



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DEBORAH ARIZA

**ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E AUTONÔMICAS
NO PARKINSONISMO INDUZIDO POR 6-OHDA EM RATOS**

Londrina
2015

DEBORAH ARIZA

**ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E AUTONÔMICAS
NO PARKINSONISMO INDUZIDO POR 6-OHDA EM RATOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas/SBFis associado à Universidade Estadual de Londrina, para a obtenção do título de Doutor

Orientadora: Profa. Dra Marli Cardoso Martins
Pinge

Londrina
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

A719a Ariza, Deborah.

Alterações cardiovasculares e autonômicas no parkinsonismo induzido por 6-OHDA em ratos / Deborah Ariza. – Londrina, 2015.
xvii, 103 f. : il.

Orientadora: Marli Cardoso Martins Pinge.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Sistema cardiovascular – Teses. 2. Parkinson, Doença de – Teses. 3. Sistema nervoso autônomo – Teses. 4. Dopamina – Teses. 5. Rato como animal de laboratório – Teses. I. Pinge, Marli Cardoso Martins. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Sociedade Brasileira de Fisiologia. IV. Título.

CDU 612.1:616.8

DEBORAH ARIZA

**ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E AUTÔNOMICAS NO
PARKINSONISMO INDUZIDO POR 6-OHDA EM RATOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas/SBFis associado à Universidade Estadual de Londrina, para a obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Marli Cardoso Martins
Pinge
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Rubens Fazan Junior
Universidade Estadual de São Paulo – USP

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Graziela Scaliante Ceravolo
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 17 de julho de 2015.

DEDICATÓRIA

À minha família...

Dedico este trabalho ao meu pai, mãe e irmão

Pessoas com as quais sempre pude contar...

Que sempre estiveram, mesmo que a quilômetros de distância, perto de mim.

Agradecimento especial ...

Á professora Dra. Marli Cardoso Martins Pinge

Obrigada por me receber e em mim acreditar...

A você, toda admiração e gratidão!!!

AGRADECIMENTOS

" Aqueles que passam por nós não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós".

Antoine de Saint-Exupéry

Ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação Ciências Fisiológicas.

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

Aos professores do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL e aos professores das nucleadoras.

Aos colegas do laboratório, obrigada pelos papos, pelas discussões científicas ou não ... sentirei saudades do nosso convívio.

A todos os colegas do departamento.

Aos amigos mais próximos: Laira, Eric, Vivian, Hely, Fernanda, Milene, Pri, Flavis, Josi... vocês foram essenciais e é por vocês que o coração aperta quando penso que não os verei com tanta frequência!!!

Ao professor Carlos Cesar Crestani e às técnicas Elisabete e Rosana da UNESP-Araraquara, pela colaboração nas dosagens de dopamina.

À professora Graziela e alunos do laboratório de Farmacologia Vascular PMPGCF/UEL, obrigada pela colaboração no trabalho sobre reatividade vascular.

Aos técnicos e demais servidores do departamento e da UEL.

À Dani, da secretaria, obrigada por me salvar diversas vezes indicando como seguir com matrícula, disciplinas nas nucleadoras, entrega de documentos...

Ao Daniel Penteadó, por inúmeras vezes me ajudar, mostrando sempre muita paciência e competência.

Ao apoio financeiro: Capes

ARIZA, Deborah. **Alterações cardiovasculares e autonômicas no parkinsonismo induzido por 6-OHDA**. 2015. 103 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é caracterizada, principalmente, por sinais motores. Entretanto, sinais não-motores, também, acometem e diminuem a qualidade de vida dos pacientes com DP. Dentre esses sinais não-motores, estão os distúrbios cardiovasculares, que podem ser decorrentes do acometimento tanto do sistema nervoso central quanto de vias periféricas do sistema nervoso autônomo. Apesar de muitas especulações, a fisiopatologia das complicações cardiovasculares ainda não está bem elucidada. Visto isso e a escassez de trabalhos em modelos animais, faz-se importante o estudo das variáveis cardiovasculares, para que se possa investigar os mecanismos neurobiológicos e contribuir para novos achados nas disfunções cardiovasculares relacionadas com o parkinsonismo. No presente trabalho, investigamos a função cardiovascular, avaliando a modulação autonômica, os reflexos cardiovasculares (barorreflexo e quimiorreflexo) e a reatividade vascular ao agonista alfa1-adrenérgico em aorta, de um modelo animal de parkinsonismo, induzido pela infusão bilateral da toxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) na substância negra parte compacta (SNpc). Os resultados mostraram que os animais induzidos ao parkinsonismo apresentaram menor pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em comparação aos animais controle. Foi também demonstrado que os animais lesados apresentaram uma menor variabilidade da pressão arterial, a qual decorreu de redução na variância e na potência do componente de baixa frequência (do inglês, LF) do espectro da PA, assim indicando uma redução na modulação simpática vascular e alterações na atividade conjunta vagal e simpática sobre o coração. Além disso, o tratamento intravenoso com um antagonista α -adrenérgico (prazosin) causou respostas depressoras reduzidas nos animais lesados, assim, reforçando as evidências de um tônus simpático reduzido para a pressão arterial. O presente trabalho, também, mostrou que, depois da ativação do barorreflexo pela infusão de agonista seletivo dos adrenoreceptores α_1 - fenilefrina (FE) e de infusão de doador de óxido nítrico - nitroprussiato de sódio (NPS) o índice de sensibilidade barorreflexa não se mostrou alterado entre os grupos, no entanto, ocorreu um maior aumento na PA quando estimulados com FE e maior taquicardia quando estimulado com NPS nos animais 6-OHDA. Após ativação dos quimiorreceptores periféricos por meio de injeção de KCN (hipóxia citotóxica), ocorreu uma maior resposta pressórica e bradicárdica nos animais lesados bilateralmente com 6-OHDA. Além disso, o presente trabalho buscou investigar a reatividade vascular na aorta dos animais induzidos ao parkinsonismo por 6-OHDA, e os resultados mostram hiporreatividade ao agonista adrenérgico FE, provavelmente por mecanismo dependente do endotélio. Assim, a diminuição do tônus simpático no parkinsonismo induzido em ratos por 6-OHDA, parece estar relacionada com a hiporresponsividade α -adrenérgica nos vasos sanguíneos. Dessa forma, os resultados do presente trabalho fornecem evidências de um comprometimento autonômico e cardiovascular nos animais submetidos à lesão bilateral por infusão de 6-OHDA na SNpc.

Palavras-chave: Modulação autonômica. Reflexos cardiovasculares. Reatividade vascular.

ARIZA, Deborah. **Cardiovascular and autonomic alterations in rats with parkinsonism induced by 6-OHDA**. 2015. 103 p. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas.) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is mainly characterized by motor signals. However, non-motor signals also affect and decrease the quality of life of PD patients. Among these non-motor signs are cardiovascular disorders, which may be due to the involvement of both central nervous system and peripheral autonomic nervous system. Despite much speculation, the pathophysiology of cardiovascular complications is not well understood. Seen it, and the lack of studies in animal models, it is important to the study the cardiovascular variables, so that we can investigate the neurobiological mechanisms and contribute to the new findings in cardiovascular disorders related to parkinsonism. In the present study we investigated the cardiovascular function, evaluating autonomic modulation, cardiovascular reflexes (chemoreflex and baroreflex), and vascular reactivity to alpha1-adrenergic agonist in the aorta in an animal model of Parkinsonism induced by bilateral infusion of the toxin 6-hydroxidopamine (6-OHDA) in the substantia nigra pars compacta (SNpc). The results showed that the animals induced parkinsonism had lower arterial pressure (AP) and heart rate (HR) compared to control animals. It was also shown that the injured animals showed a lower variability of the blood pressure, which resulted in the reduction in variance and the low frequency component power (LF) of the PA spectrum, thus indicating a reduction in sympathetic modulation and vascular changes in joint activity of vagal and sympathetic on the heart. In addition, the intravenous treatment with a α -adrenoceptor antagonist (prazosin) caused reduced depressor responses in injured animals, thereby increasing the evidence of a reduced sympathetic tone to arterial pressure. This study also showed that after activation of the baroreceptors by selective adrenoceptor agonist infusion α 1 - phenylephrine (PHE) and nitric oxide donor infusion - sodium nitroprusside (SNP), the baroreflex sensitivity index was not changed between the groups. However, there was a greater increase in the AP when stimulated with PHE and greater tachycardia when stimulated with SNP in 6-OHDA animals. After activation of the peripheral chemoreceptors through KCN injection (cytotoxic hypoxia), there was a higher increase in pressure and bradycardia response in injured animals with bilateral 6-OHDA. In addition, this study aimed to investigate the vascular reactivity in aorta of animals induced parkinsonism by 6-OHDA, and the results show hyporeactivity to the adrenergic agonist FE, probably by endothelium-dependent mechanism. Thus, the decrease in the sympathetic tone in the parkinsonism in rats induced by 6-OHDA, seems to be related to the α -adrenergic hyporesponsiveness in blood vessels. Thus, the results of this study provide evidence of autonomic and cardiovascular impairment in animals subjected to bilateral damage by infusion of 6-OHDA in SNpc.

