do início do protocolo experimental. Durante o registro, os animais não estavam anestesiados. Após o registro basal, uma injeção in bolus de salina 0,9% (1mL/Kg) foi administrada, seguida após 20 minutos de uma injeção in bolus de Losartan (10mg/kg), um inibidor seletivo do receptor AT1 ou foi administrada injeção in bolus de Enalapril (10mg/kg), um inibidor da ECA. Após 1h de registro, os animais foram eutanasiados por decapitação e amostras do tecido cerebral foram isoladas. O estriado de cada animal foi dissecado manualmente e pesado. As amostras foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até posterior análise. A representação do protocolo experimental para o registro dos parâmetros está na Figura 15.



**Figura 15.** Representação do protocolo experimental para registro dos parâmetros cardiovasculares.

### Análise da Variabilidade Cardiovascular

A análise da variabilidade do intervalo de pulso (IP) e da pressão arterial sistólica (PAS) no domínio da frequência foi realizada utilizando-se o software computacional CardioSeries v2.4 (<http://www.danielpenteado.com>), a partir do programa computacional LabChart 7.0 (ADInstruments, Bella Vista, Austrália). A análise do barorreflexo espontâneo foi avaliada por meio do Método de Sequência, utilizando também o software CardioSeries (TEZINI; DIAS; SOUZA, 2013).

#### Determinação da concentração de DA no estriado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As amostras do estriado dissecado foram suspendidas com ácido perclórico 0,1M 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 ul. O sobrenadante foi injetado em uma estação de cromatografia líquida de alta performance 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.

#### Avaliação do estresse oxidativo na aorta torácica, aorta abdominal coração e músculo gastrocnêmio

Os animais utilizados para avaliação do estresse oxidativo foram divididos em grupo Sham e grupo 6-OHDA. Após 7 dias da indução do parkinsonismo, estes foram submetidos a eutanásia por meio da decapitação e foi realizada a coleta da aorta torácica, aorta abdominal, coração e músculo gastrocnêmio, além da coleta do estriado para confirmação da lesão por 6-OHDA. As amostras de tecido coletadas foram lavadas com KCL 1,15% e armazenadas no freezer -80 até posterior análise dos ensaios. As análises realizadas neste trabalho foram a determinação da capacidade antioxidante total através da habilidade da molécula antioxidante de reduzir o cátion ABTS, habilidade do tecido reduzir o íon ferro foi avaliada pelo ensaio FRAP. O ensaio NBT avaliou a produção do ânion superóxido e o ensaio T-BARS

avaliou a peroxidação lipídica que foi determinada pelos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

A seguir está descrita de forma sintetizada a metodologia utilizada em cada um desses ensaios.

**Ensaio de FRAP:** Capacidade antioxidante de reduzir o íon ferro nas amostras. As amostras foram homogeneizadas em solução de KCl e centrifugadas (4°C, 1500 rpm por 15 minutos). Para avaliação do FRAP, 50 µl do sobrenadante foi misturado a 150 µl de água deionizada e 1,5ml da preparação a fresco do reagente de FRAP. A mistura da reação foi incubada a 37°C por 30 min e a absorbância será mensurada em 595 nm. A habilidade de reduzir ânion ferro do tecido foi relacionada com a curva padrão Trolox (Trolox (1,5-30 µmol/l, concentração final), Os resultados foram expressos em Trolox (nmol) por miligrama de proteína.

**Ensaio de ABTS:** a habilidade de neutralização de radicais livres foi avaliada pelo método ABTS (radical 2,2'azinobis- (3-ethylbenzthiazoline-6- sulfonic acid)). As amostras foram homogeneizadas em solução de KCl (1,15%) e centrifugadas (4°C, 1500 rpm por 15 minutos). O sobrenadante foi retirado e diluído na solução ABTS (7mM em persulfato de potássio) e a absorbância foi medida em (730nm) depois de 6 minutos de incubação. Os resultados foram expressos em Trolox (nmol) por miligrama de proteína.

**Ensaio de NBT:** Avaliação da capacidade de redução do ânio superóxido pelo reagent NBT (nitroblue tetrazolium dye). As amostras foram homogeneizadas em solução de KCL (1,15%). O sobrenadante foi retirado e incubado com 100 µl de NBT em placas com 96 poços por 1h a 37°C. O sobrenadante foi retirado e reduzido a uma solução de formazan pela adição de 120 µl de 2 M KOH e 120 µl de DMSO. A redução do NBT foi lida pela absorbância de 600nm de acordo com (FATTORI et al., 2015). Os dados foram expressos em OD/mg de tecido.

**Ensaio de T-BARS:** A peroxidação lipídica nas amostras foi determinada pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS mensuradas pela quantidade de malondialdeído (MDA) presente nas amostras. Para esse ensaio foi adicionado ácido tricloroacético (10%) no homogenato para precipitar as proteínas seguido por centrifugação (1,000xg, 4°C, 3minutos). O sobrenadante livre de proteínas foi separado e adicionado ácido tiobarbitúrico. A mistura foi mantida em banho maria (15 minutos, 95°C). O MDA, produto intermediário da peroxidação lipídica, foi determinado

pelas absorvâncias 535 e 572 nm pela leitora de microplacas como descrito previamente.

### Análise estatística

Os resultados foram avaliados em relação a normalidade dos dados por meio do teste Shapiro Wilk. Para variáveis que apresentaram distribuição normal, análise paramétrica foi conduzida e os valores são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para os dados que apresentaram distribuição normal, foi utilizada ANOVA 2 vias, seguido de pós-teste de Tukey, quando houve interação entre as variáveis. Para dados não normais, foram realizadas transformações logarítmicas. Os dados em seguida, foram novamente analisados por meio do teste de Shapiro-Wilk, seguido de ANOVA de 2 vias. Para as curvas dose resposta após infusão endovenosa de Losartan e Enalapril, Anova de 2 vias para medidas repetidas foi utilizado, seguido do pós-teste de Bonferroni.

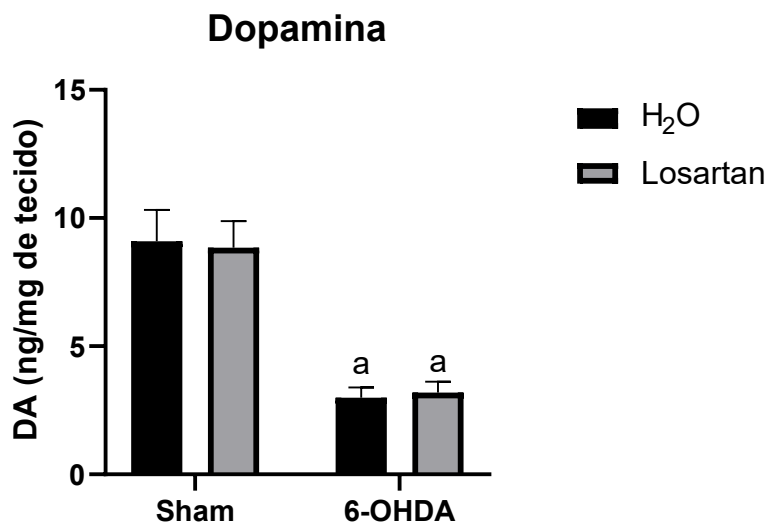
Os dados referentes a ao estresse oxidativo foram submetidos a uma análise exploratória para avaliar a distribuição normal (Shapiro-Wilk). Foram analisados por teste T não pareado para amostras normais e Teste de Mann-Whitney para amostras não paramétricas.

## 4.2.3 RESULTADOS

### 4.2.3.1 Protocolo A - Tratamento de 7 dias com Losartan ou solução veículo, com ou sem lesão por 6-OHDA

#### Concentração de DA após tratamento de 7 dias com Losartan ou solução veículo, com ou sem lesão por 6-OHDA

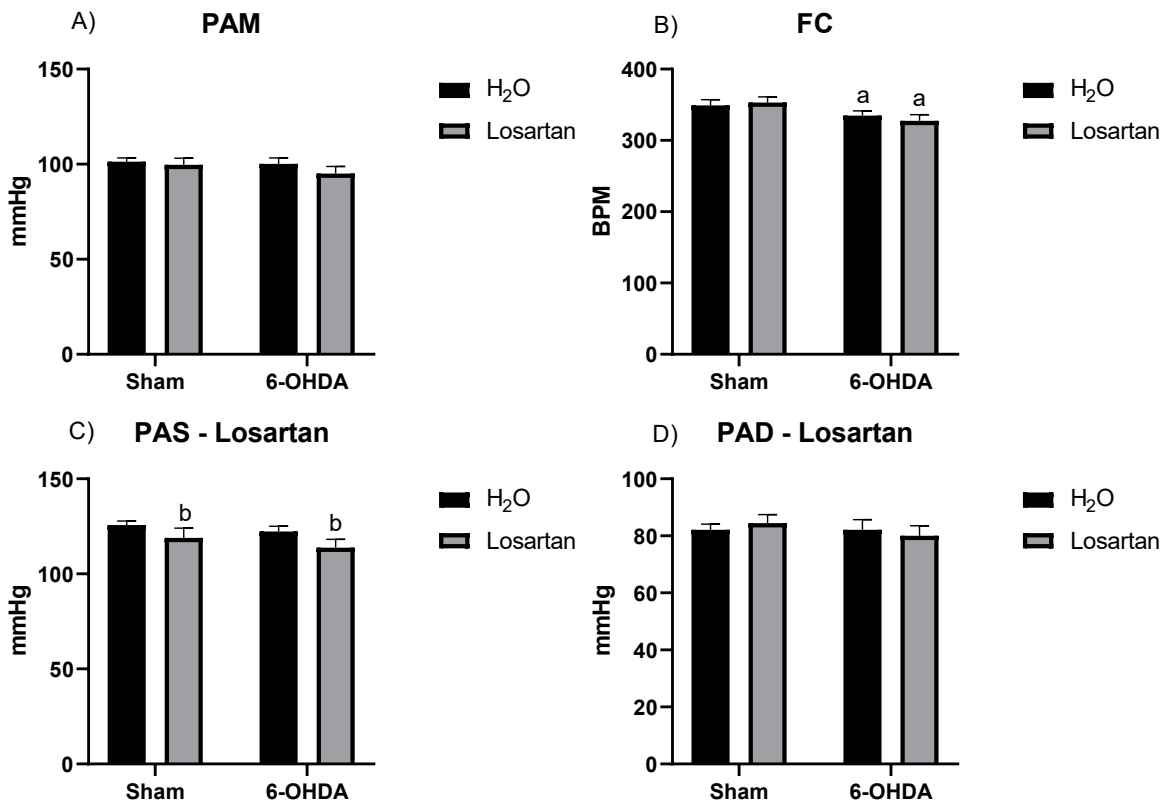
Na quantificação de DA (Fig. 16) após 7 dias da indução do parkinsonismo, não houve interação entre tratamento com Losartan e a lesão por 6-OHDA ( $F(1, 32) = 0,06580$ ;  $P=0,7992$ ). Houve efeito da lesão por 6-OHDA ( $F(1, 32) = 46,1$ ;  $P<0,0001$ ) e não houve efeito do tratamento com Losartan ( $F(1, 32) = 0,0008540$ ;  $p=0,9769$ ). Os animais 6-OHDA apresentam diminuição na concentração de DA após 7 dias de lesão em relação aos seus controles (Sham-H<sub>2</sub>O:  $9,09 \pm 1,22$ ; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O:  $3,00 \pm 0,40$ ; Sham-Losartan:  $8,84 \pm 1,04$ ; 6-OHDA-Losartan:  $3,19 \pm 0,42$ ), independente do tratamento com Losartan.



**Figura 16.** Concentração de dopamina (DA) no estriado após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou infusão de 6-OHDA e tratamento com Losartan (10mg/kg - gavagem) ou H<sub>2</sub>O (gavagem). Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias seguido de pós-teste de Tukey e estão representados como média ± EPM. Sham-H<sub>2</sub>O n = 10; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O n = 11; Sham-Losartan n = 7; 6-OHDA-Losartan = 8. *a* = efeito da lesão de parkinsonismo;  $p<0,0001$  vs Sham.

Parâmetros cardiovasculares após tratamento de 7 dias com Losartan ou solução veículo, com ou sem lesão por 6-OHDA

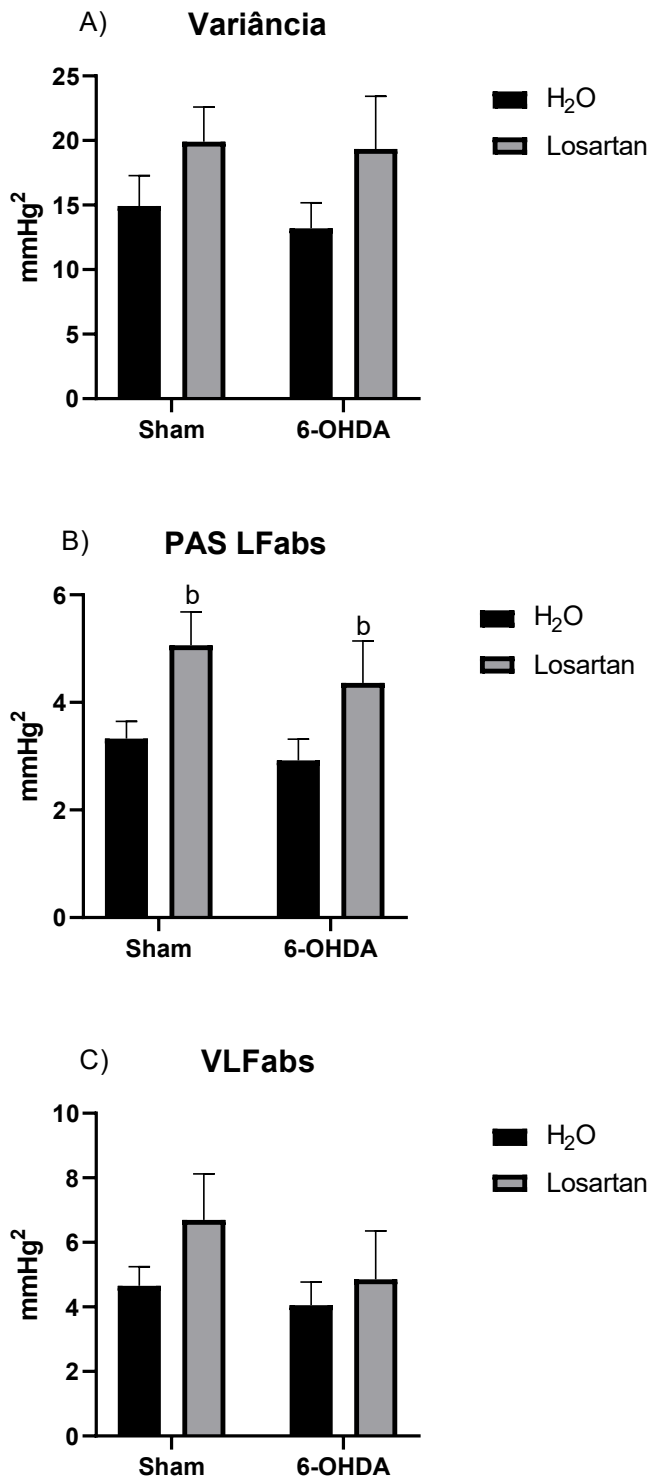
Em relação a PAM (Fig. 17A - Sham-H<sub>2</sub>O: 101,3 ± 1,97; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O: 100,1 ± 3,21; Sham-Losartan: 99,63 ± 3,60; 6-OHDA-Losartan: 95,09 ± 3,70), não houve interação entre as duas variáveis avaliadas e não houve efeito de nenhuma delas. Em relação a FC (Fig. 17B - Sham-H<sub>2</sub>O: 349,3 ± 7,85; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O: 330,8 ± 7,97; Sham-Losartan: 353,1 ± 8,10; 6-OHDA-Losartan: 319,6 ± 10,99), não houve interação entre as variáveis e houve efeito da indução do parkinsonismo na FC ( $F(1, 32) = 6,342$ ;  $P=0,0170$ ), independente do tratamento com Losartan, mostrando um menor valor de FC nos grupos 6-OHDA em relação aos controles Sham. Na PAS (Fig. 17C - Sham-H<sub>2</sub>O: 125,7 ± 2,07; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O: 122,3 ± 2,69; Sham-Losartan: 118,9 ± 5,18; 6-OHDA-Losartan: 113,8 ± 4,34), não houve interação, mas houve efeito do tratamento com Losartan ( $F(1, 32) = 4,871$ ;  $P=0,0346$ ), os animais tratados apresentaram menor PAS que os animais tratados com H<sub>2</sub>O. Na PAD, não houve interação ou efeito para as variáveis (Sham-H<sub>2</sub>O: 82,09 ± 2,01; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O: 82,08 ± 3,61; Sham-Losartan: 84,49 ± 2,94; 6-OHDA-Losartan: 80,01 ± 3,51).