Keywords: Autonomic modulation. Cardiovascular reflexes. Vascular reactivity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática da via nigroestriatal normal e da via nigroestriatal na Doença de Parkinson	03
Figura 2 – Interação sinérgica de mecanismos envolvidos na morte de neurônios dopaminérgicos na DP	05
Figura 3 – Alvos moleculares para os agentes tóxicos na morte de neurônios dopaminérgicos.....	08
Figura 4 – Esquema do encéfalo evidenciando os sítios anatômicos comprometidos nos estagios neuropatológicos da doença de Parkinson	11
Estudo I	
Figura 1 – Nível de dopamina (DA) no estriado quantificado por HPLC após 7 dias da infusão bilateral de veículo (sham) ou toxina (6-OHDA)	25
Figura 2 – Parâmetros cardiovasculares em ratos não anestesiados depois de 7 dias da infusão bilateral de 6-OHDA intranigral ou cirurgia sham	27
Figura 3 – Análise da variabilidade da pressão arterial e frequência cardíaca em ratos não anestesiados depois de 7 dias da infusão bilateral de 6-OHDA intranigral ou cirurgia sham	29
Figura 4 – Análise espectral da variabilidade da pressão arterial e intervalo de pulso em ratos não anestesiados depois de 7 dias da infusão bilateral de 6-OHDA intranigral	31
Figura 5 – Análise dos parâmetros cardiovasculares em ratos acordados depois de 7 dias da lesão bilateral de 6-OHDA intranigral submetidos à infusão endovenosa de prazosin	33
Figura 6 – Análise dos parâmetros cardiovasculares em ratos acordados depois de 7 dias da lesão bilateral de 6-OHDA intranigral submetidos à infusão endovenosa de propranolol ou atropina	35
Figura 7 – Análise do barorreflexo espontâneo em ratos acordados depois de 7 dias da infusão bilateral de 6-OHDA intranigral.....	37

Estudo II

- Figura 1** – Nível de dopamina (DA) no estriado quantificado por HPLC após 7 dias da infusão bilateral de veículo (sham) ou toxina (6-OHDA).....51
- Figura 2** – Análise dos parâmetros cardiovasculares em ratos não anestesiados depois de 7 dias da infusão bilateral de 6-OHDA intranigral.....52
- Figura 3** – Análise do quimiorreflexo em ratos não anestesiados depois de 7 dias da infusão bilateral de 6-OHDA intranigral54
- Figura 4** – Traçados típicos da pressão arterial pulsátil, pressão arterial média, frequência cardíaca após KCN endovenoso.....55
- Figura 5** – Análise do barorreflexo após infusão endovenosa de fenilefrina (FE) em ratos não anestesiados depois de 7 dias da infusão bilateral de 6-OHDA intranigral.....57
- Figura 6** – Traçados típicos de pressão arterial pulsátil, pressão arterial média, frequência cardíaca após fenilefrina endovenosa.....58
- Figura 7** – Análise do barorreflexo após infusão endovenosa de nitroprussiato de sódio (NPS) em ratos não anestesiados depois de 7 dias da infusão bilateral de 6-OHDA intranigral.....60
- Figura 8** – Traçados típicos da pressão arterial pulsátil, pressão arterial média, frequência cardíaca após NPS endovenoso61

Estudo III

- Figura 1** – Nível de dopamina no estriado quantificado por HPLC após 7 dias da infusão bilateral de 6-OHDA ou veículo (sham)74
- Figura 2** – Viabilidade do músculo liso vascular. Não houve diferença entre a viabilidade muscular nos grupos sham e 6-OHDA76
- Figura 3** – Curvas concentração-efeito cumulativas para Fenil obtidas em anéis de aorta E+ e E-, isolados de ratos sham e lesados com 6-OHDA78
- Figura 4** – Curvas concentração-efeito cumulativas para acetilcolina (Ach) obtidas em anéis de aorta E+, isolados de ratos sham e lesados com 6-OHDA.....80
- Figura 5** – Curvas concentração-efeito cumulativas para nitroprussiato de sódio (NPS) obtidas em anéis de aorta E+ , isolados de ratos sham e lesados com 6-OHDA.....81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-OHDA	6-Hidroxidopamina
ATP	Adenosina trifosfato
BRS	Sensibilidade barorreflexa
DA	Dopamina
DP	Doença de Parkinson
DAT	Transportador de dopamina
FE	Fenilefrina
FC	Frequência cardíaca
FSC	Fluxo sanguíneo cerebral
HF	"High frequency"
HO	Hipotensão ortostática
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IP	Intervalo de pulso
KCL	Cloreto de potássio
KCN	Cianeto de potássio
LF	"Low frequency"
MAO	Monoamina oxidase
MPP ⁺	1-metil-4-fenilpiridina
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NPS	Nitroprussiato de sódio
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica

PAM	Pressão arterial média
PAP	Pressão arterial pulsátil
PAS	Pressão arterial sistólica
REM	"Rapid Eye Movement"
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SNpc	Substância Negra <i>pars compacta</i>
TH	Tirosina hidroxilase
VLF	"Very high frequency"

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	01
1.1	Doença de Parkinson e parkinsonismo	01
1.2	Modelos animais de parkinsonismo.....	06
1.2.1	O modelo da 6-hidroxidopamina	08
1.3	Disautonomias e parkinsonismo	10
1.3.1	Alterações cardiovasculares no parkinsonismo	12
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Geral	15
2.2	Objetivos Específicos	15
3	ESTUDOS	16
3.1	Estudo I -DISAUTONOMIA E DOENÇA DE PARKINSON: ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E MODULAÇÃO AUTÔNOMICA EM RATOS NÃO ANESTESIADOS APÓS INFUSÃO BILATERAL DE 6-OHDA.....	16
3.1.1	Introdução	16
3.1.2	Material e Métodos	18
3.1.3	Resultados.....	24
3.1.4	Discussão	38
3.2	Estudo II - ALTERAÇÕES NOS REFLEXOS CARDIOVASCULARES NO PARKINSONISMO INDUZIDO POR 6-OHDA EM RATOS	44
3.2.1	Introdução	44
3.2.2	Material e Métodos	46
3.2.3	Resultados.....	50
3.2.4	Discussão	64
3.3	Estudo III - REATIVIDADE VASCULAR EM ANÉIS DE AORTA DE RATOS INDUZIDOS AO PARKINSONISMO POR 6-OHDA	68
3.3.1	Introdução	68
3.3.2	Material e Métodos	69
3.3.3	Resultados.....	73
3.3.4	Discussão	82

4	CONCLUSÃO.....	85
5	REFERÊNCIAS.....	86
	ANEXO.....	102
	Artigo I	103

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Parkinson e parkinsonismo

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda mais frequente doença neurodegenerativa após a demência de Alzheimer. As manifestações clínicas ou denominados sinais cardinais da DP incluem bradicinesia, tremor ao repouso, rigidez, instabilidade postural e anormalidades na marcha (Dunnett e Bjorklund, 1999; Dauer e Przedborski, 2003; Emborg, 2004).

Foi descrita como “paralisia dos tremores” ou “paralisia agitante”, em 1817 pelo médico inglês James Parkinson, em seu estudo intitulado como “*Essay on the Shaking Palsy*” (Dauer e Przedborski, 2003; Takahashi e Wakabayashi, 2005). A mudança do nome de paralisia agitante para Doença de Parkinson foi sugerida por Charcot, em homenagem à descrição clássica de James Parkinson. Charcot contribuiu na descrição clínica da doença, definindo a presença dos chamados sinais cardinais, no diagnóstico diferencial e até mesmo no tratamento (Teive, 1998). Atualmente, após quase dois séculos de sua descrição inicial, a DP ainda é uma doença de patogênese pouco compreendida, sendo seu tratamento basicamente sintomático (Lev *et al.*, 2003; Shimohama *et al.*, 2003).

A principal característica neuroquímica e neuropatológica da DP é a perda progressiva de neurônios dopaminérgicos da Substância Negra *pars compacta* (SNpc) associada às inclusões citoplasmáticas denominadas de corpos de Lewy,

essas que podem causar danos celulares, sequestrando proteínas importantes para a sobrevivência da célula nervosa. Os corpos de Lewy não são achados específicos da DP, são, também, encontrados em outras doenças neurodegenerativas como na Doença de Alzheimer e na Doença de Huntington (Valdeoriola *et al.*, 1997; Dunnett e Bjorklund, 1999; Dauer e Przedborski, 2003; Emborg, 2004; Schulz e Falkenburger, 2004; Przedborski, 2005).

A etiologia da DP, denominado parkinsonismo primário, idiopático ou esporádico, ainda permanece desconhecida, no entanto o parkinsonismo secundário é atribuído a traumas, ou por indução de drogas, hidrocefalia, hipóxia, infecções, tumor, entre outros. Ainda há outras formas de parkinsonismo, como as síndromes parkinsonianas (Parkinson-plus), como a síndrome de atrofia de múltiplos sistemas, degeneração ganglionar córtico basal, além da forma de parkinsonismo familiar - genético (Dauer e Przedborski, 2003; Vila e Przedborski, 2003; Fahn e Sulzer, 2004; Hald e Lotharius, 2005). Apesar de algumas variações clínicas e patológicas, nas diferentes formas de manifestações de parkinsonismo, todas apresentam iguais anormalidades bioquímicas, principalmente quanto à depleção do conteúdo de dopamina no mesencéfalo e na grande maioria dos casos, manifestam-se sem etiologia conhecida (Przedborski, 2005).

A via dopaminérgica nigroestriatal é composta por neurônios dopaminérgicos cujos corpos celulares se localizam na SNpc e projetam seus axônios para o caudado-putamen, ou corpo estriado (Przedborski, 2005). A redução na densidade neuronal (neurônios da SNpc) gera uma diminuição na projeção de fibras dopaminérgicas que se projetam para o estriado dorsal causando, por sua vez,

uma consequente redução dos níveis de dopamina (DA) (Figura 1). Também, observa-se a redução da atividade de enzimas envolvidas na síntese de DA, como a tirosina hidroxilase (TH) e DOPA-descarboxilase (Gerlach e Riederer, 1996).

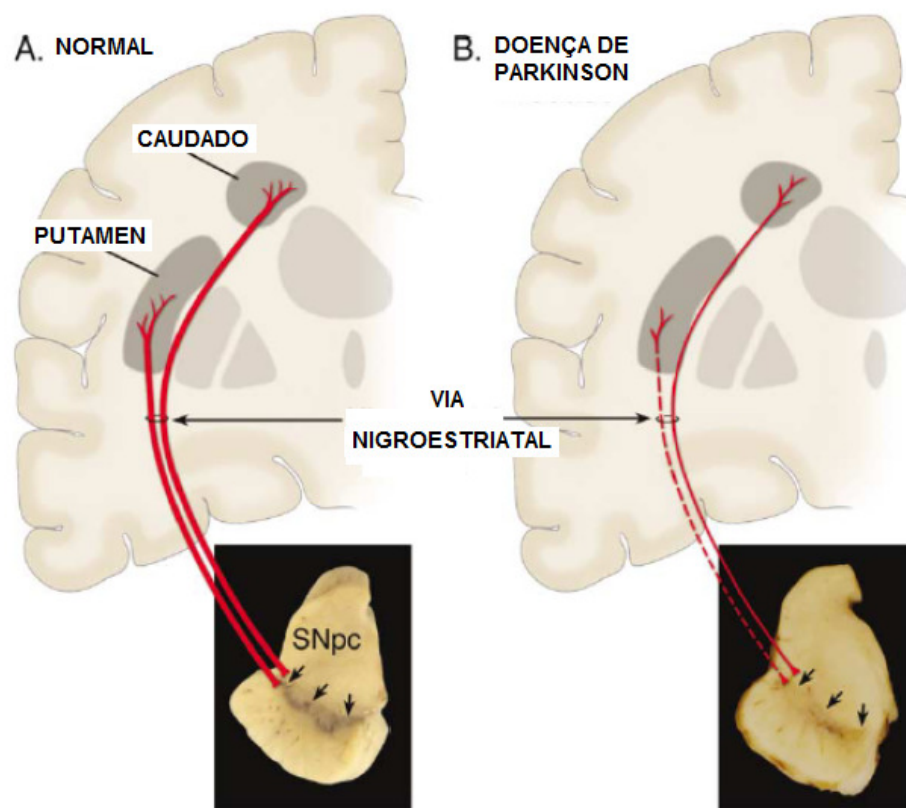


Figura 1: Representação esquemática da via nigroestriatal normal (A) e da via nigroestriatal na Doença de Parkinson (B). Adaptada de (Dauer e Przedborski, 2003).