**Figura 17.** Parâmetros basais nos grupos após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou infusão de 6-OHDA e tratamento com Losartan (10mg/kg - gavagem) ou H<sub>2</sub>O (gavagem). (A) Pressão arterial média; (B) Frequência cardíaca; (C) Pressão arterial sistólica e (D) Pressão arterial diastólica. Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias seguido de pós-teste de Tukey e estão representados como média ± EPM. Sham-H<sub>2</sub>O n = 11; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O n = 11; Sham-Losartan n = 7; 6-OHDA-Losartan = 8. **a** = efeito da lesão de parkinsonismo;  $p < 0,05$  vs Sham; **b** = efeito do tratamento Losartan;  $p < 0,05$ .

### Análise da variabilidade da PAS

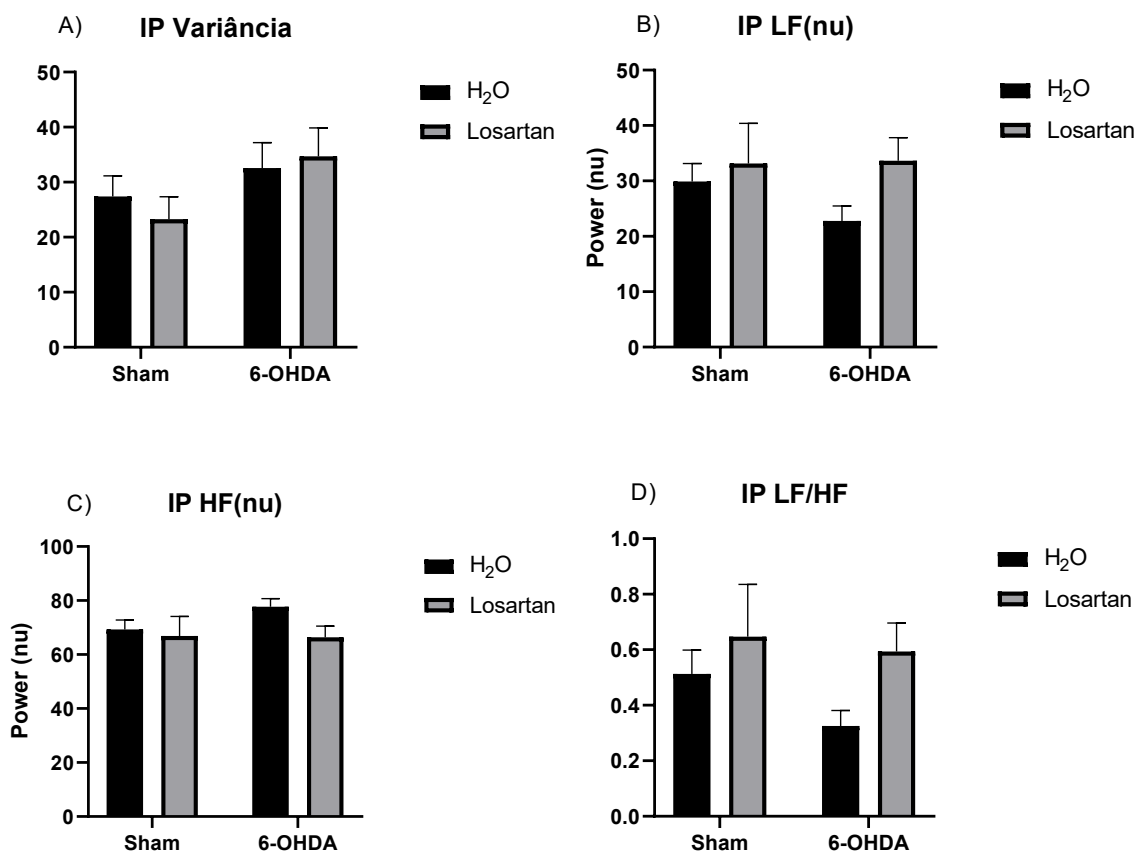
Em relação a variabilidade da PAS (Fig. 18A; Sham-H<sub>2</sub>O:  $14,93 \pm 2,35$ ; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O:  $13,02 \pm 1,98$ ; Sham-Losartan:  $19,9 \pm 2,69$ ; 6-OHDA-Losartan:  $19,34 \pm 4,09$ ), e VLFabs (Fig. 18C; Sham-H<sub>2</sub>O:  $4,52 \pm 0,64$  6-OHDA-H<sub>2</sub>O:  $3,97 \pm 0,71$ ; Sham-Losartan:  $6,70 \pm 1,42$ ; 6-OHDA-Losartan:  $4,86 \pm 1,50$ ) não houve interação ou efeito das variáveis. No componente Lfabs (Fig. 18B; Sham-H<sub>2</sub>O:  $82,09 \pm 2,01$ ; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O:  $82,08 \pm 3,61$ ; Sham-Losartan:  $84,49 \pm 2,94$ ; 6-OHDA-Losartan:  $80,01 \pm 3,51$ ), houve efeito do tratamento com Losartan ( $F(1, 32) = 6,847$ ;  $P = 0,0134$ ).



**Figura 18.** Análise espectral da pressão arterial sistólica (PAS) após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou infusão de 6-OHDA e tratamento com Losartan (10mg/kg – gavagem) ou H<sub>2</sub>O (gavagem). (A) Variância; (B) LFabs e (C) VLFabs. Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias seguido de pós-teste de Tukey e estão representados como média ± EPM. Sham-H<sub>2</sub>O n = 11; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O n = 11; Sham-Losartan n = 7; 6-OHDA-Losartan = 8. PAS = Pressão arterial sistólica; LF = baixa frequência; HF = alta frequência; VLF = muito baixa frequências. **b** = efeito do tratamento Losartan; *p* < 0,05..

### Análise da variabilidade do IP

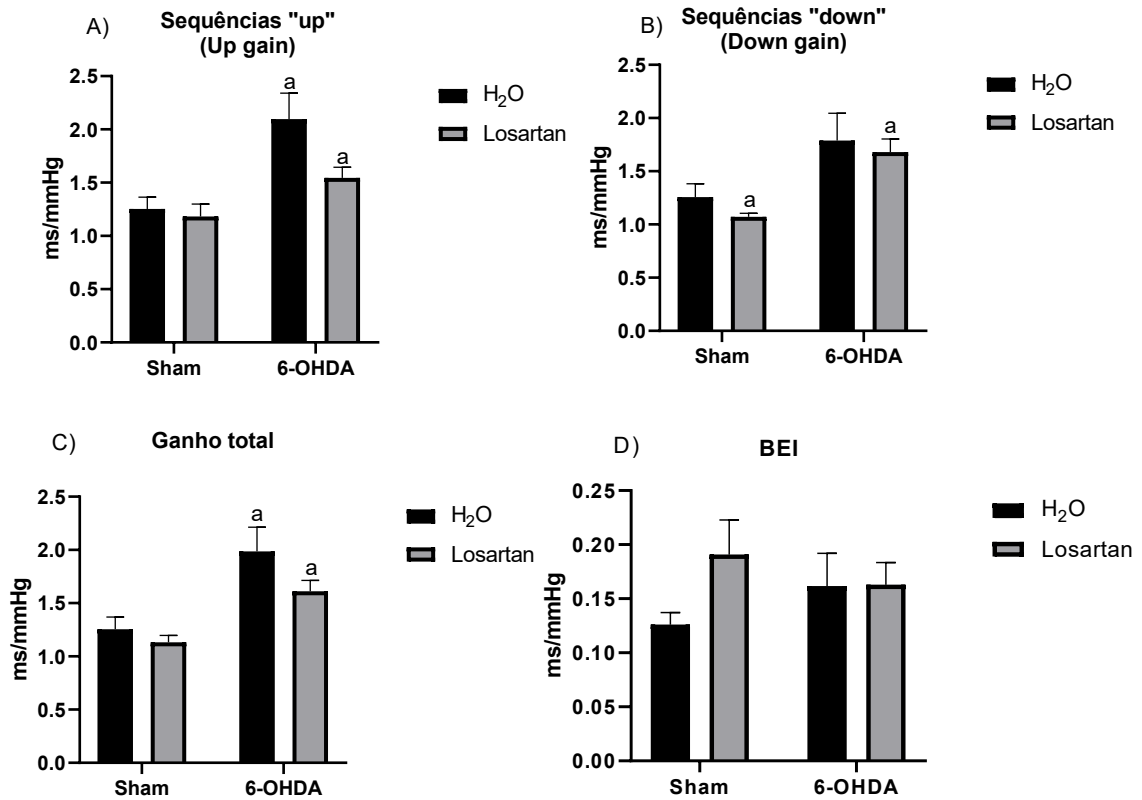
Para a variância do IP (Fig. 19A; Sham-H<sub>2</sub>O: 27,39 ± 3,74; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O: 32,57 ± 4,62; Sham-Losartan: 23,28 ± 4,08; 6-OHDA-Losartan: 34,68 ± 5,20); componente LF(nu) (Fig 19B; Sham-H<sub>2</sub>O: 30,7 ± 11,04; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O: 22,27 ± 9,81; Sham-Losartan: 33,14 ± 19,15; 6-OHDA-Losartan: 33,63 ± 11,87); componente HF(nu) (Fig 19C; Sham-H<sub>2</sub>O: 69,3 ± 3,49; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O: 77,73 ± 2,96; Sham-Losartan: 66,86 ± 7,24; 6-OHDA-Losartan: 66,39 ± 4,19); e relação LF/HF (Fig. 19D; Sham-H<sub>2</sub>O: 0,51 ± 0,08; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O: 0,33 ± 0,06; Sham-Losartan: 0,64 ± 0,18; 6-OHDA-Losartan: 0,59 ± 0,10) não houve efeito do tratamento com Losartan e da lesão por parkinsonismo e não houve interação entre as duas variáveis.



**Figura 19.** Análise espectral do intervalo de pulso (IP) Parâmetros basais nos grupos após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou infusão de 6-OHDA e tratamento com Losartan (10mg/kg – gavagem) ou H<sub>2</sub>O (gavagem). Análise da modulação autonômica em (A) variância de IP, (B) LFnu, (C) HFnu e (D) LF/HF. Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias e estão representados como média ± EPM. Sham-H<sub>2</sub>O n = 11; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O n = 11; Sham-Losartan n = 7; 6-OHDA-Losartan = 8. IP = intervalo de pulso, HF = componente de alta frequência, LF = componente de baixa frequência.

### Análise do barorreflexo espontâneo

A sensibilidade do barorreflexo foi avaliada com os dados das sequências “up” (Fig 20A; Sham-H<sub>2</sub>O: 1,25 ± 0,11; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O: 2,10 ± 0,24; Sham-Losartan: 1,18 ± 0,11; 6-OHDA-Losartan: 1,55 ± 0,10)., sequências “down” (Fig. 20B; Sham-H<sub>2</sub>O: 1,26 ± 0,12; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O: 1,79 ± 0,26; Sham-Losartan: 1,07 ± 0,03; 6-OHDA-Losartan: 1,68 ± 0,12), ganho total (Fig. 20; Sham-H<sub>2</sub>O: 1,26 ± 0,11; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O: 1,99 ± 0,23; Sham-Losartan: 1,13 ± 0,06; 6-OHDA-Losartan: 1,61 ± 0,10) e índice de eficácia do barorreflexo (Fig 20D; Sham-H<sub>2</sub>O: 1,26 ± 0,01; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O: 0,16 ± 0,03; Sham-Losartan: 0,19 ± 0,03; 6-OHDA-Losartan: 1,16 ± 0,02). Na análise do barorreflexo espontâneo, foi possível observar aumento nas sequências “up”, nas sequências “down” e no ganho total nos animais 6-OHDA quando comparados aos animais controle Sham (Sequências “up” - F (1, 32) = 11,68; P=0,0017; Sequências “down” - F (1, 32) = 9,529; P=0,0042; Ganho total - F (1, 32) = 13,38; P=0,0009), independente do tratamento. Não houve interação ou efeito para o índice de efetividade do barorreflexo.

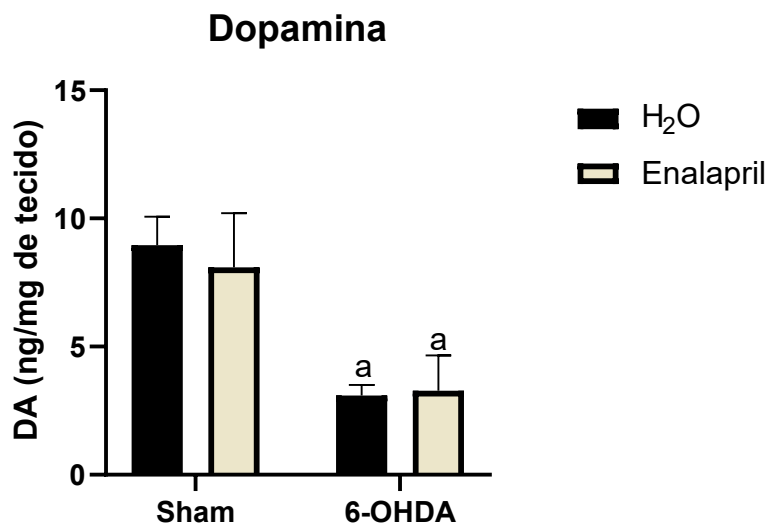


**Figura 20.** Análise do barorreflexo espontâneo após infusão bilateral de 6-OHDA e tratamento com Losartan (10mg/kg – gavagem) ou H<sub>2</sub>O (gavagem). (A) Sequências “up” (Up gain); (B) Sequências “down” (Down gain); (C) Ganho Total; (D) BEI. Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias seguido de pós-teste de Tukey e estão representados como média ± EPM. Sham-H<sub>2</sub>O n = 11; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O n = 11; Sham-Losartan n = 7; 6-OHDA-Losartan = 8. **a** = efeito da lesão de parkinsonismo;  $p < 0,05$  vs Sham; **b** = efeito do tratamento Losartan;  $p < 0,05$ .