Correlações entre análises clínicas e bioquímicas mostram que os sintomas característicos da DP começam a aparecer quando, aproximadamente, 60% e 80% dos conteúdos de DA na SNpc e no putamen, respectivamente, são perdidos (Dauer e Przedborski, 2003). Além da perda neuronal dopaminérgica, outros sistemas como o noradrenérgico, por meio da perda de neurônios do *locus coeruleus*, serotonérgico, pela redução de serotonina no Núcleo da Rafe e do sistema colinérgico, por redução de acetilcolina nos Núcleos Basais de Meynert, estão relacionados com os achados neuroquímicos e neuropatológicos na DP (Schulz e Falkenburger, 2004).

Nas últimas décadas, muitos estudos clínicos, *post-mortem* e experimentos *in vivo* e *in vitro*, com modelos animais, têm possibilitado algum entendimento sobre a patogênese da doença. As hipóteses incluem: defeitos conformacionais nas estruturas de proteínas citoplasmáticas e disfunções mitocondriais com consequente aumento do estresse oxidativo, resultando na morte neuronal. Outros fatores considerados envolvem a excitotoxicidade, neuroinflamação e eventos apoptóticos (Dauer e Przedborski, 2003; Singh e Dikshit, 2007).

Com relação à etiologia da DP, o que parece ser mais plausível é um envolvimento de todos os fatores que podem interagir e provocar a morte de neurônios da SNpc. Portanto, sugere-se que a degeneração neuronal não resulta apenas da ação de um único fator deletério, mas da convergência de diversos fatores patogênicos (Esposito *et al.*, 2007) (figura 2).

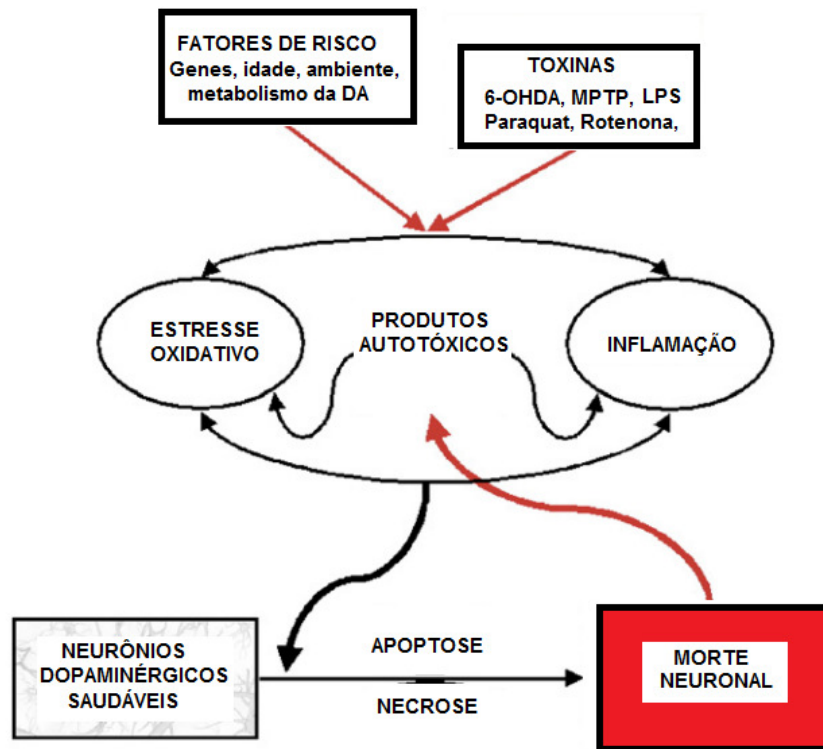


Figura 2: Interação sinérgica de mecanismos envolvidos na morte de neurônios dopaminérgicos no parkinsonismo. Adaptada de: (Esposito *et al.*, 2007).

Teoricamente, a neurodegeneração progressiva pode ser provocada por uma exposição crônica a neurotoxinas dopaminérgicas, ou apenas por uma breve exposição, que, de alguma maneira, já seria capaz de levar ao início de uma cascata de eventos deletérios (Dauer e Przedborski, 2003).

1.2. Modelos animais de parkinsonismo

Modelos animais devem apresentar características da doença presente no homem, simulando as mudanças patológicas, histológicas e bioquímicas da doença, bem como seus distúrbios funcionais. A DP é uma doença que se manifesta na espécie humana, não se manifestando espontaneamente em animais. Esse fato indica que características semelhantes somente são observadas em animais (p.e. macacos ou roedores), quando há a administração de agentes neurotóxicos, como a 6-hidroxi dopamina (6-OHDA), metanfetamina, rotenona ou 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (Gerlach e Riederer, 1996).

Modelos animais experimentais são ferramentas importantes na ciência médica, permitindo o estudo dos mecanismos patogênicos e ajudando a compreender os princípios terapêuticos no tratamento dos distúrbios funcionais (sintomas) de doenças humanas (Gerlach e Riederer, 1996). Ainda não há um modelo animal, que, por si só, consiga mimetizar todos os sinais e sintomas da DP (Dauer e Przedborski, 2003), no entanto existem características particulares de cada modelo que facilitam a elucidação da fisiopatologia e permitem estudos sobre a eficácia dos recursos terapêuticos e de novas abordagens a serem testadas (Ariza *et al.*, 2010). Alguns destes modelos são obtidos, por meio da utilização de neurotoxinas, como a 6-OHDA, a Rotenona, o paraquat, o MPTP e, recentemente, o lipopolissacarídeo (LPS) (Gerlach e Riederer, 1996; Duty e Jenner, 2011; Tieu, 2011).

Os alvos moleculares para os vários agentes utilizados para induzir modelos animais de parkinsonismo apresentam a característica de lesão na via nigroestriatal (Figura 3). Alguns devem ser administrados diretamente na região a ser lesada, pois não atravessam a barreira hemotaencefálica, como o 6-OHDA e o LPS. Esses agentes tóxicos, em sua maioria, inibem o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial (acredita-se que o Maneb - fungicida, atue no complexo III). Esta atividade conduz à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou diminuição da produção de ATP, que conduz à apoptose e à morte das células. O 6-OHDA e o MPP⁺ (1-metil-4-fenilpiridina) podem, também, induzir a produção de ROS diretamente dentro do citoplasma. O LPS ativa as células microgliais, para estimular a liberação de mediadores inflamatórios, os quais, por sua vez, produzem espécies reativas de nitrogênio (RNS). Ainda, mas com mecanismos pouco estudados, pode ocorrer a inibição da atividade do proteassoma, o que permitiria uma acumulação de proteínas danificadas e consequente dano de DNA. A morte celular por apoptose é muito considerada embora exista muita discussão e controversa entre autores (Duty e Jenner, 2011).

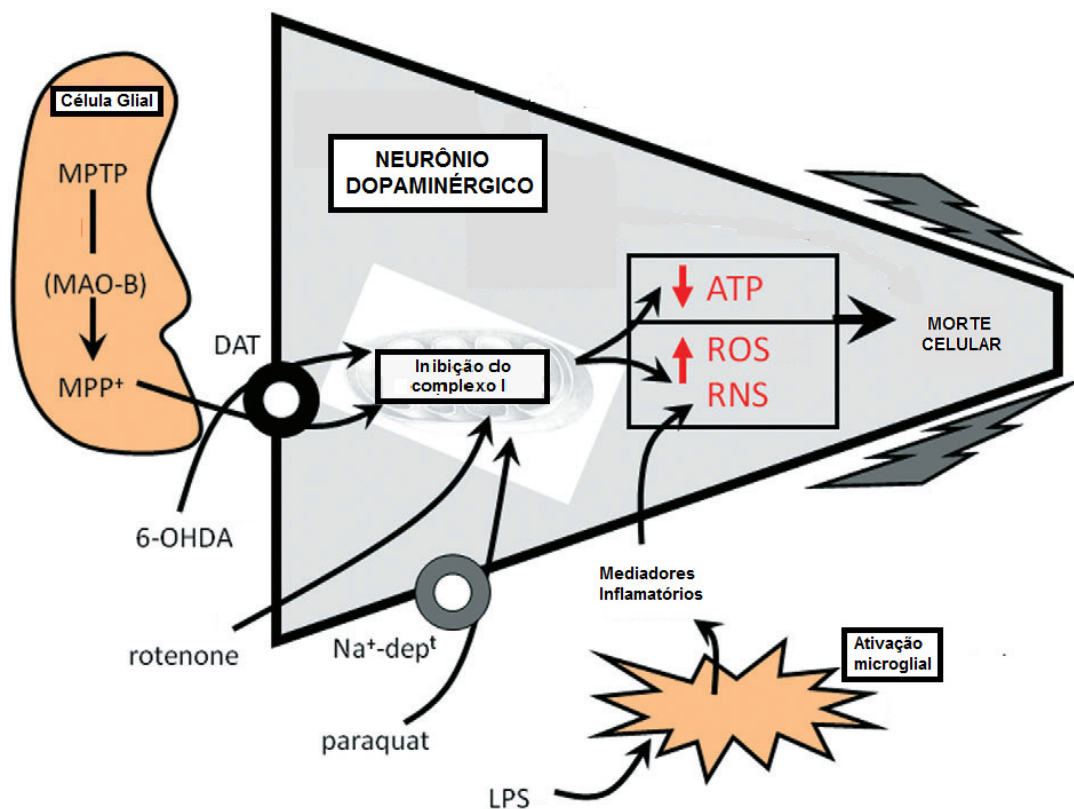


Figura 3: Alvos moleculares para os agentes tóxicos na morte de neurônios dopaminérgicos. Adaptada de: (Duty e Jenner, 2011). ATP: Adenosina trifosfato; DAT: Transportador de dopamina; Na⁺-dep^t: canal de sódio dependente; ROS: espécies reativas de oxigênio; RNS: espécies reativas de nitrogênio; MPP⁺: 1-metil-4-fenilpiridina; MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina; MAO: monoamina oxidase; 6-OHDA: 6-Hidroxidopamina; LPS: Lipopolisacarídeo.