#### 4.2.3.2 Protocolo B - Tratamento de 7 dias com Enalapril ou solução veículo, com ou sem lesão por 6-OHDA

##### Concentração de DA após tratamento de 7 dias com Enalapril ou solução veículo, com ou sem lesão por 6-OHDA

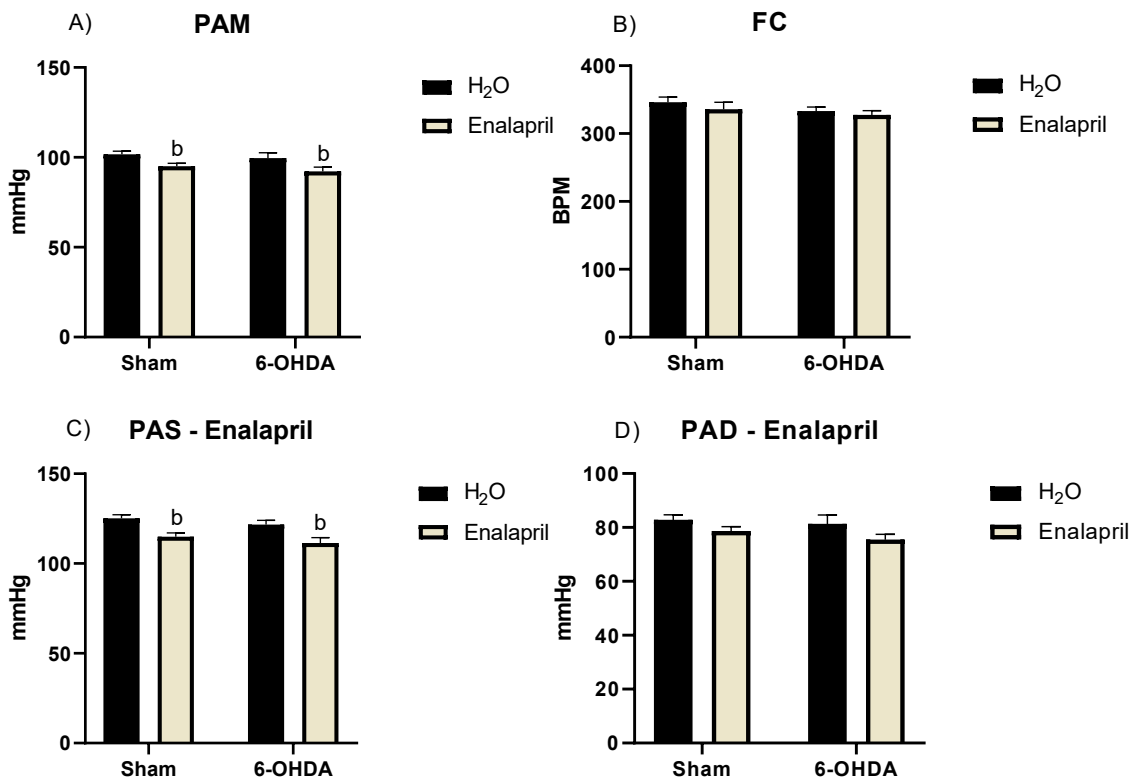
Na quantificação de DA (Fig. 21) após 7 dias da indução do parkinsonismo, não houve interação entre tratamento com Enalapril e a lesão por 6-OHDA ( $F(1, 34) = 0,4312$ ;  $P=0,5158$ ). Houve efeito da lesão por 6-OHDA ( $F(1, 34) = 43,62$ ;  $P<0,0001$ ) e não houve efeito do tratamento com Enalapril ( $F(1, 34) = 0,1725$ ;  $P=0,6805$ ). Os animais 6-OHDA apresentam diminuição na concentração de DA após 7 dias de lesão em relação aos seus controles (Sham-H<sub>2</sub>O:  $8,96 \pm 1,12$ ; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O:  $3,10 \pm 0,42$ ; Sham-Enalapril:  $8,09 \pm 0,71$ ; 6-OHDA-Losartan:  $3,29 \pm 0,51$ ). No entanto, o tratamento com Enalapril não preveniu a perda de DA nos grupos tratados com Enalapril.



**Figura 21.** Concentração de dopamina (DA) no estriado após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou infusão de 6-OHDA e tratamento com Enalapril (10mg/kg - gavagem) ou H<sub>2</sub>O (gavagem). Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias seguido de pós-teste de Tukey e estão representados como média ± EPM. Sham-H<sub>2</sub>O n = 11; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O n = 11; Sham-Enalapril n = 9; 6-OHDA-Enalapril = 8. \*\*\* $p<0,001$ ; \*\*\*\*  $p<0,0001$ . **a** = efeito da lesão de parkinsonismo;  $p<0,05$  vs Sham.

Parâmetros cardiovasculares após tratamento de 7 dias com Enalapril ou solução veículo, com ou sem lesão por 6-OHDA

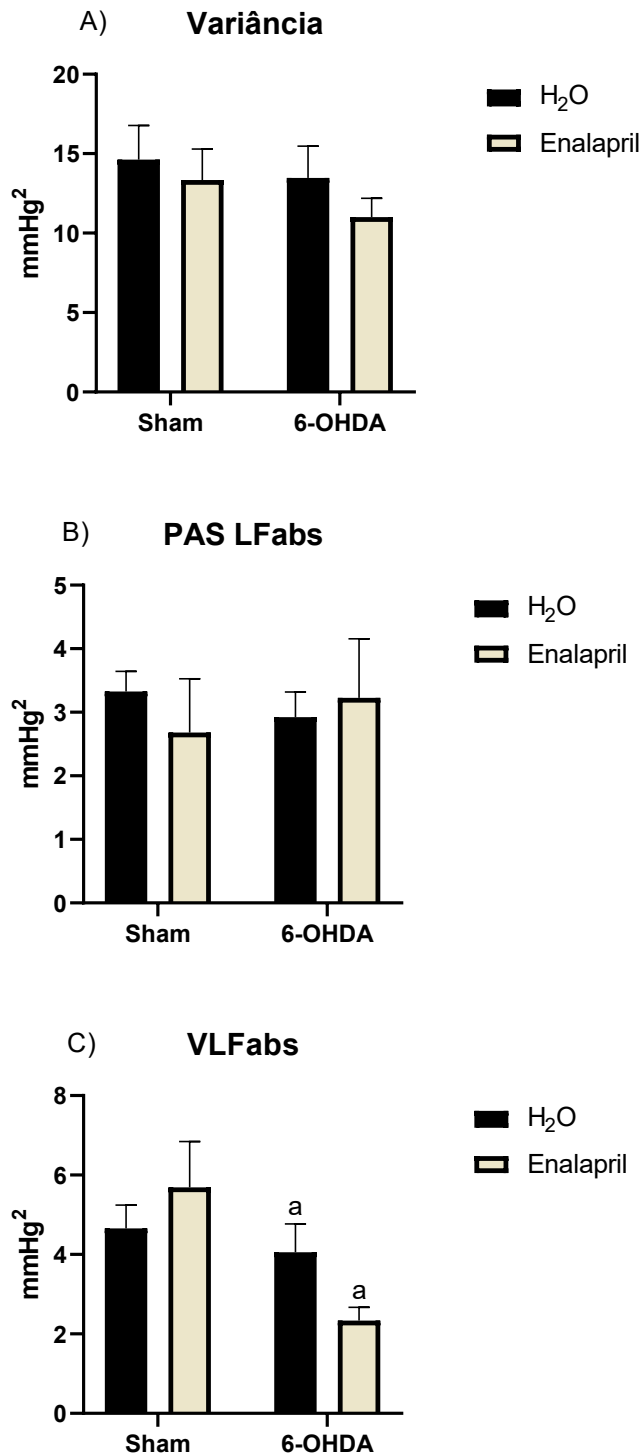
Em relação aos parâmetros cardiovasculares basais, não interação entre as variáveis para PAM (Fig 22A; Sham-H<sub>2</sub>O: 101,6 ± 1,80; 6-OHDA- H<sub>2</sub>O: 99,56 ± 3,00; Sham-Enalapril: 95,08 ± 1,64; 6-OHDA-Losartan: 92,236 ± 2,29), FC (Fig 22B; Sham-H<sub>2</sub>O: 346,2 ± 7,75; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O: 329,1 ± 7,01; Sham-Enalapril: 334,2 ± 11,83; 6-OHDA-Losartan: 327,6 ± 6,40), e PAD (Fig 22D; Sham- H<sub>2</sub>O: 82,77 ± 1,95; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O: 81,28 ± 3,38; Sham-Enalapril: 78,64 ± 1,62; 6-OHDA-Losartan: 75,5 ± 1,97). Em relação a PAM e PAS (PAM - F (1, 34) = 8,560; P=0,0061; PAS - F (1, 34) = 19,26; P=0,0001), ou seja, o tratamento com enalapril promoveu redução nos valores de PAM e PAS nos animais tratados em relação aos animais tratados com grupo H<sub>2</sub>O. E, na PAD e FC, não houve efeito da lesão por 6-OHDA e do tratamento com Enalapril.



**Figura 22.** Parâmetros basais nos grupos após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou infusão de 6-OHDA e tratamento com Enalapril (10mg/kg - gavagem) ou H<sub>2</sub>O (gavagem). (A) Pressão arterial média; (B) Frequência cardíaca; (C) Pressão arterial sistólica e (D) Pressão arterial diastólica. Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias seguido de pós-teste de Tukey e estão representados como média ± EPM. Sham-H<sub>2</sub>O n = 11; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O n = 11; Sham-Enalapril n = 9; 6-OHDA-Enalapril = 8. **a** = efeito da lesão de parkinsonismo;  $p < 0,05$  vs Sham; **b** = efeito do tratamento Losartan;  $p < 0,05$ .

### Análise da variabilidade da PAS

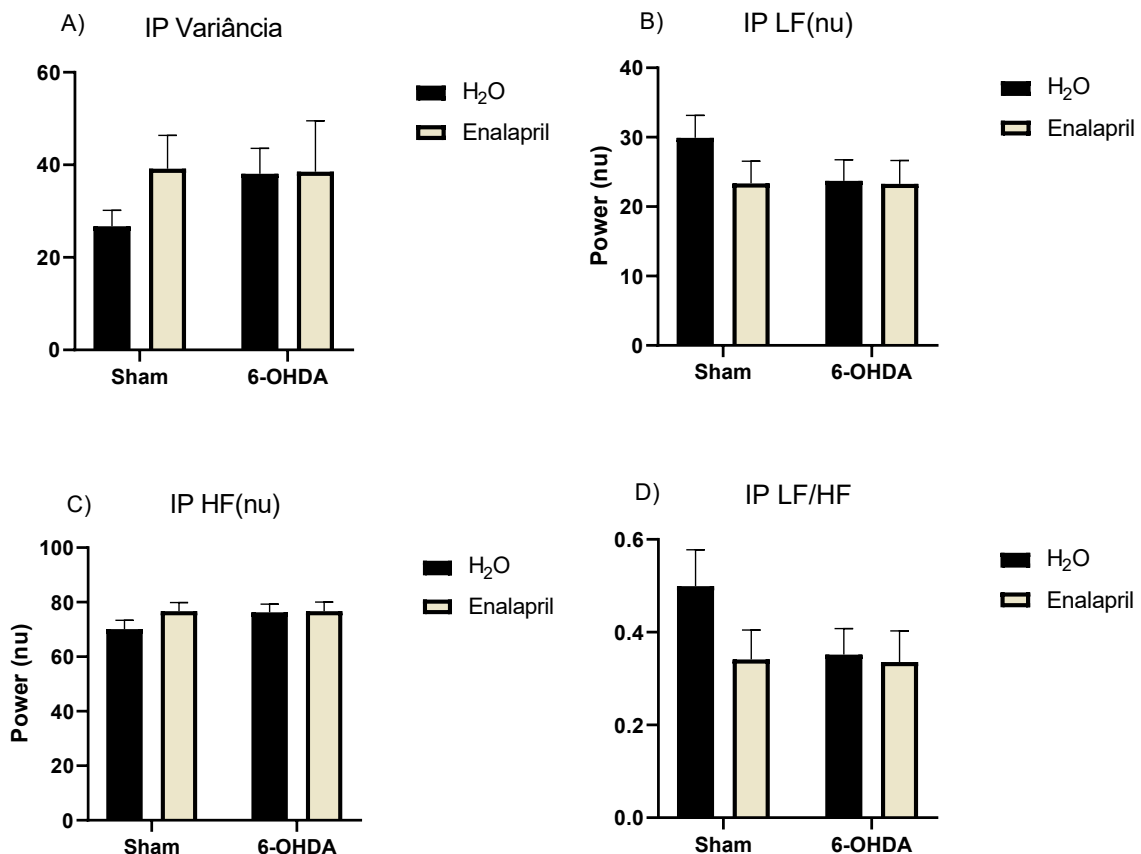
A variabilidade da PAS é avaliada por meio da variância, componente LFabs e componente VLF abs. Na variabilidade da PAS, não houve efeito ou interação para a variância (Fig 23A, Sham- Sham-H<sub>2</sub>O: 14,63 ± 12,14; 6-OHDA- H<sub>2</sub>O: 13,48 ± 1,99; Sham-Enalapril: 13,34 ± 1,95; 6-OHDA-Enalapril: 11,01 ± 1,19) e para o componente LFabs (Fig 23B, Sham- Sham-H<sub>2</sub>O: 3,33 ± 0,32; 6-OHDA- H<sub>2</sub>O: 2,93 ± 0,40; Sham-Enalapril: 3,16 ± 0,44; 6-OHDA-Enalapril: 2,71 ± 0,49. No componente VLFabs Fig 23C, Sham- Sham-H<sub>2</sub>O: 4,66 ± 0,59; 6-OHDA- H<sub>2</sub>O: 3,88 ± 0,73; Sham-Enalapril: 5,70 ± 1,15; 6-OHDA-Enalapril: 2,33 ± 0,34), houve efeito da lesão por 6-OHDA (F (1, 34) = 6,272; P=0,0172).



**Figura 23.** Análise espectral da pressão arterial sistólica (PAS) após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou infusão de 6-OHDA e tratamento com Enalapril (10mg/kg – gavagem) ou H<sub>2</sub>O (gavagem). (A) Variância; (B) LFabs e (C) VLFabs. Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias seguido de pós-teste de Tukey e estão representados como média ± EPM. Sham-H<sub>2</sub>O n = 11; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O n = 11; Sham-Enalapril n = 9; 6-OHDA-Enalapril = 8. PAS = Pressão arterial sistólica; LF = baixa frequência; HF = alta frequência; VLF = muito baixa frequência. **a** = efeito da lesão de parkinsonismo;  $p < 0,05$  vs Sham

### Análise da variabilidade do IP

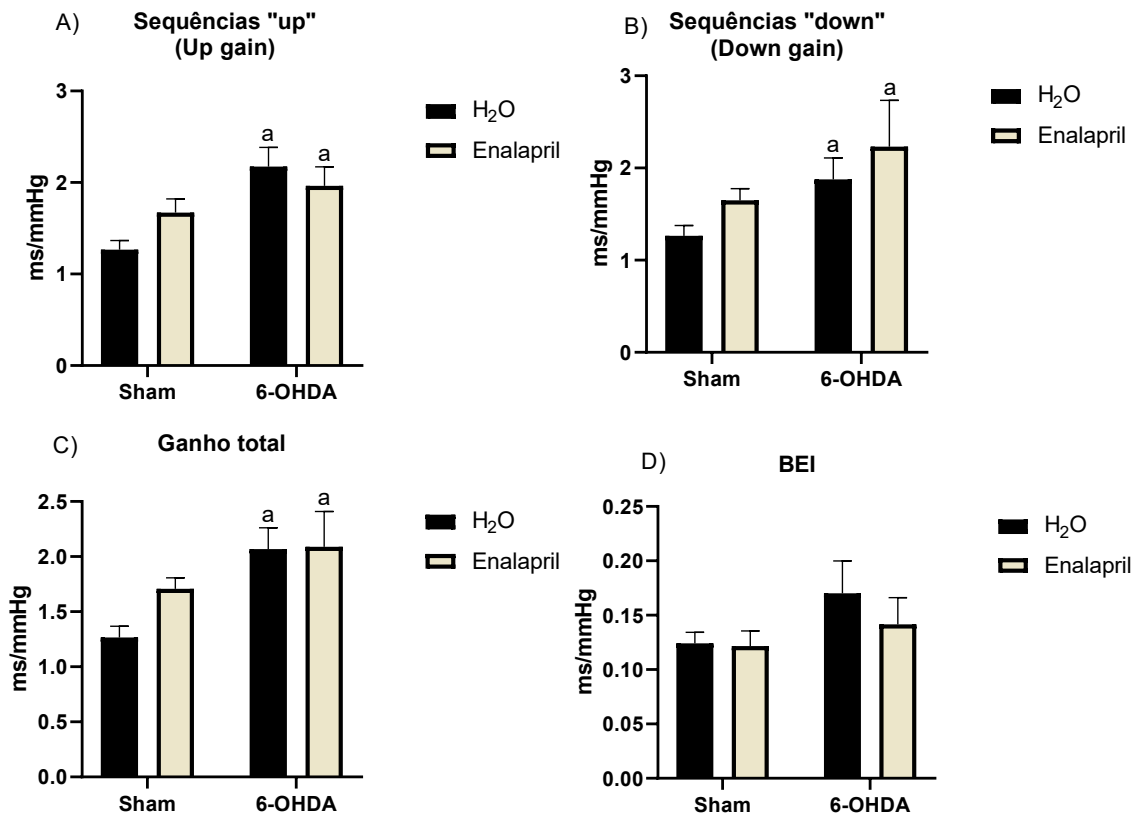
Em relação a variabilidade do IP, foram avaliados os seguintes componentes: IP variância (Fig. 24A - Sham-H<sub>2</sub>O: 26,73 ± 3,45; 6-OHDA- H<sub>2</sub>O: 38,08 ± 5,47; Sham-Enalapril: 39,18 ± 7,21; 6-OHDA-Enalapril: 38,54 ± 10,99); componente Lf(nu) (Fig. 24B - Sham-H<sub>2</sub>O: 29,91 ± 3,26; 6-OHDA- H<sub>2</sub>O: 23,36 ± 2,93; Sham-Enalapril: 23,33 ± 3,23; 6-OHDA-Enalapril: 23,29 ± 3,35); componente Hf(nu) (Fig. 24C - Sham-H<sub>2</sub>O: 70,09 ± 3,26; 6-OHDA- H<sub>2</sub>O: 76,64 ± 2,93; Sham-Enalapril: 76,67 ± 3,23; 6-OHDA-Enalapril: 76,71 ± 3,35) e relação LF/HF (Fig. 24D - Sham-H<sub>2</sub>O: 0,47 ± 0,08; 6-OHDA- H<sub>2</sub>O: 0,34 ± 0,05; Sham-Enalapril: 0,34 ± 0,06; 6-OHDA-Enalapril: 0,34 ± 0,07). Para os 4 componentes, não houve interação e efeito do tratamento ou efeito da lesão por 6-OHDA.



**Figura 24.** Análise espectral do intervalo de pulso (IP) Parâmetros basais nos grupos após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou infusão de 6-OHDA e tratamento com Enalapril (10mg/kg – gavagem) ou H<sub>2</sub>O (gavagem). Análise da modulação autonômica em (A) variância de IP, (B) LFnu, (C) HFnu e (D) LF/HF. Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias e estão representados como média ± EPM Sham-H<sub>2</sub>O n = 11; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O n = 11; Sham-Enalapril n = 9; 6-OHDA-Enalapril = 8.. IP = intervalo de pulso, HF = componente de alta frequência, LF = componente de baixa frequência.

### Análise do barorreflexo espontâneo

A sensibilidade do barorreflexo foi avaliada com os dados das sequências “up” (Fig. 25A - Sham-H<sub>2</sub>O:  $1,27 \pm 0,10$ ; 6-OHDA- H<sub>2</sub>O:  $2,34 \pm 0,22$ ; Sham-Enalapril:  $1,68 \pm 0,15$ ; 6-OHDA-Enalapril:  $1,97 \pm 0,20$ ), sequências “down” (Fig. 24B - Sham-H<sub>2</sub>O:  $1,26 \pm 0,11$ ; 6-OHDA- H<sub>2</sub>O:  $2,19 \pm 0,37$ ; Sham-Enalapril:  $1,65 \pm 0,13$ ; 6-OHDA-Enalapril:  $1,95 \pm 0,44$ ), ganho total (Fig. 25C - Sham-H<sub>2</sub>O:  $1,27 \pm 0,10$ ; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O:  $2,31 \pm 0,27$ ; Sham-Enalapril:  $1,71 \pm 0,10$ ; 6-OHDA-Enalapril:  $2,09 \pm 0,32$ ) e índice de eficácia do barorreflexo (Fig. 24D - Sham-H<sub>2</sub>O:  $0,12 \pm 0,01$ ; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O:  $0,17 \pm 0,03$ ; Sham-Enalapril:  $0,12 \pm 0,01$ ; 6-OHDA-Enalapril:  $0,14 \pm 0,02$ ). Na análise do barorreflexo espontâneo, foi possível observar aumento nas sequências “up”, nas sequências “down” e no ganho total nos animais 6-OHDA quando comparados aos animais controle Sham (Sequências “up” -  $F(1, 34) = 11,93$   $P=0,0015$ ; Sequências “down” -  $F(1, 34) = 5,846$ ;  $P=0,0211$ ; Ganho total -  $F(1, 34) = 10,49$ ;  $P=0,0027$ ), independente do tratamento. Não houve interação ou efeito para o índice de efetividade do barorreflexo.

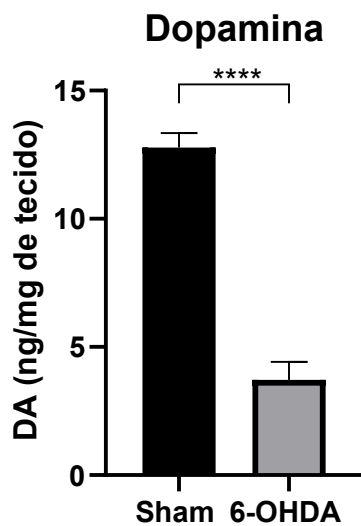


**Figura 25.** Análise do barorreflexo espontâneo após infusão bilateral de 6-OHDA e tratamento com Losartan (10mg/kg – gavagem) ou H<sub>2</sub>O (gavagem). (A) Sequências “up” (Up gain); (B) Sequências “down” (Down gain); (C) Ganho Total; (D) BEI. Os dados foram analisados por ANOVA de 2 vias seguido de pós-teste de Tukey e estão representados como média  $\pm$  EPM. Sham-H<sub>2</sub>O n = 11; 6-OHDA-H<sub>2</sub>O n = 11; Sham-Enalapril n = 9; 6-OHDA-Enalapril = 8. **a** = efeito da lesão de parkinsonismo;  $p < 0,05$  vs Sham

#### 4.2.3.3 Protocolo C - Análise dos parâmetros cardiovasculares basais (PAM e FC) em animais com ou sem lesão por 6-OHDA, após injeção endovenosa de salina (1mg/Kg) e de Losartan (10mg/Kg)

##### Concentração de DA após 7 dias de lesão por 6-OHDA

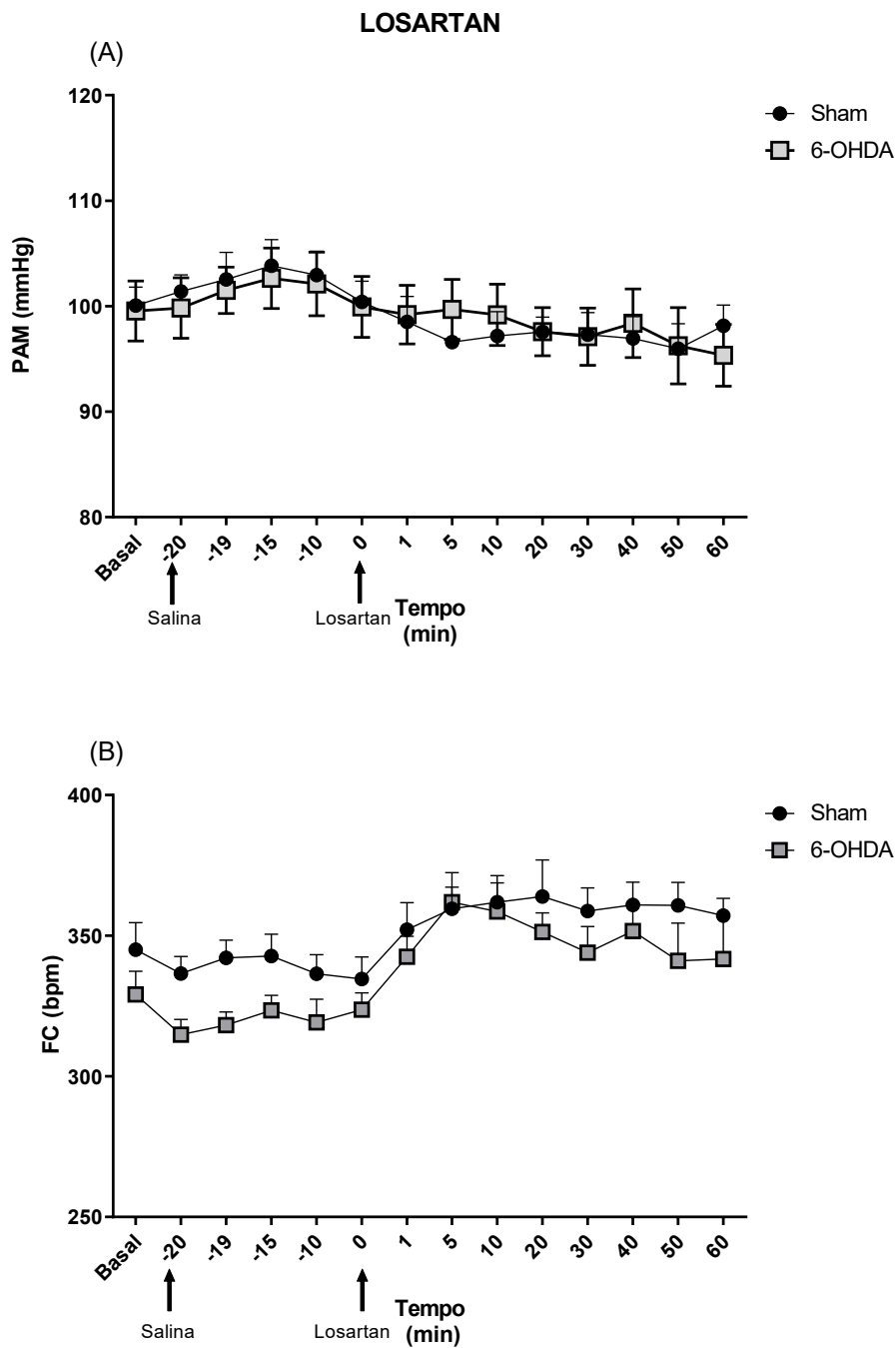
A análise neuroquímica mostra que após 7 dias de lesão por 6-OHDA houve redução na concentração de DA estriatal, confirmando a eficácia da lesão no grupo 6-OHDA em relação ao seu controle ( $p < 0,0001$ , Sham  $12,79 \pm 0,56$ ; 6-OHDA  $3,72 \pm 0,71$ ).



**Figura 26.** Concentração de dopamina (DA) no estriado após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou infusão de 6-OHDA. Os dados foram analisados por teste T não pareado e estão representados como média  $\pm$  EPM. Sham  $n = 7$ ; 6-OHDA  $n = 6$ . \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Análise dos parâmetros cardiovasculares basais (PAM e FC) em animais com ou sem lesão por 6-OHDA, após injeção endovenosa de salina (1mg/Kg) e de Losartan (10mg/Kg)

Foi realizada a injeção in bolus de salina 0,9% (1mg/kg) após 30 minutos de registro basal da PAM e FC e, após 20 minutos, a injeção in bolus de Losartan (10mg/kg) foi efetuada, seguido do registro por 1h dos parâmetros cardiovasculares. No tempo -20, foi realizada a administração de salina e no tempo 0, a administração de Losartan. A evolução temporal dos valores médios da PAM e FC entre os grupos experimentais após a administração in bolus de salina e Losartan está representada na Figura 27. Após injeção de salina não houve alterações nos parâmetros cardiovasculares de PAM e FC em todos os grupos experimentais. A administração de Losartan levou a queda sutil de PAM e aumento FC para todos os animais (Fig. 27), porém não houve diferença entre o grupo sham com o 6-OHDA em nenhum dos tempos avaliados.

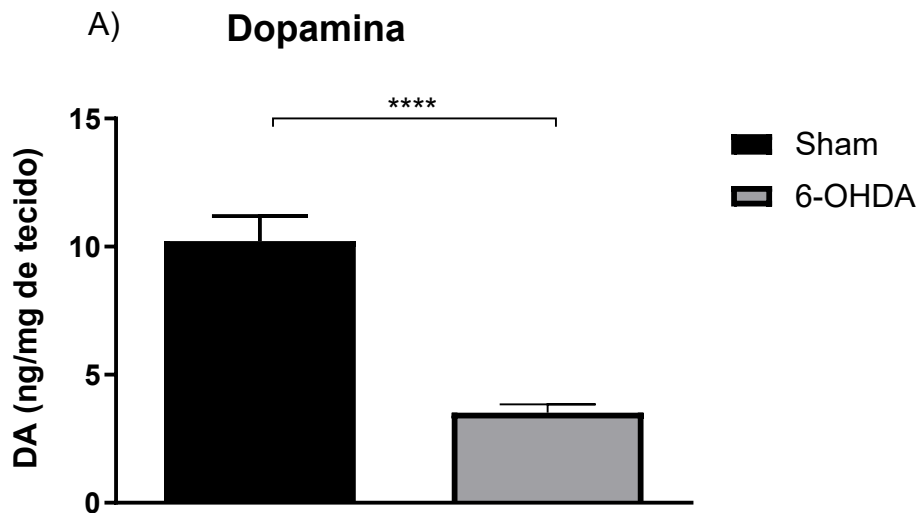


**Figura 27.** Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (a) e na frequência cardíaca (FC) (b), após a administração endovenosa de salina (tempo - 20) e de Losartan (10 mg/kg – tempo 0) em animais com ou sem lesão por 6-OHDA. Os valores estão expressos em média + EPM, os dados foram analisados por RMANOVA two-way, seguido do pós teste de Bonferroni). Sham n = 7; 6-OHDA n = 6.

#### 4.2.3.4 Protocolo D - Análise dos parâmetros cardiovasculares basais (PAM e FC) em animais com ou sem lesão por 6-OHDA, após injeção endovenosa de salina (1mg/Kg) e de Enalapril (10mg/Kg)

##### Concentração de DA após 7 dias de lesão por 6-OHDA

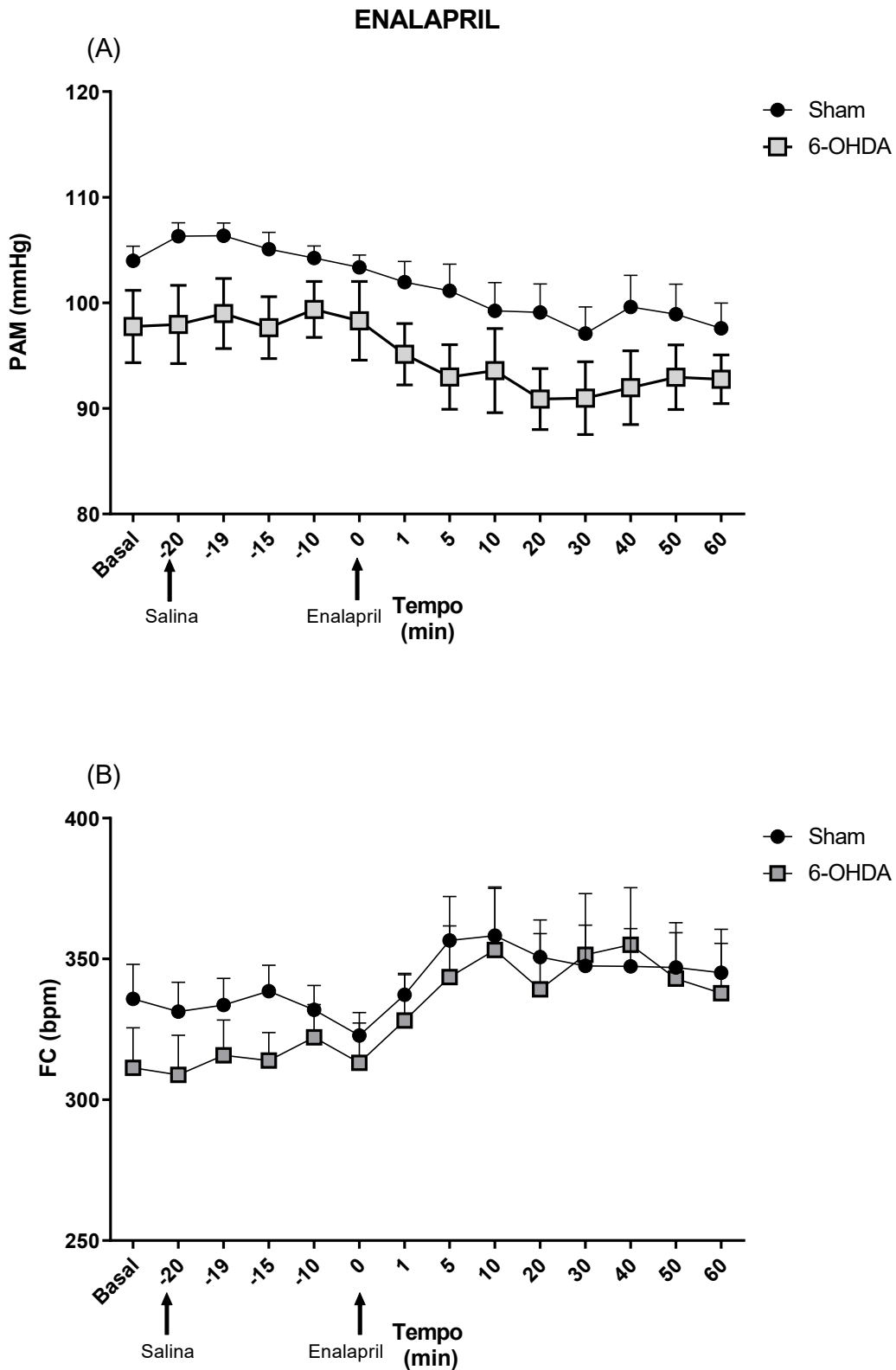
A análise neuroquímica mostra que após 7 dias de lesão por 6-OHDA houve redução na concentração de DA estriatal, confirmando a eficácia da lesão no grupo 6-OHDA em relação ao seu controle ( $p < 0,0001$ , Sham  $10,21 \pm 0,99$ ; 6-OHDA  $3,52 \pm 0,32$ ).