1.2.1. O modelo da 6-hidroxidopamina (6-OHDA) em ratos

A utilização da 6-OHDA é um modelo clássico e foi identificado há mais de 50 anos. Esse modelo pode causar uma lesão parcial de 60 a 70% de degeneração da

via nigroestriatal, o que corresponderia ao início do aparecimento dos sinais e sintomas motores. Esse fato justifica o uso desse modelo quando a intenção de mimetizar uma fase precoce, antes dos sinais comportamentais aparecerem (Duty e Jenner, 2011).

Lesões parciais são produzidas pela injeção de uma dose de 6mg de 6-OHDA diretamente na SNpc ou no feixe prosencefálico medial, a qual é suficiente para produzir cerca de 70% de perda de células da substância negra e depleção de dopamina no estriado dentro de 2 semanas (Duty e Jenner, 2011).

O modelo de lesão com 6-OHDA assemelha-se, em muitos aspectos, com a DP, apresentando validade de construto (onde os mesmos processos psicobiológicos responsáveis pela etiologia e fisiopatologia dos sintomas clínicos estejam atuando no modelo), pois apresenta disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e inflamação; e validade de face (que é avaliada com base nas qualidades comportamentais e farmacológicas cujas semelhanças com o distúrbio humano podem ser demonstradas), apresentando alterações bioquímicas como diminuição de DA, degeneração da via nigroestriatal, alterações motoras como acinesia, entre outros (Willner, 1986; Duty e Jenner, 2011).

Apesar de não apresentar todas as características da doença, como a formação de corpus de Lewy (ainda controverso) e a neurodegeneração ocorrer muito mais rapidamente do que ocorre na DP, o modelo induzido pela lesão com 6-OHDA é um ótimo modelo e permanece na vanguarda da descoberta de drogas pré-clínicas para DP (validade preditiva) (Willner, 1986; Duty e Jenner, 2011).

1.3 Disautonomias e parkinsonismo

Além dos sinais motores, torna-se cada vez mais evidente que os pacientes com a DP sofrem de sintomas não-motores, que prejudicam sua qualidade de vida, consideravelmente (Buob *et al.*, 2010; Marrachelli *et al.*, 2010). No início, James Parkinson, ao descrever pela primeira vez a doença, já deixou registrada a possível concomitância de fenômenos disautonômicos associados à doença de Parkinson (Nicaretta *et al.*, 1998; Ziemssen e Reichmann, 2010). Dessa forma, estudos relacionados às vias autonômicas são de interesse, pois sugerem que na DP a neuropatologia ocorre precocemente em estruturas periféricas e acomete, ao longo da doença, as vias autonômicas para um posterior acometimento do sistema nervoso central (Braak *et al.*, 2003; Jain, 2011).

Marrachelli e colaboradores enfatizam que o sistema nervoso autônomo é a parte mais constante e rapidamente afetada do sistema nervoso, proporcionando, assim, uma base patológica do início da disfunção pré-motora (Marrachelli *et al.*, 2010).

A DP evolui em seis estágios neuropatológicos (descritos por (Braak *et al.*, 2003) (Figura 4), comprometendo vários neurotransmissores (dopamina, acetilcolina, serotonina, noradrenalina, entre outros) e leva a múltiplas manifestações clínicas, entre elas, as autonômicas. A literatura ressalta que o reconhecimento dos sintomas que antecedem ao quadro motor clássico (estágio inicial ou pré-motor) poderá contribuir para o diagnóstico precoce da DP, visto que

os sinais motores parkinsonianos aparecem quando a morte neuronal ultrapassa um limiar crítico (Meissner *et al.*, 2004).

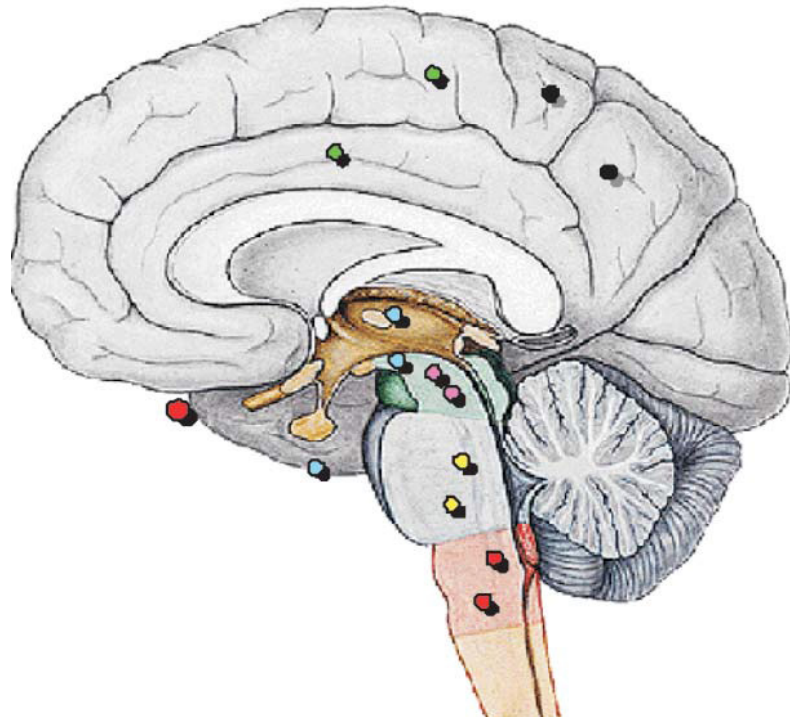


Figura 4: Esquema do encéfalo evidenciando os sítios anatômicos comprometidos nos estágios neuropatológicos da doença de Parkinson, segundo (Braak *et al.*, 2003). Os estágios correspondem às cores: 1 – vermelha; 2 – amarela; 3 – rosa; 4 – azul; 5 – verde; 6 – preta. Retirado de: Rosso *et al.*, 2008.

Outro fato relevante e que causa discussão entre os autores, a ser considerado nas disautonomias relacionadas com a DP, é a interferência de tratamentos aos quais esses pacientes precisam ser submetidos. As drogas utilizadas no tratamento da DP, entre elas a mais utilizada, a levodopa, podem, por

si sós, causar hipotensão ortostática (HO) ou mesmo agravá-la, quando pré-existente, assim como a lisurida ou a bromocriptina, agonistas dopaminérgicos, podem ocasionar vasodilatação periférica (Korczyn, 1990; Nicaretta *et al.*, 1998; Mosnaim *et al.*, 2010). Os antidepressivos tricíclicos, comumente utilizados, também podem induzir à hipotensão (Korczyn, 1990). Dessa forma, autores acreditam que o envolvimento do Sistema Nervoso Autônomo na DP possa decorrer da própria doença, da medicação em uso ou de uma combinação destes fatores (Stoessl, 1992; Nicaretta *et al.*, 1998). No entanto, trabalhos recentes mostram que pacientes fazendo uso dos medicamentos como o L-Dopa, não apresentam diferenças em sintomas relacionados à disfunção autonômica (Goldstein *et al.*, 2005). Esses achados também foram evidenciados em estudos com animais (Silva *et al.*, 2015).

A compreensão da fisiopatologia da disautonomia na DP é muito importante, visto que 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 acometidos pela patologia. Essa compreensão é necessária, para o avanço da pesquisa de novos tratamentos, além do fato de que poderia elucidar um possível diagnóstico precoce da DP.

1.3.1 Alterações cardiovasculares no parkinsonismo

Sinais não-motores acometem e diminuem a qualidade de vida dos pacientes com DP. Dentre esses sinais não-motores estão os distúrbios cardiovasculares, que

podem ser decorrentes do acometimento tanto do sistema nervoso central quanto de vias periféricas do sistema nervoso autônomo. Dentre esses sintomas, os distúrbios cardiovasculares como a hipotensão ortostática (HO), hipotensão pós-prandial além de arritmias cardíacas, *livedo reticularis* e edema de membros posição dependente, podem estar presentes em pacientes com DP (Nicaretta *et al.*, 1998; Ziemssen e Reichmann, 2010). Isto seria em razão do envolvimento de ambos, Sistema Nervoso Central bem como as vias pós-ganglionares periféricas do Sistema Nervoso Autônomo (Goldstein *et al.*, 2002; Jost, 2003; Adhiyaman *et al.*, 2008).

Apesar de muitas as especulações, a fisiopatologia da HO na DP, bem como a gravidade do comprometimento hemodinâmico, permanece controversa. Pode estar associada a um distúrbio central com repercussão ao nível bulbar (Singer *et al.*, 1992; Nicaretta *et al.*, 1998).

Segundo Jain e Goldstein, mecanismos fisiopatológicos subjacentes a anormalidades cardiovasculares autonômicas, como perda da inervação cardíaca simpática noradrenérgica (em todos as pessoas acometidas pela doença, e parece ser independente do distúrbio de movimento), a desnervação noradrenérgica extra-cardíaca (menos extensa) e a falha do barorreflexo arterial estariam presentes na DP. A diminuição da função de ambos os componentes, simpático e parassimpático, do barorreflexo arterial se encontraria presente na DP associado com hipotensão ortostática (Jain e Goldstein, 2012).

Autores sugerem que há perda de nervos simpáticos cardíacos, em estágios iniciais da DP, mesmo na ausência de sinais clínicos de disfunção autonômica. No entanto, com base nos resultados dos achados desses pesquisadores, baseados na

determinação direta de catecolaminas, os mesmos forneceram evidências contra uma relevante disfunção da função simpática. Os autores sugerem que, possivelmente, a desnervação simpática seria incompleta e as fibras restantes seriam suficientes para a manutenção do controle autonômico. Em contraste, a depressão dos vários parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca suportam uma alteração significativa da atividade parassimpática, em uma fase precoce da DP, com falha autonômica subclínica (Buob *et al.*, 2010).