**Figura 28.** Concentração de dopamina (DA) no estriado após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou infusão de 6-OHDA. Os dados foram analisados por teste T não pareado e estão representados como média  $\pm$  EPM. Sham  $n = 8$ ; 6-OHDA  $n = 6$ . \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Análise dos parâmetros cardiovasculares basais (PAM e FC) em animais com ou sem lesão por 6-OHDA, após injeção endovenosa de salina (1mg/Kg) e de Enalapril (10mg/Kg)

Foi realizada a injeção in bolus de salina 0,9% (1mg/kg) após 30 minutos de registro basal da PAM e FC e, após 20 minutos, a injeção in bolus de Enalapril (10mg/kg) foi efetuada, seguido do registro por 1h dos parâmetros cardiovasculares. No tempo -20, foi realizada a administração de salina e no tempo 0, a administração de Enalapril. A evolução temporal dos valores médios da PAM e FC entre os grupos experimentais após a administração in bolus de salina e Enalapril está representada na Figura 29. Após injeção de salina não houve alterações nos parâmetros cardiovasculares de PAM e FC em todos os grupos experimentais. A administração de Enalapril levou a queda sutil de PAM e aumento FC para todos os animais (Fig 29), porém não houve diferença entre o grupo sham com o 6-OHDA em nenhum dos tempos avaliados.

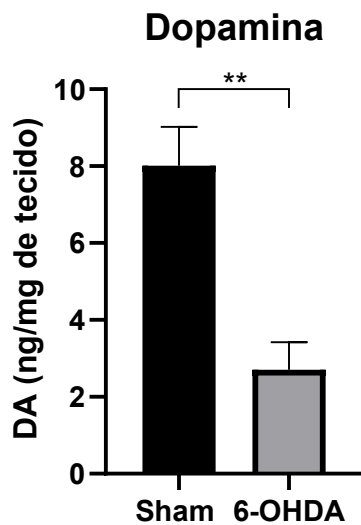


**Figura 29.** Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (a) e na frequência cardíaca (FC) (b), após a administração endovenosa de salina (tempo - 20) e de Enalapril (10 mg/kg – tempo 0) em animais com ou sem lesão por 6-OHDA. Os valores estão expressos em média + EPM, os dados foram analisados por RMANOVA two-way, seguido do pós teste de Bonferroni). Sham n = 8; 6-OHDA n = 6.

#### 4.2.3.5 Avaliação do balanço redox

##### Concentração de DA após 7 dias de lesão por 6-OHDA

A análise neuroquímica mostra que após 7 dias de lesão por 6-OHDA houve redução na concentração de DA estriatal, confirmando a eficácia da lesão no grupo 6-OHDA em relação ao seu controle ( $p < 0,0001$ , Sham  $8,01 \pm 1,01$ ; 6-OHDA  $2,70 \pm 0,71$ ).



**Figura 30.** Concentração de dopamina (DA) no estriado após 7 dias de lesão bilateral com veículo ou infusão de 6-OHDA. Os dados foram analisados por teste T não pareado e estão representados como média  $\pm$  EPM. Sham  $n = 8$ ; 6-OHDA  $n = 6$ . \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

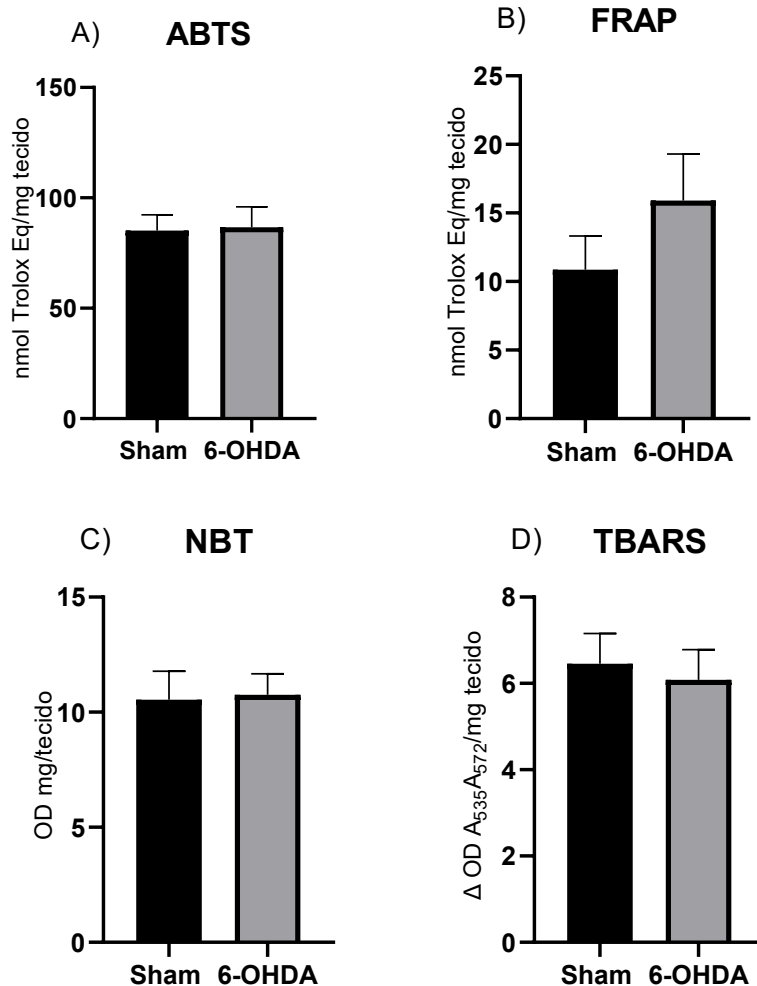
##### Avaliação do balanço redox na aorta abdominal

A avaliação da capacidade oxidante e antioxidante foi realizada através dos ensaios de Abts que avalia a capacidade antioxidante total através da neutralização do radical cátion ABTS+ e Frap que tem a capacidade de reduzir o íon ferro, Nbt que avalia a produção do ânion superóxido e Tbars que avalia a peroxidação lipídica pela concentração de tiobarbitúricos. Dessa forma, os dois primeiros testes representam a capacidade antioxidante e os dois últimos a capacidade pró-oxidante.

Na aorta abdominal não foram observadas diferenças estatisticamente significantes para os ensaios de FRAP (Sham:  $10,86 \pm 2,46$ ; 6-OHDA:  $15,91 \pm 3,39$ ), ABTS (Sham:  $85,21 \pm 7,12$ ; 6-OHDA:  $86,72 \pm 9,20$ ), NBT (Sham:  $10,55 \pm 1,22$ ; 6-

OHDA:  $10,75 \pm 0,92$ ) e TBARS (Sham:  $6,45 \pm 0,70$ ; 6-OHDA:  $6,08 \pm 0,70$ ) após 7 dias de lesão por 6-OHDA ( $p > 0,05$ ).

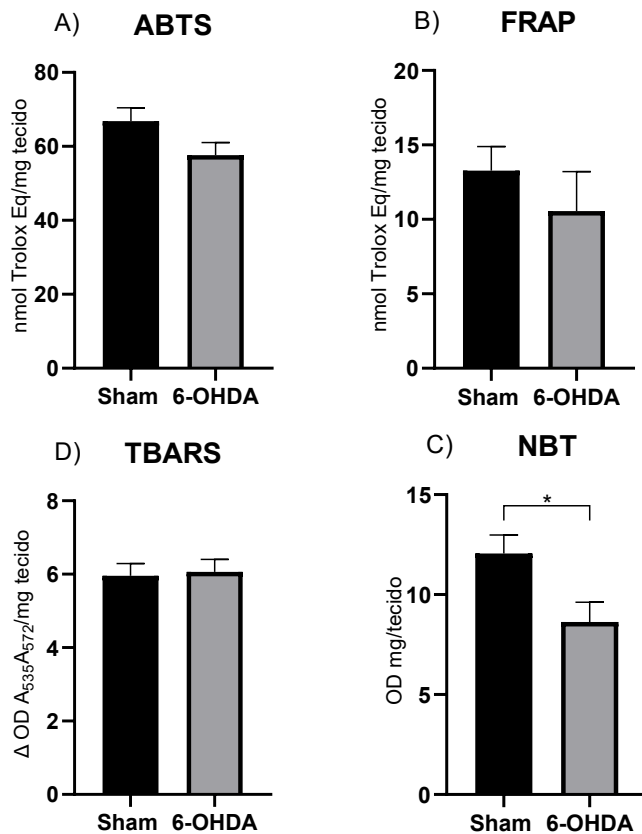
### AORTA ABDOMINAL



**Figura 31.** Efeitos da indução do parkinsonismo no balanço redox da aorta abdominal. Parâmetros antioxidantes expressos pela análise de FRAP e ABTS e pró-oxidantes expressos pelos ensaios de NBT e T-BARS. Os ensaios foram realizados em ratos Sham e com lesão bilateral de 6-OHDA. Teste t-Student. Valores expressos como média  $\pm$  EPM,  $n=6-8$  por grupo.

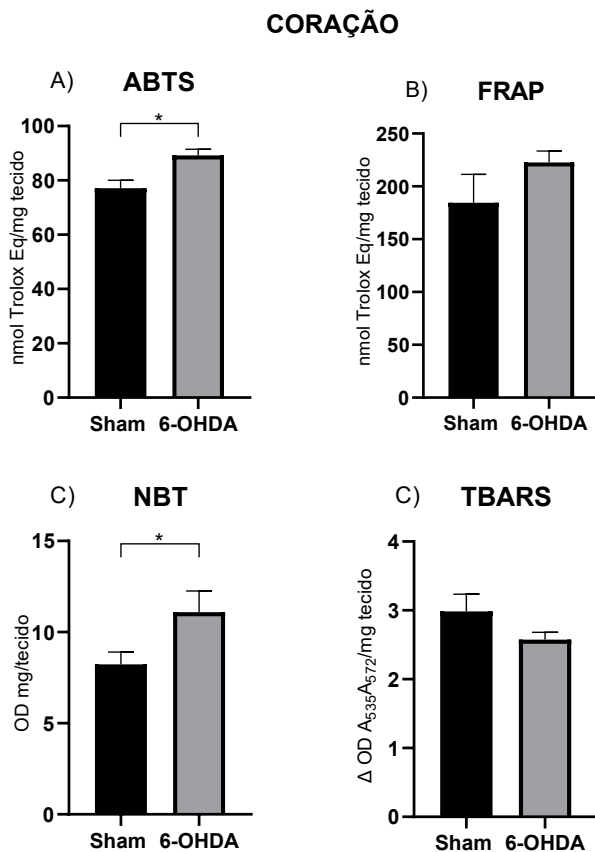
Na avaliação do tecido da aorta torácica, o ensaio ABTS (Sham:  $66,86 \pm 3,56$ ; 6-OHDA:  $57,63 \pm 3,38$ ), FRAP (Sham:  $13,27 \pm 1,62$ ; 6-OHDA:  $10,56 \pm 2,65$ ) e TBARS (Sham:  $5,72 \pm 0,44$ ; 6-OHDA:  $5,51 \pm 0,52$ ) não mostraram diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ). Porém o ensaio pró-oxidantes NBT (Sham:  $12,06 \pm 0,93$ ; 6-OHDA:  $8,63 \pm 0,98$ ) no grupo 6-OHDA está diminuído em comparação ao grupo Sham.

### AORTA TORÁCICA



**Figura 32.** Efeitos da indução do parkinsonismo no balanço redox da aorta torácica. Parâmetros antioxidantes expressos pela análise de FRAP e ABTS e pró-oxidantes expressos pelos ensaios de NBT e T-BARS. Os ensaios foram realizados em ratos Sham e com lesão bilateral de 6-OHDA. Teste t-Student. Valores expressos como média  $\pm$  EPM,  $n=6-8$  por grupo.

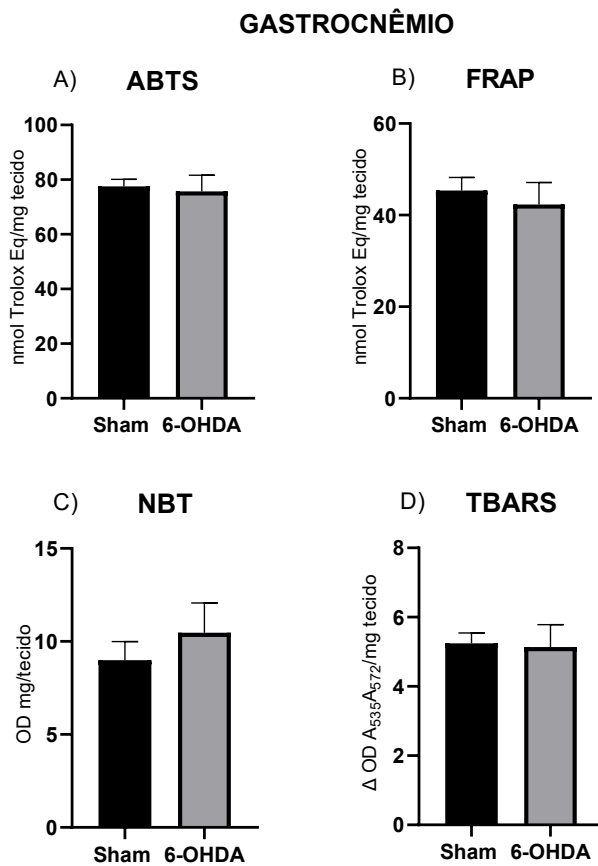
Na avaliação do tecido do coração, os ensaios FRAP (Sham:  $184,4 \pm 26,93$ ; 6-OHDA:  $222,6 \pm 10,88$ ) e TBARS (Sham:  $2,99 \pm 0,25$ ; 6-OHDA:  $2,58 \pm 0,11$ ) não mostraram diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ). Os parâmetros antioxidantes avaliados pelo ABTS (Sham:  $77,1 \pm 2,99$ ; 6-OHDA:  $89,18 \pm 2,27$ ) estão maiores no grupo 6-OHDA em relação ao seu controle ( $p = 0,0104$ ). No entanto, na avaliação da produção de ânion superóxido pelo NBT (Sham:  $8,22 \pm 0,68$ ; 6-OHDA:  $11,09 \pm 1,17$ ), o grupo 6-OHDA está aumentado em comparação ao grupo Sham ( $p = 0,0441$ ).



**Figura 33.** Efeitos da indução do parkinsonismo no balanço redox no coração. Parâmetros antioxidantes expressos pela análise de FRAP e ABTS e pró-oxidantes expressos pelos ensaios de NBT e T-BARS. Os ensaios foram realizados em ratos Sham e com lesão bilateral de 6-OHDA. Teste t-Student. Valores expressos como média  $\pm$  EPM,  $n = 6-8$  por grupo.

Avaliação do balanço redox no músculo gastrocnêmio

No músculo gastrocnêmio, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes para os ensaios de FRAP (Sham:  $45,37 \pm 2,83$ ; 6-OHDA:  $42,33 \pm 4,8$ ), ABTS (Sham:  $77,51 \pm 2,58$ ; 6-OHDA:  $75,68 \pm 5,91$ ), NBT (Sham:  $8,99 \pm 1,01$ ; 6-OHDA:  $10,46 \pm 1,61$ ) e TBARS (Sham:  $5,24 \pm 0,30$ ; 6-OHDA:  $5,14 \pm 0,65$ ) após 7 dias de lesão por 6-OHDA ( $p > 0,05$ ).



**Figura 34.** Efeitos da indução do parkinsonismo no balanço redox no músculo gastrocnêmio. Parâmetros antioxidantes expressos pela análise de FRAP e ABTS e pró-oxidantes expressos pelos ensaios de NBT e T-BARS. Os ensaios foram realizados em ratos Sham e com lesão bilateral de 6-OHDA. Teste t-Student. Valores expressos como média  $\pm$  EPM,  $n=6-8$  por grupo.

#### 4.2.4. Discussão

Neste estudo foi possível investigar o papel da inibição do SRA tanto nos parâmetros cardiovasculares quanto nos parâmetros autonômicos de ratos submetidos ao parkinsonismo após lesão bilateral diretamente na SNpc por infusão de 6-OHDA. Nosso modelo de parkinsonismo foi comprovado pela diminuição dos níveis de DA no estriado dos animais lesados pela infusão de 6-OHDA após 7 dias, e em acordo com outros estudos que utilizaram o mesmo modelo (ARIZA et al. 2015; ARIZA et al., 2015; DE JAGER et al., 2018). No entanto, tanto o tratamento com Losartan como o tratamento com Enalapril subsequente à lesão pela neurotoxina não mostraram proteção significativa contra a perda de DA na região do estriado. No protocolo de Losartan, os parâmetros basais mostram redução de FC nos grupos 6-OHDA em relação aos controles e aumento das sequências “up”, das sequências “down” e do ganho total também nos grupos 6-OHDA. O tratamento com Losartan promoveu diminuição da PAS e aumento do componente LFabs nos animais Sham e 6-ohda tratados com Losartan. No protocolo Enalapril, os parâmetros basais mostram redução de PAM e PAS nos grupos tratados com Enalapril e efeitos do parkinsonismo nas alterações de barorreflexo e variabilidade da PAS. Para todos os resultados de parâmetros cardiovasculares e de variabilidade, não observamos interação entre a lesão do parkinsonismo e o tratamento com os inibidores do receptor AT1 e da ECA. Baseado nos resultados obtidos é possível que a participação do SRA nas alterações cardiovasculares no parkinsonismo bilateral por 6-OHDA em ratos machos seja pequena.

O modelo de parkinsonismo por 6-OHDA, é um modelo clássico, que apresenta alterações comportamentais e motoras da DP (ARIZA et al., 2010; DUTY; JENNER, 2011). No presente estudo, pode-se observar que houve uma diminuição maior que 50% nas concentrações de DA após 7 dias de infusão de 6-OHDA, o que corrobora com outros estudos utilizando o mesmo modelo (ARIZA et al., 2015; DE JAGER et al., 2018; AMORIM et al., 2019). Este é o grau de depleção encontrado em modelos animais que tentam mimetizar as fases iniciais da DP, em conjunto com o aparecimento dos sintomas motores (DUTY; JENNER, 2011; RODRIGUEZ-OROZ et al., 2009). Moradganjeh e colaboradores (2013) observaram neuroproteção através do tratamento com Losartan utilizando dosagem superior (90mg/kg-ip) em ratos lesionados unilateralmente pela 6-OHDA. O tratamento teve início 6 dias antes da

cirurgia de indução do parkinsonismo e durou até um dia após a lesão (MORADGANJEH; ZIAI; ROGHANI, 2013). Outro trabalho utilizando animais lesionados pelo MPTP (10mg/kg) utilizou administração subcutânea do fármaco, tendo duração total de 16 dias, com início dois dias antes da lesão (GRAMMATOPOULOS *et al.*, 2007). Lopez-Real (2005) realizou um tratamento com inibidor da ECA 6 dias antes da lesão e 3 dias após a lesão unilateral de 6-OHDA em ratos. Foi possível observar redução na perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc (LOPEZ-REAL *et al.*, 2005). Contudo, este é o primeiro trabalho a avaliar a ação dos antagonistas dos receptores AT1 e da ECA em animais lesionados bilateralmente pela 6-OHDA. É relevante destacar que a perda de DA, consequente do modelo empregado nesse trabalho, é mais rápida e progressiva em comparação às lesões de outros modelos experimentais, o que pode justificar a ausência de efeito. Assim também, poderia ser benéfico o tratamento com os inibidores antes e após a lesão e dessa forma obter-se um efeito mais acentuado.

Quanto aos parâmetros basais, foi observado redução na FC nos animais 6-OHDA do protocolo Losartan, independente de tratamento. A PAS e PAM foram menores no grupo 6-OHDA-Enalapril e no grupo Sham-Enalapril em relação ao grupo 6-OHDA-H2O e Sham-H2O, havendo efeito do tratamento nesta análise. Pelo fato de Enalapril ser um pró-fármaco bastante utilizado no tratamento da hipertensão por meio da inibição da ECA, era esperado redução na PAS e na PAM. No Losartan, foi observado redução somente na PAS após tratamento de 7 dias. Em relação à variabilidade, estudos mostram que os animais induzidos ao parkinsonismo por 6-OHDA apresentam variabilidade reduzida da PAS e maior atividade barorreflexa (ARIZA *et al.*, 2015). A variância e o componente LF da PAS não apresentaram efeitos decorrentes da lesão por 6-OHDA, contrastando com dados da literatura realizados com ratos machos submetidos ao parkinsonismo pela 6-OHDA, em que foi observada diminuição na modulação simpática da vasculatura (ARIZA *et al.* 2015; De JAGER, 2018). No nosso trabalho, foi observado alteração no VLF dos animais do protocolo de Enalapril e no componente LFabs nos animais tratados com Losartan. O componente VLF é um índice menos utilizado cujo papel fisiológico não está bem estabelecido e parece estar relacionado ao sistema renina-angiotensina-aldosterona, termorregulação e tônus vasomotor periférico (VANDERLEI *et al.*, 2009).

A variabilidade da FC é uma medida que pode avaliar a modulação do SNA e em condições fisiológicas ou patológicas. Dessa forma, mudanças nestes padrões

funcionam como um indicador de saúde, onde a redução da variabilidade de FC pode funcionar como um indicador patológico (VANDERLEI *et al.*, 2009).. Entretanto, os dados estatísticos para a análise da variabilidade do IP não mostraram alterações entre os quatro grupos tanto para a variância do intervalo de pulso, quanto para os componentes LF e HF e sua análise conjunta, representando o balanço simpatovagal. A análise do barorreflexo espontâneo foi realizada por meio da análise de pequenas flutuações espontâneas da pressão arterial que geram alterações no intervalo RRs (SCHWARTZ *et al.*, 2013). Em ambos os protocolos, foi observado efeito do parkinsonismo no barorreflexo espontâneo. No protocolo de Losartan, observamos ao aumento das sequências “up”, sequências “down” e o ganho total nos grupos 6-OHDA. Para o protocolo Enalapril, houve alterações no barorreflexo somente decorrentes da lesão por parkinsonismo. Dados prévios do nosso laboratório demonstraram que a lesão pela 6-OHDA resultou também em aumentos tanto nas sequências “up” quanto nas sequências “down”, assim como no ganho total (ARIZA *et al.*, 2015). Nesse estudo de Ariza e colaboradores (2015), foi observado uma menor queda da pressão arterial pelo antagonista alfa adrenérgico prazosin, caracterizando uma redução tônica da atividade simpática vascular. Os autores sugerem que esse efeito poderia ser responsável em induzir um aumento na sensibilidade barorreflexa com base em uma possível regulação positiva dos receptores adrenérgicos cardíacos (“up regulation”). No entanto, tanto o tratamento com Losartan ou com Enalapril foi capaz de promover alterações no componente barorreflexo. Mais estudos são necessários para esclarecer o papel da angiotensina nas alterações autonômicas de animais com parkinsonismo.

A 6-OHDA é uma neurotoxina catecolaminérgica seletiva amplamente utilizada para investigar a patogênese e progressão da DP. Semelhante à neurodegeneração da DP, a perda neuronal catecolaminérgica induzida por 6-OHDA está associada ao aumento do estresse oxidativo e inflamação (RODRIGUEZ-PALLARES *et al.*, 2007). Sabe-se que a 6-OHDA atua diretamente inibindo a cadeia respiratória mitocondrial no nível do complexo I da cadeia de transporte de elétrons. O estresse oxidativo é, portanto, um importante mecanismo molecular subjacente à degeneração de DA (RODRIGUEZ-PALLARES *et al.*, 2007).

Lopez real e colaboradores observaram aumento da peroxidação lipídica no estriado e mesencéfalo ventral após 7 dias de lesão unilateral por 6-OHDA em ratos Sprague-Dawley (LOPEZ-REAL *et al.*, 2005). Após 15 dias, de injeção unilateral de

6-OHDA em ratos Wistar, houve redução na atividade de enzimas antioxidantes, nível de GSH e razão GSH/GSSG e houve aumento e peroxidação lipídica no mesencéfalo central (HADDADI *et al.*, 2020). Estes estudos corroboram com dados na literatura que mostram que o modelo 6-OHDA gera neurotoxicidade devido a danos induzidos por ERO, depleção rápida de GSH e insuficiência de enzimas antioxidantes (HADDADI *et al.*, 2020). No modelo sistêmico de 6-OHDA no macaco rhesus, é possível observar a perda da inervação simpática cardíaca, acompanhado do aumento da produção de ERO (revisão METZGER, 2018). Em ratos Wistar, foi observado aumento de peroxidação lipídica nos eritrócitos de ratos 6-OHDA em relação ao seu grupo controle (CABRAL *et al.*, 2020). Isto indica que há aumento de estresse oxidativo circulante periférico.

Corroborando com esses dados, foi observado aumento da produção de ânion superóxido no coração de animais 6-OHDA. Contrastando com os dados esperados, foi observado redução na produção de ânion superóxido na aorta torácica através do ensaio NBT e aumento da quantidade de antioxidantes no coração do grupo 6-OHDA em relação ao seu controle através do radical ABTS. Embora o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) leve ao estresse oxidativo, os níveis fisiológicos dessas moléculas são um resultado normal dos processos metabólicos e desempenham um papel importante na defesa celular (PUSPITA; CHUNG; SHIM, 2017).. No músculo gastrocnêmio não foi observado alteração no balanço redox. Embora haja evidências, tanto no modelo bilateral como no unilateral de lesão por 6-OHDA, de que ocorre estresse oxidativo no SNC, em nosso modelo não há presença significativa de estresse oxidativo nos locais avaliados e nos órgãos relacionados ao sistema cardiovascular.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

Nossos achados indicam que o tratamento com inibidor seletivo da iNOS não promoveu proteção em relação à diminuição de DA no estriado e que as alterações nos parâmetros basais e autonômicos estão mais relacionadas a PAS. No entanto, nosso estudo demonstrou que as alterações na resposta vascular nos animais 6-OHDA estão relacionadas com a isoforma da iNOS.

No estudo 2, também vimos que os tratamentos com inibidores do receptor AT1 e do inibidor da ECA não promoveram proteção em relação a diminuição de DA no estriado. Em relação às alterações cardiovasculares, é possível que a participação do SRA nas alterações cardiovasculares no parkinsonismo bilateral por 6-OHDA em ratos machos seja pequena e restrita à pressão arterial.

Por fim, considera-se importante a continuação da investigação dos mecanismos neurobiológicos que possam contribuir nas disfunções autonômicas e cardiovasculares relacionadas com o parkinsonismo.

## 6. REFERÊNCIAS

- ARAS, S. *et al.* The role of nitric oxide on visual-evoked potentials in MPTP-induced Parkinsonism in mice. **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 72, n. 1, p. 48–57, 2014a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2014.04.014>.
- ARAS, S. *et al.* The role of nitric oxide on visual-evoked potentials in MPTP-induced Parkinsonism in mice. **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 72, n. 1, p. 48–57, 2014b. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2014.04.014>.
- ARIZA, D. *et al.* Chemoreflex and baroreflex alterations in Parkinsonism induced by 6-OHDA in unanesthetized rats. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 607, p. 77–82, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2015.09.024>.
- 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**, [s. l.], v. 308, n. 3, p. H250–H257, 2015.
- ARIZA, Debora. *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**, [s. l.], v. 308, n. 3, p. H250–H257, 2015. Disponível em: <http://ajpheart.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajpheart.00406.2014>.
- ARIZA, D. *et al.* Intranigral LPS administration produces dopamine, glutathione but not behavioral impairment in comparison to MPTP and 6-OHDA neurotoxin models of Parkinson's disease. **Neurochemical Research**, [s. l.], v. 35, n. 10, p. 1620–1627, 2010.
- ASAHINA, M. *et al.* Autonomic dysfunction in parkinsonian disorders: Assessment and pathophysiology. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, [s. l.], v. 84, n. 6, p. 674–680, 2013.
- BALESTRINO, R.; SCHAPIRA, A. H. V. Parkinson disease. **European Journal of Neurology**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 27–42, 2020.
- BARTHWAL, M. K.; SRIVASTAVA, N.; DIKSHIT, M. Role of nitric oxide in a progressive neurodegeneration model of Parkinson's disease in the rat. **Redox Rep**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 297–302, 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1179/135100001101536436>.
- BARTHWAL, M.; SRIVASTAVA, N.; DIKSHIT, M. Role of nitric oxide in a progressive neurodegeneration model of Parkinson's disease in the rat. **Redox Repor**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 1–6, 2001.
- BLANDINI, F. Neural and immune mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 189–201, 2013.

BLANDINI, F.; ARMENTERO, M. T.; MARTIGNONI, E. The 6-hydroxydopamine model: News from the past. **Parkinsonism and Related Disorders**, [s. l.], v. 14, n. SUPPL.2, p. 124–129, 2008.

BOULAMERY, A. *et al.* Effects of L-DOPA on circadian rhythms of 6-OHDA striatal lesioned rats: a radiotelemetric study. **Chronobiology International**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 251–264, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/07420521003664213>.

BROOKES, P. S. Mitochondrial nitric oxide synthase. **Mitochondrion**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 187–204, 2004.

BROOM, L. *et al.* Neuroprotection by the selective iNOS inhibitor GW274150 in a model of Parkinson disease. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 50, n. 5, p. 633–640, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.026>.

CABRAL, L. M. *et al.* Attenuated baroreflex in a Parkinson's disease animal model coincides with impaired activation of non-C1 neurons. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, [s. l.], v. 225, n. October 2019, p. 102655, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2020.102655>.

CAT, A. N. D.; TOUYZ, R. M. A new look at the renin-angiotensin system - Focusing on the vascular system. **Peptides**, [s. l.], v. 32, n. 10, p. 2141–2150, 2011.

CHATTERJEE, A.; CATRAVAS, J. D. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. **Vascular Pharmacology**, [s. l.], v. 49, n. 4–6, p. 134–140, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vph.2008.06.008>.

CHAUDHURI, K. R.; SCHAPIRA, A. H. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. **The Lancet Neurology**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 464–474, 2009. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70068-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70068-7).

COSTA, J. *et al.* EFEITOS DO ESTRÓGENO SOBRE ASPECTOS CARDIOVASCULARES, AUTONÔMICOS E OXIDATIVOS DE RATAS ENDOTOXÊMICAS: PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO CARDIOVASCULARES, AUTONÔMICOS E OXIDATIVOS DE RATAS ENDOTOXÊMICAS: PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO. [s. l.], 2016.

CYR, A. R. *et al.* Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. **Critical Care Clinics**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 307–321, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2019.12.009>.

CZARNECKA, A. *et al.* Alterations in the expression of nNOS in the substantia nigra and subthalamic nucleus of 6-OHDA-lesioned rats: The effects of chronic treatment with L-DOPA and the nitric oxide donor, molsidomine. **Brain Research**, [s. l.], v. 1541, p. 92–105, 2013.

DAFF, S. NO synthase: Structures and mechanisms. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 1–11, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2010.03.001>.