Oka e colaboradores mostraram que há disfunção cardíaca, na fase inicial da DP, mesmo sem hipotensão ortostática, sendo essa decorrente da alteração vasomotora simpática e não parassimpática (Oka *et al.*, 2011),

Em virtude da grande discussão do papel e do real envolvimento do SNA na DP e da escassez de trabalhos em modelos animais (Slack *et al.*, 2010), faz-se importante o estudo das variáveis cardiovasculares, para que se possa analisar as alterações no controle cardiovascular e contribuir para novos achados relacionados às disfunções autonômicas relacionadas com o parkinsonismo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel do sistema nervoso autônomo, simpático e parassimpático, relacionando com as alterações cardiovasculares em ratos acordados e induzidos ao parkinsonismo por infusão bilateral de 6-OHDA na SNpc.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar as alterações cardiovasculares em animais controle ou lesados por 6-OHDA.
- Correlacionar lesões a sinais cardiovasculares em animais controle ou lesados por 6-OHDA.
- Investigar alterações na variabilidade da pressão arterial e frequência cardíaca basais em animais controle ou lesados por 6-OHDA.
- Estudar as variações hemodinâmicas, após o bloqueio do sistema nervoso autônomo, em animais controle ou lesados por 6-OHDA.
- Avaliar os reflexos cardiovasculares – barorreflexo e quimiorreflexo em animais controle ou lesados por 6-OHDA.
- Investigar possíveis alterações na reatividade vascular em aorta de animais controle ou lesados por 6-OHDA.

3. ESTUDOS

3.1. Estudo I

DISAUTONOMIA E DOENÇA DE PARKINSON: ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E MODULAÇÃO AUTONÔMICA EM RATOS NÃO ANESTESIADOS APÓS A INFUSÃO BILATERAL DE 6-OHDA NA SUBSTÂNCIA NEGRA

3.1.1. Introdução

A Doença de Parkinson (DP) é caracterizada por uma diminuição nos níveis de dopamina (DA) no estriado em razão da morte de neurônios na substância negra *pars compacta* (SNpc). Após uma diminuição de 80% dos níveis de DA no estriado, os sintomas motores clássicos da DP aparecem (Dauer e Przedborski, 2003; Tieu, 2011). Estes incluem bradicinesia, rigidez, tremor e instabilidade postural (Przedborski, 2005). Os sinais motores da DP são bem reconhecidos e estudados, no entanto, os sintomas de disautonomia raramente são considerados clinicamente, apesar de se manifestarem em todas as fases da DP, representando, muitas vezes, a queixa principal. A disautonomia prejudica, consideravelmente, a

qualidade de vida nas fases iniciais e pode ser debilitante com o avanço da doença (Chaudhuri *et al.*, 2006; Chaudhuri e Schapira, 2009).

O envolvimento cardiovascular é muito comum em pacientes com DP (Low, 2008; Khedr *et al.*, 2013). Hipotensão ortostática (HO), hipotensão pós-prandial, bem como arritmias cardíacas, livedo reticularis e edema nas pernas são comumente relatados (Nicaretta *et al.*, 1998; Ziemssen e Reichmann, 2007). A HO é o sintoma mais relatado com uma prevalência de até 58% em pacientes com DP (Low, 2008; Jain, 2011). No entanto, apesar de toda a especulação, a patofisiologia da HO, bem como a gravidade do comprometimento hemodinâmico, permanece controversa. Isto tem sido associado a uma desordem com o envolvimento de ambos, sistema nervoso central e das vias pós-ganglionares periféricas do sistema nervoso autônomo (Singer *et al.*, 1992; Nicaretta *et al.*, 1998; Goldstein *et al.*, 2002; Jost, 2003; Adhiyaman *et al.*, 2008).

Autores sugerem que a desnervação simpática pode ser incompleta e que as fibras restantes são suficientes para a manutenção da regulação autonômica. Além disso, sugerem que a diminuição dos parâmetros de frequência cardíaca (FC) apoiam mudanças significativas na atividade parassimpática em estágios iniciais de DP com falência autonômica subclínica (Buob *et al.*, 2010). Em contraste, a literatura sugere que a disfunção cardíaca, mesmo sem HO, é por causa de alterações no sistema nervoso autonômico simpático (Goldstein *et al.*, 2002).

A compreensão da fisiopatologia da disautonomia na DP é muito importante, visto que 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 acometidos pela doença. Essa compreensão é necessária para o avanço da pesquisa de novos tratamentos, além de facilitar um possível diagnóstico precoce da DP.

Considerando a importância de elucidar o papel e a participação da função autonômica em pacientes com DP e a escassez de estudos em modelos animais, este estudo investigou a função cardiovascular, avaliando a modulação autonômica em um modelo animal de parkinsonismo induzido pela infusão bilateral da toxina 6-OHDA na SNpc.

3.1.2. Material e Métodos

Todos os experimentos foram realizados em ratos Wistar adultos, pesando entre 280-320 gramas no início dos protocolos. Esses animais foram fornecidos pelo biotério central da Universidade Estadual de Londrina, UEL. No biotério setorial, os animais foram mantidos, em caixas de polipropileno (45X25X25cm), em sala com temperatura controlada ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com comida e água à vontade, exceto durante os experimentos. Todos os protocolos experimentais foram realizados de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório e os Princípios Éticos na Experimentação Animal estabelecido pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Esta investigação foi aprovada pelo Comitê de Ética em Utilização

Animal (CEUA) da Universidade Estadual de Londrina (processo número: 1288.2012.55).

Cirurgia estereotáxica

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com tribromoetanol (250 mg/kg) e colocados em um aparelho estereotáxico (David Kopf). Em seguida, foram feitas perfurações nos crânios dos animais 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, bilateralmente. Foram utilizadas as seguintes coordenadas estereotáxicas determinadas a partir do bregma: - 5,0 mm do bregma; latero-lateral (LL) \pm 2,1 mm da linha média; dorsoventral (DV), - 8,0 mm do crânio segundo (Paxinos e Watson, 1998). A microinfusão foi realizada com o auxílio de uma agulha (30 gauge), conectada a um tubo de polietileno adaptado a uma microseringa de 10 μ l (Hamilton, EUA), encaixada em uma bomba de infusão. Seguida à infusão da toxina (3 minutos), a agulha permanecia no local por mais 2 minutos para evitar o refluxo da substância. A seguir, o escalpo era suturado e os animais eram retirados do estereotáxico e colocados em gaiolas individuais com ambiente aquecido para recuperação da anestesia e, posteriormente, eram encaminhados à sala de manutenção dos animais. O grupo sham era submetido ao mesmo procedimento cirúrgico, entretanto, não recebia a infusão de nenhuma toxina, sendo infundido somente veículo nas mesmas coordenadas estereotáxicas.

Todos os animais receberam doses profiláticas (30.000 UI) de pentabiótico veterinário e foram acompanhados na sua recuperação.

Registro dos parâmetros cardiovasculares

No sexto dia após a cirurgia estereotáxica e 24 horas antes dos registros, os animais foram novamente anestesiados com tribromoetanol (250 mg / kg) e cateteres de polietileno foram inseridos na artéria e veia femoral. Ambos foram exteriorizados na região dorsal dos animais, para registrar a pressão arterial média (PAM) e FC e para posterior infusão de drogas (Da Cunha *et al.*, 2014).

Os parâmetros basais foram obtidos, durante pelo menos 20 minutos, antes do início do protocolo experimental. A cânula arterial foi acoplada a um transdutor de pressão (Powerlab modelo MLT0380) e conectado a um sistema de registro computadorizado (Powerlab/ADInstruments), obtendo-se, assim, a pressão arterial pulsátil (PAP). A pressão arterial média (PAM) e a (FC) foram registradas em um segundo e terceiro canal, respectivamente, sendo obtidas da PAP. Estas gravações foram feitas com os animais não anestesiados e movendo-se livremente.

Bloqueio autonômico

Depois do registro dos valores basais, animais dos grupos sham e 6-OHDA receberam a infusão de antagonistas α -adrenérgicos, receptores muscarínicos, e antagonismo β -adrenérgico. Foram administrados intravenosamente: prazosin (1 mg / mL), ou metilatropina (1 mg / kg), ou propranolol (5 mg / kg). A PAM e FC foram monitoradas até que os efeitos da droga foram avaliados. As concentrações das

drogas foram escolhidas com base em estudos anteriores (Fazan Junior *et al.*, 1997; Souza *et al.*, 2008; Karlen-Amarante *et al.*, 2012)

Dissecação do estriado

Os animais foram decapitados e as amostras de tecido cerebral foram isoladas. O corpo do estriado de cada animal foi dissecado manualmente e pesado, garantindo, assim, a homogeneidade. As amostras foram armazenadas a -80 ° C até posterior análise.

Determinação dos níveis de DA no estriado 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 15 µL/mg de material cerebral. Após sonicação, os homogenatos foram centrifugados a 13.000 rpm durante 10 min a 4 ° C e 30 µL. O sobrenadante foi injetado em uma estação de cromatografia líquida de alta performance 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.

Variabilidade da PA e FC

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>). Uma vez que o programa computacional não realiza aquisição de dados, registros de PA basal foram processados pelo programa computacional LabChart 7.0 (ADInstruments, Bella Vista, Austrália), o qual é capaz de detectar pontos de inflexão nos pulsos de pressão e gerar séries, batimento-a-batimento, com valores de IP e PAS para cada ciclo cardíaco.

As séries temporais, batimento-a-batimento, com valores de IP e PAS foram reamostradas em 10 Hz (1 valor a cada 100 ms) por interpolação cúbica do tipo spline, para regularização do intervalo de tempo entre batimentos. As séries com valores interpolados de IP e PAS foram divididas em segmentos com 512 valores cada, com sobreposição de 50% (Protocolo de Welch). A 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 (ms^2 ou mmHg^2) e normalizadas (un). Os valores normalizados foram obtidos por meio de cálculos da potência relativa das bandas de LF e HF levando em consideração a potência total de espectro menos a potência de banda de muito baixa frequência (VLF: $< 0,20$ Hz). Para avaliar o balanço simpátovagal cardíaco, calculou-se a razão entre a potência

das bandas de LF e HF (LF/HF) do espectro do IP (Dutra *et al.*, 2013; Tezini *et al.*, 2013).