- DALPIAZ, P. *et al.* The chronic blockade of angiotensin I-converting enzyme eliminates the sex differences of serum cytokine levels of spontaneously hypertensive rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 171–177, 2013.
- DANIELSON, S. R.; ANDERSEN, J. K. Oxidative and Nitrate Protein Modifications in Parkinson's Disease. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 44, n. 10, p. 1787–1794, 2008.
- DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: Mechanisms and models. **Neuron**, [s. l.], v. 39, n. 6, p. 889–909, 2003.
- DAYAL, S. *et al.* Protective vascular and cardiac effects of inducible nitric oxide synthase in mice with hyperhomocysteinemia. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. 1–8, 2014.
- DE CAMPOS, B. H. *et al.* Cardiovascular evaluation of female rats with 6-OHDA-induced parkinsonism: Possible protection by ovarian hormones and participation of nitric oxide. **Life Sciences**, [s. l.], v. 259, n. April, p. 118259, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118259>.
- DE JAGER, Lorena *et al.* Nitric oxide alterations in cardiovascular system of rats with Parkinsonism induced by 6-OHDA and submitted to previous exercise. **Life Sciences**, [s. l.], v. 204, n. January, p. 78–86, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.05.017>.
- DE JAGER, L. *et al.* Nitric oxide alterations in cardiovascular system of rats with Parkinsonism induced by 6-OHDA and submitted to previous exercise. **Life Sciences**, [s. l.], v. 204, 2018.
- DEHMER, T. *et al.* Deficiency of inducible nitric oxide synthase protects against MPTP toxicity in vivo. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 74, n. 5, p. 2213–2216, 2000.
- DEL-BEL, E. *et al.* Role of Nitric Oxide in Motor Control : Implications for Parkinson ' s Disease Patho- physiology and Treatment. [s. l.], p. 471–488, 2011.
- DEL BEL, E. *et al.* Motor effects of acute and chronic inhibition of nitric oxide synthesis in mice. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 161, n. 1, p. 32–37, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11967628>.
- DEVOS, D. *et al.* Heart rate variability and parkinson's disease severity. **Journal of Neural Transmission**, [s. l.], v. 110, n. 9, p. 997–1011, 2003.
- DI FRANCESCO MARINO, S. *et al.* The effect of physical exercise on endothelial function. **Sports medicine (Auckland, N.Z.)**, [s. l.], v. 39, n. 10, p. 797–812, 2009.
- DI MONTE, D. A. *et al.* Role of nitric oxide in methamphetamine neurotoxicity: protection by 7-nitroindazole, an inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 67, n. 6, p. 2443–2450, 1996. Disponível em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8931477](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8931477).

DIAS, V.; JUNN, E.; MOURADIAN, M. M. The role of oxidative stress in parkinson's disease. **Journal of Parkinson's Disease**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 461–491, 2013.

DORSEY, E. R. *et al.* The emerging evidence of the Parkinson pandemic. **Journal of Parkinson's Disease**, [s. l.], v. 8, n. s1, p. S3–S8, 2018.

DORSZEWSKA, J. *et al.* Oxidative stress factors in Parkinson ' s disease. [s. l.], v. 16, n. 7, p. 1383–1391, 2021.

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**, [s. l.], v. 164, n. 4, p. 1357–1391, 2011.

EGUCHI, D. *et al.* Inhibitory effect of recombinant iNOS gene expression on vasomotor function of canine basilar artery. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, [s. l.], v. 283, n. 6 52-6, p. 2560–2566, 2002.

ELFERING, S. L.; SARKELA, T. M.; GIULIVI, C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 277, n. 41, p. 38079–38086, 2002.

FALQUETTO, B. *et al.* Cardiovascular dysfunction associated with neurodegeneration in an experimental model of Parkinson's disease. **Brain Research**, [s. l.], v. 1657, p. 156–166, 2017.

FEIGIN, V. L. *et al.* Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet Neurology**, [s. l.], v. 16, n. 11, p. 877–897, 2017.

FERRARIO, C. M. **The Renin-Angiotensins System: Importance in Physiology and Pathology**. [S. l.: s. n.], 1990.

FERRER, I. *et al.* Neuropathology of sporadic Parkinson disease before the appearance of parkinsonism: Preclinical Parkinson disease. **Journal of Neural Transmission**, [s. l.], v. 118, n. 5, p. 821–839, 2011.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: Regulation and function. **European Heart Journal**, [s. l.], v. 33, n. 7, p. 1–13, 2012.

FRANCARDO, V. Modeling Parkinson's disease and treatment complications in rodents: Potentials and pitfalls of the current options. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 352, n. 2010, p. 142–150, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2017.12.014>.

GHAYYOOMI, M. *et al.* The effect of an specific inducible NO synthase inhibitor, S-methylisothiourea hemisulfate on cisplatin-induced nephrotoxicity; gender-related differences. **Advanced Biomedical Research**, [s. l.], v. 4, p. 130, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/2277-9175.161223>.

GIULIVI, C. Characterization and function of mitochondrial nitric-oxide synthase. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 397–408, 2003.

GOLDSTEIN, D. S. *et al.* Article Cardiac Sympathetic Denervation in Parkinson Disease. [s. l.], 2000.

GOLDSTEIN, D. S. Cardiac denervation in patients with parkinson disease. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, [s. l.], v. 74, n. SUPPL.1, p. 91–94, 2007.

GRAMMATOPOULOS, T. N. *et al.* Angiotensin type 1 receptor antagonist losartan , reduces MPTP-induced degeneration of dopaminergic neurons in substantia nigra. [s. l.], v. 17, p. 1–17, 2007.

GREEN, D. J. *et al.* Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. **The Journal of physiology**, [s. l.], v. 561, n. Pt 1, p. 1–25, 2004. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1665322&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

GUMBER, A.; RAMASWAMY, B.; THONGCHUNDEE, O. <p>Effects of Parkinson's on employment, cost of care, and quality of life of people with condition and family caregivers in the UK: a systematic literature review</p>. **Patient Related Outcome Measures**, [s. l.], v. Volume 10, p. 321–333, 2019.

GUNETT, C. A. *et al.* Mechanisms of inducible nitric oxide synthase-mediated vascular dysfunction. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, [s. l.], v. 25, n. 8, p. 1617–1622, 2005.

HADDADI, R. *et al.* Neuronal degeneration and oxidative stress in the SNc of 6-OHDA intoxicated rats; improving role of silymarin long-term treatment. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, [s. l.], v. 393, n. 12, p. 2427–2437, 2020.

HUNOT, S. *et al.* Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. **Neuroscience**, [s. l.], v. 72, n. 2, p. 355–363, 1996.

INAGAMI, T. *et al.* Angiotensin receptors: molecular biology and signalling. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, [s. l.], v. 26, n. 7, p. 544–549, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10405785>.

IRAVANI, M. M. *et al.* Involvement of Inducible Nitric Oxide Synthase in Inflammation-Induced Dopaminergic Neurodegeneration. [s. l.], v. 110, n. 1, p. 49–58, 2002.

JACKSON-LEWIS, V.; BLESA, J.; PRZEDBORSKI, S. Animal models of Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, [s. l.], v. 18, p. S183–S185, 2012. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1353802011700578>.

JAIN, S.; GOLDSTEIN, D. S. **Cardiovascular dysautonomia in Parkinson disease: From pathophysiology to pathogenesis**. [S. l.: s. n.], 2012.

JENKINS, T. A. *et al.* Effect of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition on striatal dopamine content in the MPTP-treated mouse. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 73, n. 1, p. 214–219, 1999.

JO, Y. *et al.* Protective Effect of Renin-Angiotensin System Inhibitors on Parkinson's Disease: A Nationwide Cohort Study. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 13, n. March, p. 1–11, 2022.

KALIA, L. V.; LANG, A. E. Parkinson's disease. **The Lancet**, [s. l.], v. 386, n. 9996, p. 896–912, 2015. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3).

KASHIHARA, K.; IMAMURA, T.; SHINYA, T. Cardiac 123I-MIBG uptake is reduced more markedly in patients with REM sleep behavior disorder than in those with early stage Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 252–255, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreldis.2009.12.010>.

KAVYA, R. *et al.* Nitric oxide synthase regulation and diversity: Implications in Parkinson's disease. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 280–294, 2006.

LAU, L. M. L. De; BRETELER, M. M. B. Epidemiology of Parkinson ' s disease. **Lancet Neurol**, [s. l.], v. 5, n. June, p. 525–535, 2006. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70471-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70471-9).

LEE, J. *et al.* Altered Nitric Oxide System in Cardiovascular and Renal Diseases. **Chonnam medical journal**, [s. l.], v. 52, n. 2, p. 81–90, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27231671%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4880583>.

LI, H.; POULOS, T. L. Structure-function studies on nitric oxide synthases. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [s. l.], v. 99, n. 1, p. 293–305, 2005.

LIBERATORE, G. T. *et al.* Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 5, n. 12, p. 1403–1409, 1999.

LIND, M. *et al.* Inducible nitric oxide synthase: Good or bad?. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 93, p. 370–375, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.06.036>.

LOPEZ-REAL, A. *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibition reduces oxidative stress and protects dopaminergic neurons in a 6-hydroxydopamine rat model of Parkinsonism. **Journal of Neuroscience Research**, [s. l.], v. 81, n. 6, p. 865–873, 2005.

MARRAS, C. *et al.* Prevalence of Parkinson's disease across North America. **npj Parkinson's Disease**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 1–7, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41531-018-0058-0>.

MARTINS-PINGE, M. C.; JAGER, L. De; CAMPOS, B. H. De. Nitric Oxide Involvement in Cardiovascular Dysfunctions of Parkinson Disease. [s. l.], v. 13, n. July, p. 1–7, 2022.

MCALLISTER, R. M.; LAUGHLIN, M. H. Vascular nitric oxide: effects of physical activity, importance for health. **Essays Biochem**, [s. l.], v. 42, p. 119–131, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17144884>.

- MCKINLEY, M. J. *et al.* The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 901–918, 2003. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s1357-2725\(02\)00306-0](http://dx.doi.org/10.1016/s1357-2725(02)00306-0).
- MENDES, R. T. *et al.* Inibição seletiva da ciclo-oxigenase-2: Riscos e benefícios. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [s. l.], v. 52, n. 5, p. 774–782, 2012.
- MERTENS, B. *et al.* The neuroprotective action of candesartan is related to interference with the early stages of 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic cell death. **European Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 34, n. 7, p. 1141–1148, 2011.
- MERTENS, B. *et al.* The role of the central renin-angiotensin system in Parkinson's disease. **Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 49–56, 2010.
- METZGER, J. M.; EMBORG, M. E. Autonomic dysfunction in Parkinson disease and animal models. **Clinical Autonomic Research**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 397–414, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10286-018-00584-7>.
- MINHAS, R.; BANSAL, Y.; BANSAL, G. Inducible nitric oxide synthase inhibitors: A comprehensive update. **Medicinal Research Reviews**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 823–855, 2020.
- MOLINA, J. A. *et al.* The role of nitric oxide in neurodegeneration: Potential for pharmacological intervention. **Drugs and Aging**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 251–259, 1998.
- MOORE, D. J. *et al.* Molecular Pathophysiology of Parkinson's Disease. **Annual Review of Neuroscience**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 57–87, 2005. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.neuro.28.061604.135718>.
- MORADGANJEH, A.; ZIAI, S. A.; ROGHANI, M. Losartan pretreatment reduces neurodegeneration and behavioural symptoms in 6-hydroxydopamine induced unilateral rat model of Parkinson's disease. **Pathophysiology**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 243–248, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pathophys.2013.10.001>.
- MUÑOZ, A. *et al.* Reduction of dopaminergic degeneration and oxidative stress by inhibition of angiotensin converting enzyme in a MPTP model of parkinsonism. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 112–120, 2006.
- NAKAMURA, T.; LIPTON, S. A. Protein S-nitrosylation as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. **Trends in Pharmacol. Sci.**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 73–84, 2016.
- NICARETTA, D. H.; ROSSO, A. L.; MATTOS, J. P. de. Disautonomia na Doença de Parkinson, Revisão da literatura. **Rev Bras Neurol**, [s. l.], v. 47, n. 4, p. 25–29, 2011.
- OKA, H. *et al.* Comparisons of cardiovascular dysautonomia and cognitive impairment between de novo Parkinson's disease and de novo dementia with Lewy bodies. **BMC Neurology**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 1–9, 2020.
- OLLER, J. *et al.* Nitric oxide mediates aortic disease in mice deficient in the

metalloprotease Adamts1 and in a mouse model of Marfan syndrome. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 200–212, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4266>.

PALMA, J.-A. *et al.* Is cardiac function impaired in premotor Parkinson's disease? A retrospective cohort study. **Movement Disorders**, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 591–596, 2013. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/mds.25431>.

PAN, H. L. Brain angiotensin II and synaptic transmission. **Neuroscientist**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 422–431, 2004.

PARATI, G.; OCHOA, J. E.; BILO, G. Blood pressure variability, cardiovascular risk, and risk for renal disease progression. **Current Hypertension Reports**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 421–431, 2012.

PAXINOS, G. .; WATSON, C. . **The Rat Brain: In Stereotaxic Coordinates**. San Diego, California, USA: [s. n.], 1998.

PEREZ-LLORET, S. *et al.* Renin-angiotensin system as a potential target for new therapeutic approaches in Parkinson's disease. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, [s. l.], v. 26, n. 10, p. 1163–1173, 2017.

POEWE, W. *et al.* Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 3, p. 17013, 2017. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrdp201713>.

PUSPITA, L.; CHUNG, S. Y.; SHIM, J. W. Oxidative stress and cellular pathologies in Parkinson's disease. **Molecular Brain**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–12, 2017.

REICHMANN, H.; BRANDT, M. D.; KLINGELHOEFER, L. The nonmotor features of Parkinson's disease: Pathophysiology and management advances. **Current Opinion in Neurology**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 467–473, 2016.

RODRIGUEZ-OROZ, M. C. *et al.* Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. **The Lancet Neurology**, [s. l.], v. 8, n. 12, p. 1128–1139, 2009.

RODRIGUEZ-PALLARES, J. *et al.* Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: The role of NADPH oxidase and microglial activation in 6-hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 103, n. 1, p. 145–156, 2007.

SALSONE, M. *et al.* Heart rate variability in patients with essential tremor: A cross sectional study. **Parkinsonism and Related Disorders**, [s. l.], v. 33, p. 134–137, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreldis.2016.09.027>.

SCHAPIRA, A. H. V.; CHAUDHURI, K. R.; JENNER, P. Non-motor features of Parkinson disease. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 18, n. 7, p. 435–450, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn.2017.62>.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling. **Current Biology**, [s. l.], v. 24, n. 10, p. 453–462, 2014.

- SCHULZ, J. B. *et al.* Inhibition of Neuronal Nitric Oxide Synthase by 7-Nitroindazole Protects Against MPTP-Induced Neurotoxicity in Mice. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 64, n. 2, p. 936–939, 1995.
- SCHULZ, J. B.; FALKENBURGER, B. H. Neuronal pathology in Parkinson's disease. **Cell and Tissue Research**, [s. l.], v. 318, n. 1, p. 135–147, 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. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, [s. l.], v. 304, n. 12, p. 1107–1113, 2013.
- SHAH, A. M. Inducible nitric oxide synthase and cardiovascular disease. **Cardiovascular Research**, [s. l.], v. 45, p. 148–155, 2000.
- SIAN, J. *et al.* Parkinson's disease: A major hypokinetic basal ganglia disorder. **Journal of Neural Transmission**, [s. l.], v. 106, n. 5–6, p. 443–476, 1999.
- SIMÕES E SILVA, A. C.; FLYNN, J. T. The renin-angiotensin-aldosterone system in 2011: Role in hypertension and chronic kidney disease. **Pediatric Nephrology**, [s. l.], v. 27, n. 10, p. 1835–1845, 2012.
- SIMON, D. K.; TANNER, C. M.; BRUNDIN, P. Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. **Clinics in Geriatric Medicine**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 1–12, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cger.2019.08.002>.
- 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**, [s. l.], v. 122, n. 10, p. 1441–1446, 2015.
- SONSALLA, P. K. *et al.* The angiotensin converting enzyme inhibitor captopril protects nigrostriatal dopamine neurons in animal models of parkinsonism. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 250, p. 376–383, 2013. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014488613003178>.
- SORENSEN, G. L.; MEHLSSEN, J.; JENNUM, P. Reduced sympathetic activity in idiopathic rapid-eye-movement sleep behavior disorder and Parkinson's disease. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, [s. l.], v. 179, n. 1–2, p. 138–141, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autneu.2013.08.067>.
- SOUTHAN, G. J.; SZABÓ, C.; THIEMERMANN, C. Isothioureas: potent inhibitors of nitric oxide synthases with variable isoform selectivity. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 114, n. 2, p. 510–516, 1995.
- STRANO, S. *et al.* Cardiovascular dysfunction in untreated Parkinson's disease: A multi-modality assessment. **Journal of the Neurological Sciences**, [s. l.], v. 370, p. 251–255, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2016.09.036>.
- SU, C. F.; YANG, F. L.; CHEN, H. I. Inhibition of inducible nitric oxide synthase attenuates acute endotoxin-induced lung injury in rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 339–346, 2007.

TEJERO, X. J.; SHIVA, S.; GLADWIN, M. T. Sources of vascular nitric oxide and reactive oxygen species and their regulation. **American Physiological Society**, [s. l.], v. 99, p. 311–379, 2020.

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**, [s. l.], v. 48, n. 2, p. 147–153, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2012.11.009>.

THOMAS, G. D. Neural control of the circulation. **American Journal of Physiology - Advances in Physiology Education**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 28–32, 2011.

TOMIC, S. *et al.* Impact of autonomic dysfunctions on the quality of life in Parkinson's disease patients. **Acta Neurologica Belgica**, [s. l.], v. 117, n. 1, p. 207–211, 2017.

TOUSOULIS, D. *et al.* The Role of Nitric Oxide on Endothelial Function. **Current Vascular Pharmacology**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 4–18, 2011.

TRIST, B. G.; HARE, D. J.; DOUBLE, K. L. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. **Aging Cell**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 1–23, 2019.

TUROSSI AMORIM, Eric Diego *et al.* Glutamate and GABA neurotransmission are increased in paraventricular nucleus of hypothalamus in rats induced to 6-OHDA parkinsonism: Involvement of nNOS. **Acta Physiologica**, [s. l.], v. 226, n. 3, p. 1–16, 2019.

TUROSSI AMORIM, E.D. *et al.* Glutamate and GABA neurotransmission are increased in paraventricular nucleus of hypothalamus in rats induced to 6-OHDA parkinsonism: Involvement of nNOS. **Acta Physiologica**, [s. l.], v. 226, n. 3, 2019.

TWELVES, D.; PERKINS, K. S. M.; COUNSELL, C. Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 19–31, 2003.

VANDERLEI, L. C. M. *et al.* Basic notions of heart rate variability and its clinical applicability. **Revista brasileira de cirurgia cardiovascular : orgao oficial da Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 205–217, 2009.

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

VIARO, F.; NOBRE, F.; EVORA, P. R. B. Expression of nitric oxide synthases in the pathophysiology of cardiovascular diseases. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [s. l.], v. 74, n. 4, p. 380–393, 2000.

VÍTEČEK, J. *et al.* Arginine-based inhibitors of nitric oxide synthase: Therapeutic potential and challenges. **Mediators of Inflammation**, [s. l.], v. 2012, 2012.

YUN, J. *et al.* KIT amplification and gene mutations in acral/mucosal melanoma in

Korea. **Apmis**, [s. l.], v. 119, n. 6, p. 330–335, 2011.

YUSTE, J. E. *et al.* 7-Nitroindazole down-regulates dopamine/DARPP-32 signaling in neostriatal neurons in a rat model of Parkinson's disease. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 63, n. 7, p. 1258–1267, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.07.031>.

ZIGMOND, M. J.; SMEYNE, R. J. Exercise: Is it a neuroprotective and if so, how does it work?. **Parkinsonism and Related Disorders**, [s. l.], v. 20, n. SUPPL.1, p. S123–S127, 2014. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1353-8020\(13\)70030-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1353-8020(13)70030-0).

## APENDICE A – Tabela com dados brutos Estudo 1

1. Dados complementares com valores de F e P para análise de ANOVA 2 vias do Estudo 1 – parâmetros cardiovasculares e autonômicos após 7 dias de tratamento com SMT – 10mg/kg.

Análise (Fig)	Interação	Efeito da indução do parkinsonismo	Efeito do tratamento com SMT
Dopamina (4)	F (1, 26) = 0,2669 P=0,6098	F (1, 26) = 151,0 P<0,0001	F (1, 26) = 0,7050 P=0,4088
PAM (5A)	F (1, 26) = 0,2612 P=0,6136	F (1, 26) = 5,690 P=0,0246	F (1, 26) = 3,162 P=0,0870
FC (5B)	F (1, 26) = 0,4448 P=0,5107	F (1, 26) = 2,785 P=0,1072	F (1, 26) = 1,254 P=0,2730
PAS (5C)	F (1, 26) = 0,5111 P=0,4810	F (1, 26) = 13,49 P=0,0011	F (1, 26) = 0,5878 P=0,4502
PAD (5D)	F (1, 26) = 2,141 P=0,1554	F (1, 26) = 1,178 P=0,2877	F (1, 26) = 3,576 P=0,0698
PAS – Variância (6A)	F (1, 26) = 1,475 P=0,2354	F (1, 26) = 30,62 P<0,0001	F (1, 26) = 0,0007685 P=0,9781
PAS – Lfabs (6B)	F (1, 26) = 0,1263 P=0,7251	F (1, 26) = 8,719 P=0,0066	F (1, 26) = 1,054 P=0,3141
PAS – VLFabs (6C)	F (1, 26) = 0,2202 P=0,6428	F (1, 26) = 12,30 P=0,0017	F (1, 26) = 0,1034 P=0,7504
Sequências “up” – Up Gain (8A)	F (1, 26) = 0,004559 P=0,9467	F (1, 26) = 2,914 P=0,0997	F (1, 26) = 2,803 P=0,1061
Sequências “down” – Down Gain (8B)	F (1, 26) = 3,236 P=0,0836	F (1, 26) = 3,797 P=0,0622	F (1, 26) = 0,007966 P=0,9296
Ganho total (8C)	F (1, 26) = 0,5378 P=0,4699	F (1, 26) = 3,526 P=0,0717	F (1, 26) = 1,303 P=0,2641
BEI (8D)	F (1, 26) = 0,5484 P=0,4656	F (1, 26) = 1,727 P=0,2003	F (1, 26) = 1,523 P=0,2281

2. Dados complementares com valores de F e P para análise de ANOVA 2 vias do Estudo 1 – Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) e na frequência cardíaca (FC), após a administração endovenosa de salina e de SMT (3 mg/kg) em animais com ou sem lesão por 6-OHDA.

Análise (Fig)	Interação	Efeito do tempo de resposta	Efeito do parkinsonismo
PAM – pós SMT endovenoso (10A)	F (13, 195) = 1,509 P=0,1167	F (2,926, 43,89) = 33,57 P<0,0001	F (1, 15) = 3,782 P=0,0708
FC – pós SMT endovenoso (10B)	F (13, 195) = 0,8295 P=0,6285	F (3,729, 55,94) = 23,33 P<0,0001	F (1, 15) = 1,934 P=0,1846

## APENDICE B – Tabela com dados brutos Estudo 2

3. Dados complementares com valores de F e P para análise de ANOVA 2 vias do Estudo 1 – parâmetros cardiovasculares e autonômicos após 7 dias de tratamento com Losartan – 10mg/kg.

Análise (Fig)	Interação	Efeito da indução do parkinsonismo	Efeito do tratamento com Losartan
Dopamina (16)	F (1, 32) = 0,06580 P=0,7992	F (1, 32) = 46,17 P<0,0001	F (1, 32) = 0,0008540 P=0,9769
PAM (17A)	F (1, 32) = 0,2843 P=0,5976	F (1, 32) = 0,8154 P=0,3733	F (1, 32) = 1,137 P=0,2943
FC (17B)	F (1, 32) = 0,4671 P=0,4993	F (1, 32) = 6,342 P=0,0170	F (1, 32) = 0,03991 P=0,8429
PAS (17C)	F (1, 32) = 0,06200 P=0,8049	F (1, 32) = 1,481 P=0,2325	F (1, 32) = 4,871 P=0,0346
PAD (17D)	F (1, 32) = 0,4921 P=0,4881	F (1, 32) = 0,4929 P=0,4877	F (1, 32) = 0,002711 P=0,9588
PAS – Variância (18A)	F (1, 32) = 0,04398 P=0,8352	F (1, 32) = 0,1683 P=0,6843	F (1, 32) = 3,963 P=0,0551
PAS – Lfabs (18B)	F (1, 32) = 0,08777 P=0,7689	F (1, 32) = 0,9441 P=0,3385	F (1, 32) = 6,847 P=0,0134
PAS – VLFabs (18C)	F (1, 32) = 0,3762 P=0,5440	F (1, 32) = 1,321 P=0,2590	F (1, 32) = 2,146 P=0,1527
IP – Variância (19A)	F (1, 32) = 0,4619 P=0,5016	F (1, 32) = 3,289 P=0,0791	F (1, 32) = 0,04888 P=0,8264
IP – LF(nu) (19B)	F (1, 32) = 1,056 P=0,3119	F (1, 32) = 0,8395 P=0,3664	F (1, 32) = 2,531 P=0,1215
IP – HF(nu) (19C)	F (1, 32) = 1,056 P=0,3119	F (1, 32) = 0,8395 P=0,3664	F (1, 32) = 2,531 P=0,1215
IP – LF/HF (19D)	F (1, 32) = 0,4080 P=0,5275	F (1, 32) = 1,316 P=0,2598	F (1, 32) = 3,671 P=0,0643
Sequências “up” – Up Gain (20A)	F (1, 32) = 1,837 P=0,1848	F (1, 32) = 11,68 P=0,0017	F (1, 32) = 3,117 P=0,0870
Sequências “down” – Down Gain (20B)	F (1, 32) = 0,04233 P=0,8383	F (1, 32) = 9,529 P=0,0042	F (1, 32) = 0,6364 P=0,4309
Ganho total (20C)	F (1, 32) = 0,5723 P=0,4549	F (1, 32) = 13,38 P=0,0009	F (1, 32) = 2,281 P=0,1407
BEI (20D)	F (1, 32) = 1,560 P=0,2207	F (1, 32) = 0,02359 P=0,8789	F (1, 32) = 1,694 P=0,2024

4.. Dados complementares com valores de F e P para análise de ANOVA 2 vias do Estudo 1 – parâmetros cardiovasculares e autonômicos após 7 dias de tratamento com Enalapril – 10mg/kg.

<b>Análise (Fig)</b>	<b>Interação</b>	<b>Efeito da indução do parkinsonismo</b>	<b>Efeito do tratamento com Enalapril</b>
Dopamina (21)	F (1, 34) = 0,4312 P=0,5158	F (1, 34) = 43,62 P<0,0001	F (1, 34) = 0,1725 P=0,6805
PAM (22A)	F (1, 34) = 0,02583 P=0,8733	F (1, 34) = 1,081 P=0,3059	F (1, 34) = 8,560 P=0,0061
FC (22B)	F (1, 34) = 0,09824 P=0,7559	F (1, 34) = 1,739 P=0,1961	F (1, 34) = 0,9687 P=0,3320
PAS (22C)	F (1, 34) = 0,0001453 P=0,9905	F (1, 34) = 2,301 P=0,1386	F (1, 34) = 19,26 P=0,0001
PAD (22D)	F (1, 34) = 0,1055 P=0,7473	F (1, 34) = 0,8283 P=0,3692	F (1, 34) = 3,799 P=0,0596
PAS – Variância (23A)	F (1, 34) = 0,08497 P=0,7724	F (1, 34) = 0,7382 P=0,3963	F (1, 34) = 0,8686 P=0,3579
PAS – Lfabs (23B)	F (1, 34) = 0,6040 P=0,4424	F (1, 34) = 0,01424 P=0,9057	F (1, 34) = 0,07745 P=0,7825
PAS – VLFabs (23C)	F (1, 34) = 3,050 P=0,0897	F (1, 34) = 6,272 P=0,0172	F (1, 34) = 0,1868 P=0,6683
IP – Variância (24A)	F (1, 34) = 0,8342 P=0,3675	F (1, 34) = 0,6662 P=0,4201	F (1, 34) = 0,9684 P=0,3320
IP – LF(nu) (24B)	F (1, 34) = 0,8689 P=0,3578	F (1, 34) = 0,8961 P=0,3505	F (1, 34) = 1,137 P=0,2938
IP – HF(nu) (24C)	F (1, 34) = 0,8689 P=0,3578	F (1, 34) = 0,8961 P=0,3505	F (1, 34) = 1,137 P=0,2938
IP – LF/HF (24D)	F (1, 34) = 1,043 P=0,3144	F (1, 34) = 1,207 P=0,2796	F (1, 34) = 1,570 P=0,2188
Sequências “up” – Up Gain (25A)	F (1, 34) = 3,155 P=0,0846	F (1, 34) = 11,93 P=0,0015	F (1, 34) = 0,3162 P=0,5776
Sequências “down” – Down Gain (25B)	F (1, 34) = 0,003429 P=0,9536	F (1, 34) = 5,846 P=0,0211	F (1, 34) = 2,255 P=0,1424
Ganho total (25C)	F (1, 34) = 1,336 P=0,2557	F (1, 34) = 10,49 P=0,0027	F (1, 34) = 1,611 P=0,2129
BEI (25C)	F (1, 34) = 0,3651 P=0,5497	F (1, 34) = 2,309 P=0,1379	F (1, 34) = 0,5062 P=0,4816

5. Dados complementares com valores de F e P para análise de ANOVA 2 vias do Estudo 1 – Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) e na frequência cardíaca (FC), após a administração endovenosa de salina e de Losartan (10 mg/kg) em animais com ou sem lesão por 6-OHDA.

<b>Análise (Fig)</b>	<b>Interação</b>	<b>Efeito do tempo de resposta</b>	<b>Efeito do parkinsonismo</b>
PAM – pós Losartan (27A)	F (13, 143) = 0,5819 P=0,8656	F (4,180, 45,98) = 5,050 P=0,0016	F (1, 11) = 0,0007499 P=0,9786
FC – pós Losartan (27B)	F (13, 143) = 0,4879 P=0,9286	F (3,581, 39,39) = 6,068 P=0,0010	F (1, 11) = 3,002 P=0,1111

6. Dados complementares com valores de F e P para análise de ANOVA 2 vias do Estudo 1 – Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) e na frequência cardíaca (FC), após a administração endovenosa de salina e de Enalapril (10 mg/kg) em animais com ou sem lesão por 6-OHDA.

<b>Análise (Fig)</b>	<b>Interação</b>	<b>Efeito do tempo de resposta</b>	<b>Efeito do parkinsonismo</b>
PAM – pós Enalapril (29A)	F (13, 156) = 0,3286 P=0,9867	F (3,008, 36,09) = 7,886 P=0,0004	F (1, 12) = 4,679 P=0,0514
FC – pós Enalapril (29B)	F (13, 156) = 1,463 P=0,1372	F (3,126, 37,51) = 10,69 P<0,0001	F (1, 12) = 0,3099 P=0,5880

## ANEXO – Comitê de Ética



## COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 174/2018

Londrina, 08 de outubro de 2018.

Prezado (a) professor (a)

Certificamos que o projeto intitulado: "Envolvimento das isoformas da NO-sintase e angiotensina II nos aspectos cardiovasculares, autonômicos e oxidativos de ratos com parkinsonismo por 6-hidroxidopamina (6-OHDA)" protocolo CEUA nº 14605.2018.88 sob a responsabilidade de Marli Cardoso Martins Pingue, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em **05/10/2018**.

Este projeto tem por objetivo avaliar os efeitos cardiovasculares e autonômicos em ratos acordados e induzidos ao parkinsonismo por 6-OHDA, e investigar o envolvimento das isoformas da óxido nítrico sintase e do sistema renina-angiotensina na função cardiovascular e autonômica nesse modelo. Grau de invasividade=3

Finalidade	( ) Ensino ( x ) Pesquisa científica
Vigência da autorização	01/12/2018 a 28/02/2022
Espécie/ linhagem/ raça	Rato heterogênico/ Wistar
Nº de animais	440
Peso/ Idade	240-280g
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UEL
Amostras a serem coletadas	Cérebro, Coração, Vasos sanguíneos, Plasma, Rins e Adrenais

Cumpra-se 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 necessários. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente.

*Maria Fernanda R. Graciano*  
Prof.ª. Dra. Maria Fernanda Rodrigues Graciano  
Coordenadora da CEUA/UEL

Ilmo.(a) Sr.(a)  
Prof. (a) Dr (a). **Marli Cardoso Martins Pingue**  
Responsável pelo projeto  
Departamento de Ciências Fisiológicas/Fisiologia/CCB

C/C para o Biotério Central/CCB  
C/C para a Chefia do Depto de Ciências Fisiológicas/CCB  
C/C para a Direção de Centro do CCB

Campus Universitário: Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), km 380 - Fone (043) 3371-4000 PABX - Fax 3328-4440 - Caixa Postal 10.011 - CEP 86057-970 - Internet <http://www.uel.br>

LONDRINA - PARANÁ - BRASIL