Análise do barorreflexo espontâneo

A sensibilidade barorreflexa (SBR) foi avaliada por meio do Método da Sequência. Utilizando-se o programa computacional CardioSeries v2.4 (<http://www.danielpenteado.com>), séries temporais batimento-a-batimento com valores de IP e PAS foram utilizadas para análise da SBR. As séries temporais foram analisadas, em busca de sequências de quatro ou mais batimentos, nos quais aumentos progressivos da PAS foram acompanhados por aumentos progressivos do IP ou reduções progressivas da PAS foram acompanhadas por reduções progressivas do IP. Para detecção das alterações da PAS e do IP, foram utilizados os limiares de 0 mmHg e 0 ms, respectivamente. Após 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.

Análise estatística

As diferenças entre os grupos experimentais foram comparados com o teste *t de Student* para amostras não pareadas. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

3.1.3. Resultados

Determinação dos níveis de DA estriatal

A análise neuroquímica indicou que os níveis de DA do grupo 6-OHDA foram menores ($1,12 \pm 0,14$; $n = 30$) quando comparado com o grupo sham ($5,22 \pm 0,31$, $p < 0,0001$; $n = 32$). Estes resultados indicaram uma diminuição da DA maior que 50%, confirmando a lesão nos ratos submetidos à infusão bilateral de 6-OHDA (Figura 1).

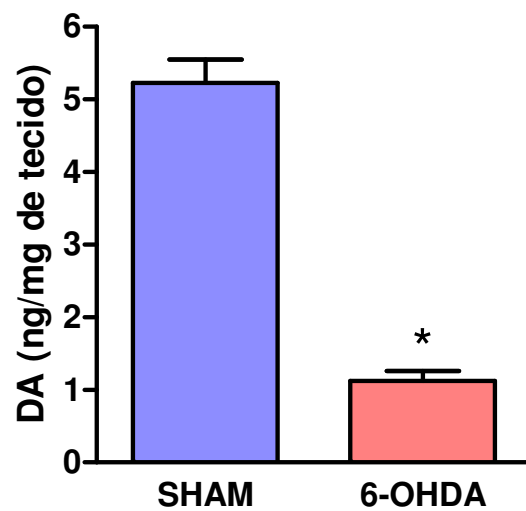


Figura 1: Nível de dopamina (DA) no estriado quantificado por HPLC após 7 dias da infusão bilateral de veículo (sham) ou toxina (6-OHDA). Os resultados foram expressos como média \pm SEM e a diferença entre o grupo sham (n= 30) e com lesão - 6-OHDA (n=32) considerada significativa foi de $p < 0,05$.

Parâmetros cardiovasculares

Os valores basais de PA e FC (Figura 2) nos animais 6-OHDA mostraram-se reduzidos comparados com os animais sham (6-OHDA: PAM, 100 ± 1 mmHg; FC, 335 ± 6 bpm; PAS, 122 ± 1 mm Hg; PAD, 82 ± 1 mm Hg; n = 30; Sham: PAM, 111 ± 1 mmHg; FC, 355 ± 6 bpm; PAS, 137 ± 2 mmHg; PAD, 92 ± 1 mm Hg; n = 32).

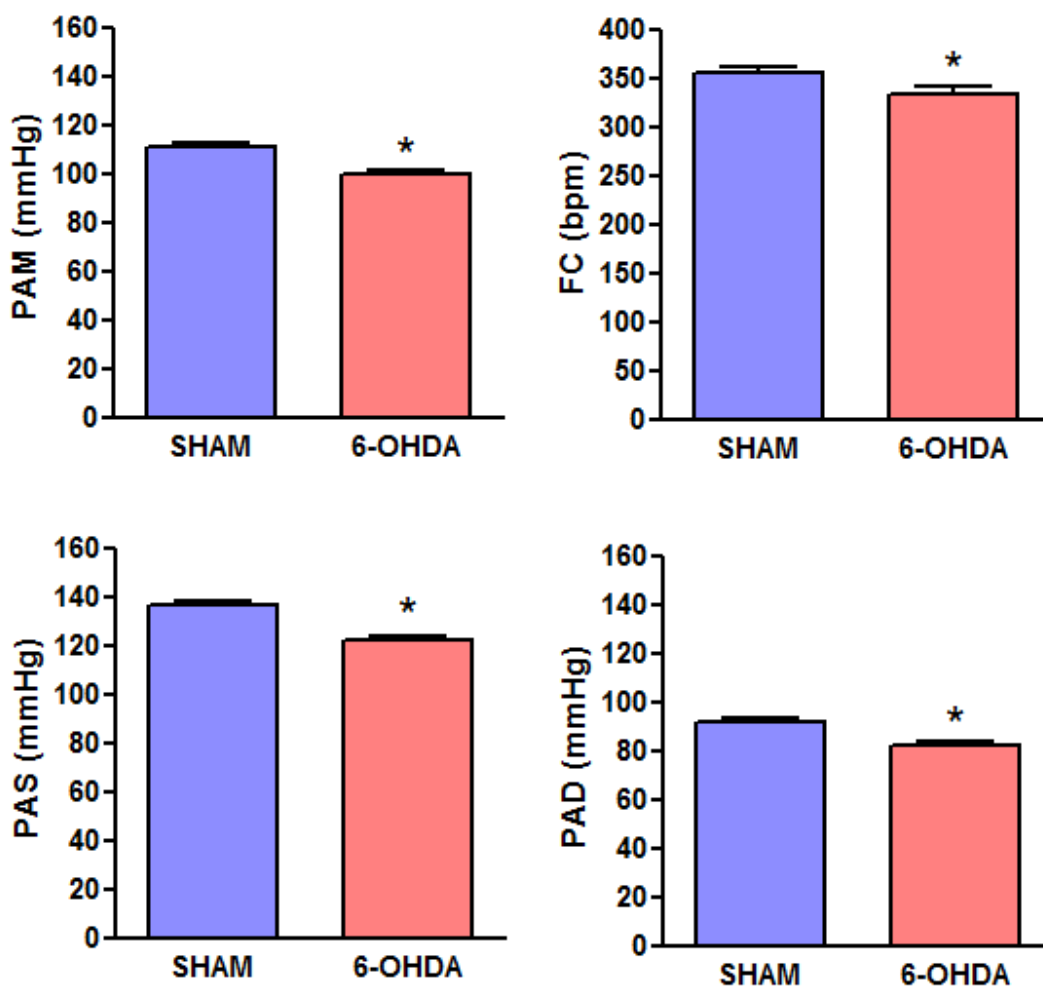


Figura 2: Parâmetros cardiovasculares em ratos não anestesiados depois de 7 dias da infusão bilateral de 6-OHDA intranigral ou sham. PAM: Pressão arterial média; FC: Frequência cardíaca; PAS: Pressão arterial sistólica; PAD: Pressão arterial diastólica Os resultados foram expressos como média \pm SEM e a diferença entre o grupo sham (n= 30) e com lesão - 6-OHDA (n=32) considerada significativa foi de $p < 0,05$.

Análise de variabilidade

Os resultados mostraram uma menor variância na PA (Figura 3) no modelo animal de 6-OHDA comparado com os animais sham (6-OHDA: $5,07 \pm 0,69$, n = 30; sham: $9,24 \pm 1,25$, n = 32; p <0,05).

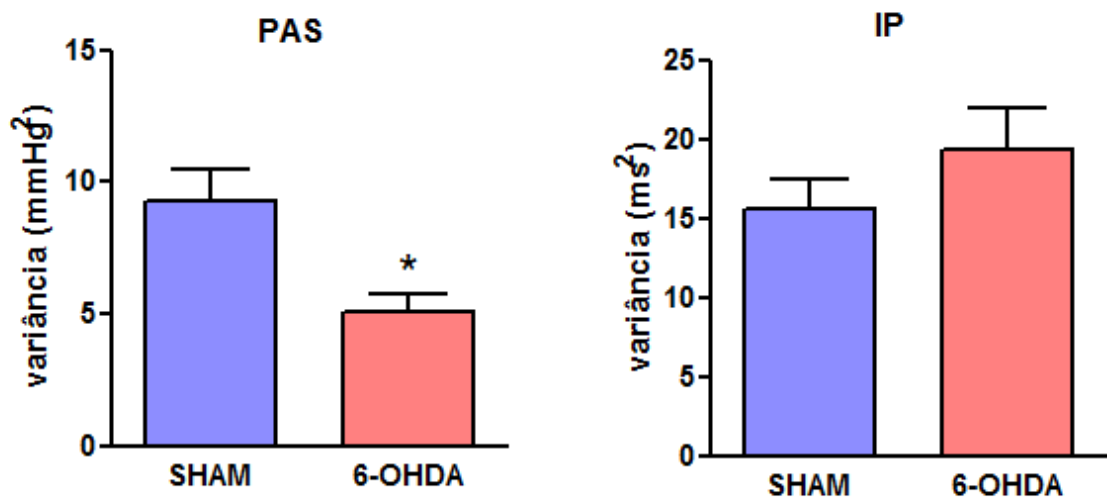


Figura 3: Análise da variabilidade da pressão arterial e frequência cardíaca em ratos não anestesiados depois de 7 dias da infusão bilateral de 6-OHDA intranigra ou cirurgia sham. PAS: Pressão arterial sistólica; IP: Intervalo de pulso. Os resultados foram expressos como média \pm SEM e a diferença entre o grupo sham (n= 30) e com lesão - 6-OHDA (n=32) considerada significativa foi de $p < 0,05$.

A análise espectral da PAS (Figura 4) mostrou que os animais lesados com 6-OHDA exibiram uma diminuição no componente LF (6-OHDA: $3,06 \pm 0,30$, $n = 30$; sham: $4,74 \pm 0,71$, $n = 32$; $p < 0,05$). Na modulação autonômica do IP, nenhum dos parâmetros foi significativamente diferente entre os grupos (6-OHDA: LF, $31,59 \pm 2,23$; IC, $70,10 \pm 2,41$; LF / HF, $0,55 \pm 0,06$; sham: LF, $29,55 \pm 2,36$; HF, $69 \pm 2,23$; LF / HF, $0,59 \pm 0,10$).

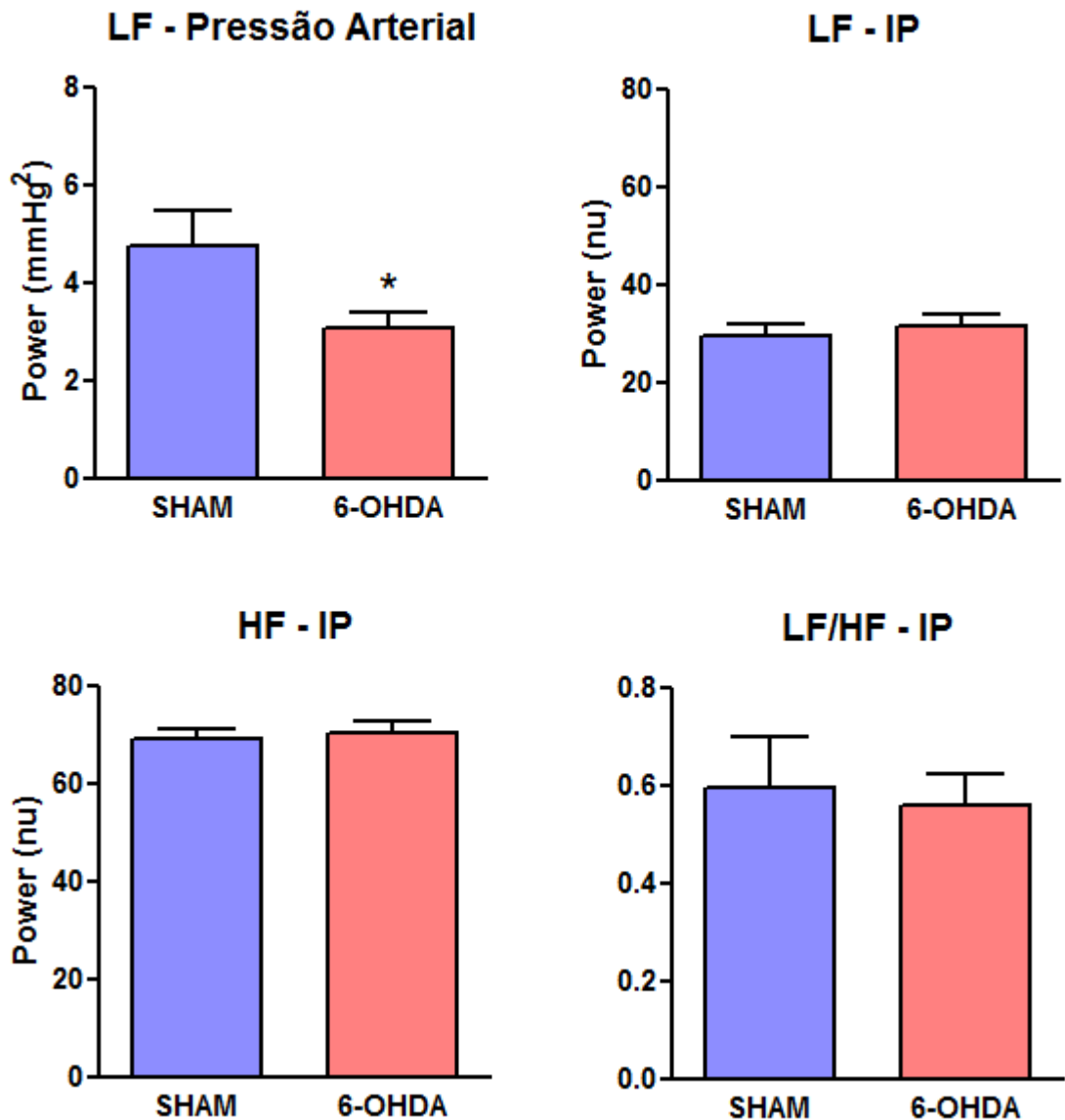


Figura 4: Análise espectral da variabilidade da pressão arterial e intervalo de pulso em ratos não anestesiados depois de 7 dias da infusão bilateral de 6-OHDA intranigral. IP: Intervalo de pulso; LF: : Low frequency; HF: High frequency. Os resultados foram expressos como média \pm SEM e a diferença entre o grupo sham (n= 30) e com lesão - 6-OHDA (n=32) considerada significativa foi de $p < 0,05$.

Bloqueio autonômico farmacológico

Quando o bloqueador alfa-adrenérgico foi administrado (Figura 5), os animais 6-OHDA exibiram uma menor queda da pressão arterial (Δ PAM: -25 ± 5 , Δ PAS: -30 ± 6 , e Δ PAD: -21 ± 4 ; $n = 7$) em comparação com o grupo sham (Δ PAM: -47 ± 4 , Δ PAS: -56 ± 5 , e Δ PAD: -39 ± 4 ; $n = 8$, $p < 0,005$). Não houve diferença significativa nas respostas de FC entre o grupo sham (Δ FC: 43 ± 22 , $n = 8$) e o grupo 6-OHDA (Δ FC: 58 ± 14 , $n = 7$).

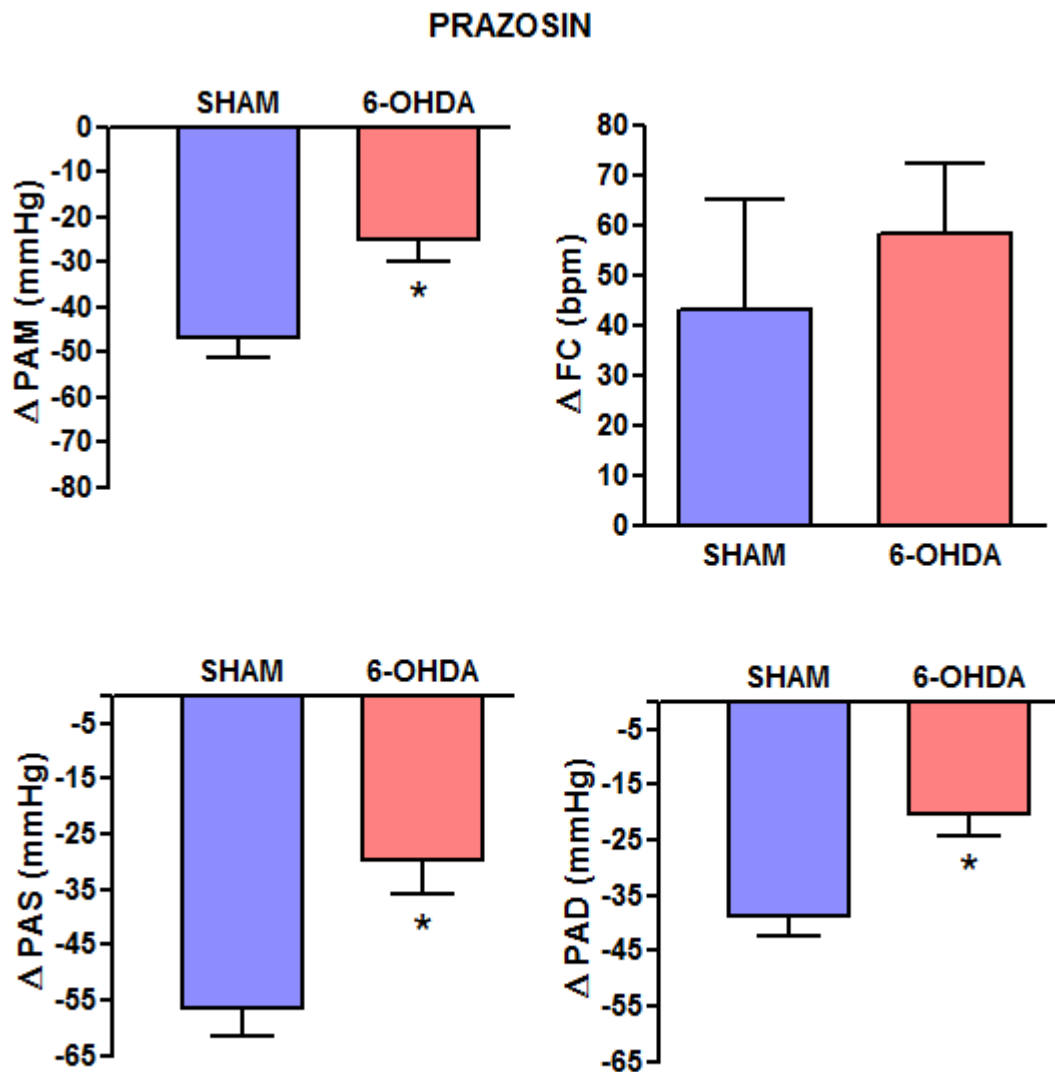


Figura 5: Análise dos parâmetros cardiovasculares em ratos acordados depois de 7 dias da lesão bilateral de 6-OHDA intranigral submetidos à infusão endovenosa de prazosin. PAM: Pressão arterial média; FC: Frequência cardíaca;. PAS: Pressão arterial sistólica; PAD: Pressão arterial diastólica Os resultados foram expressos como média \pm SEM e a diferença considerada significativa foi de $p < 0,05$.

Não houve diferença significativa na FC entre o grupo 6-OHDA e os animais sham em resposta à administração intravenosa de antagonista β -adrenérgico ou muscarínico (propranolol administrado por via intravenosa em ratos 6-OHDA: ΔFC , -33 ± 5 e em ratos de controle: ΔFC , -34 ± 5 ; atropina administrada por via intravenosa em ratos lesionados: ΔFC , 129 ± 14 e em ratos de controle: ΔFC , 123 ± 7) (Figura 6).

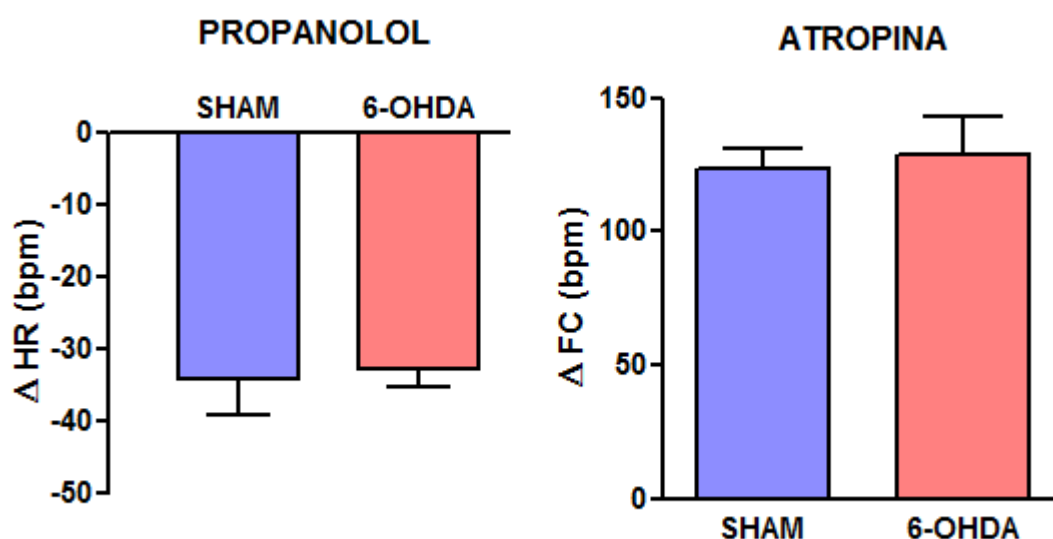


Figura 6: Análise dos parâmetros cardiovasculares em ratos acordados depois de 7 dias da lesão bilateral de 6-OHDA intranigral submetidos à infusão endovenosa de propranol ou atropina. Não houve diferença estatisticamente significativa nos animais submetidos à lesão quando comparados aos animais controle. PAM: Pressão arterial média; FC: Frequência cardíaca; PAS: Pressão arterial sistólica; PAD: Pressão arterial diastólica Os resultados foram expressos como média \pm SEM e a diferença considerada significativa foi de $p < 0,05$.

Análise do barorreflexo espontâneo

Na análise do barorreflexo espontâneo, não houve diferença na efetividade entre os grupos (sham: $0,15 \pm 0,009$, $n = 32$; 6-OHDA: $0,17 \pm 0,007$, $n = 30$). Com relação ao ganho barorreflexo, nas sequências "up", nas sequências down e no ganho total, observou-se um aumento no grupo 6-OHDA (sequências up: $1,85 \pm 0,17$; sequências down: $1,87 \pm 0,20$; ganho total: $1,85 \pm 0,17$) em comparação com o grupo sham (sequências "up": $1,34 \pm 0,08$; sequências "down": $1,37 \pm 0,09$; ganho total: $1,35 \pm 0,08$) (Figura 7).

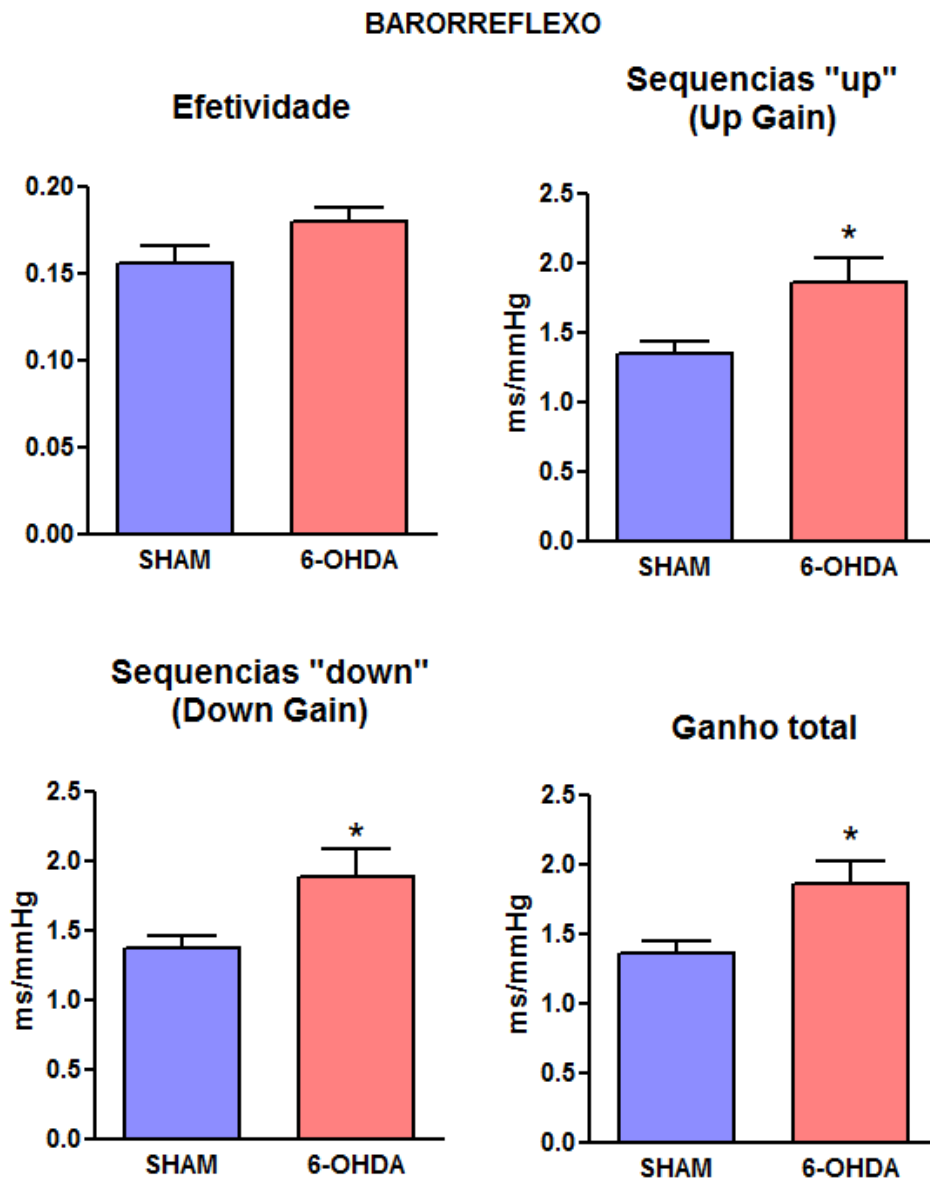


Figura 7: Análise do barorreflexo espontâneo em ratos acordados depois de 7 dias da infusão bilateral de 6-OHDA intranigral. PAM: Pressão arterial média; FC: Frequência cardíaca; PAS: Pressão arterial sistólica; PAD: Pressão arterial diastólica. Os resultados foram expressos como média \pm SEM e a diferença considerada significativa foi de $p < 0,05$

Discussão

No presente estudo, investigamos alterações na modulação autonômica e cardiovasculares após lesão na SNpc pela infusão bilateral de 6-OHDA. Neste estudo foi demonstrado inicialmente a diminuição nos níveis de DA, no estriado nos animais 6-OHDA, caracterizando o modelo de parkinsonismo. Nossos resultados mostraram que 7 dias, após a lesão na SNpc pela infusão de 6-OHDA, houve alterações nos valores basais dos registros das variáveis cardiovasculares (diminuição na PAM e FC), bem como alterações na modulação autonômica e mudanças no tônus cardiovascular após o bloqueio farmacológico. Os nossos dados sugerem a presença de uma deficiência simpática vascular no modelo de parkinsonismo por infusão de 6-OHDA .

Um modelo ideal de parkinsonismo deve apresentar características patológicas e clínicas que imitam a doença humana, incluindo mudanças autonômicas e cardiovasculares semelhantes e sinais ou sintomas comportamentais que envolvem os sistemas dopaminérgico e noradrenérgico, que são características de alterações no sistema nervoso central e autônomo. Além disso, ele deve refletir a natureza progressiva da DP, tomando em consideração a idade e envelhecimento. Infelizmente, nenhum dos modelos atuais apresenta todas estas características (Ariza *et al.*, 2010; Tieu, 2011). A escolha do modelo se fez em virtude de esse ser um modelo clássico, que está associado com alterações comportamentais e motoras que são típicas da DP (Dauer e Przedborski, 2003; Duty e Jenner, 2011).

Em geral, uma concentração de cerca de 6 ug/mL de 6-OHDA injetados na SNPc (1 µL) é suficiente para produzir depleção de, aproximadamente, 70% nos níveis de DA estriatais em poucos dias. Este é o grau de depleção destinada para modelos que tentam mimetizar as fases iniciais da DP (em conjunto com o aparecimento dos sinais motores) (Duty e Jenner, 2011). Por conseguinte, o modelo de parkinsonismo com a infusão bilateral de 6-OHDA foi escolhido para replicar a deficiência estriatal de DA observada em pacientes com DP e determinar se os efeitos cardiovasculares no modelo correlacionam-se com as observadas no pacientes.

Nos animais com lesão por 6-OHDA, foram observadas menor PAM e FC durante o registro basal desses parâmetros. Outro estudo utilizando animais com infusão bilateral de 6-OHDA no estriado e examinando as mudanças nos ritmos circadianos, os autores descreveram uma perda de periodicidade circadiana, particularmente na FC (Boulamery *et al.*, 2010). Em outro estudo, utilizando telemetria, foi observada uma PA e FC mais baixas em um modelo com lesão na área tegumentar ventral (Sakata *et al.*, 2002).

Sete dias após a lesão na SNpc e conseqüente diminuição dos níveis de DA, foram observadas alterações na modulação autonômica. (Chiaravalloti *et al.*, 2013) sugeriram que a relação entre os sistemas simpático e dopaminérgico deve ser mais bem avaliada em pacientes com DP em virtude de suas possíveis funções na fisiopatologia da doença, além dos resultados de um estudo de cintilografia que sugere que o sistema simpático cardíaco e nigroestriatal são afetados de forma diferente na DP. Em particular, a taxa de morte neuronal do sistema nigroestriatal

não está relacionada com a do sistema nervoso simpático e vice-versa. Portanto, a extensão das lesões dopaminérgicas não indicam o grau dos danos no sistema autônomo simpático. A disfunção cardiovascular existe mesmo com lesões dopaminérgicas menores.

Varias ferramentas têm sido utilizadas para avaliar a função simpática e parassimpática em doenças cardiovasculares. Entre estas, o antagonismo farmacológico pode ser usado para avaliar os efeitos do tônus simpático e parassimpático pré-existente sobre o coração. Um método não invasivo, como a análise da variabilidade, estima a atividade neural e não-neural em resposta a flutuações na FC a curto e longo prazo (Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology, 1996)]. A redução da variabilidade da frequência cardíaca tem sido identificada como um forte indicador de risco relacionado com um grande número de doenças, refletindo o papel vital do sistema nervoso autônomo na manutenção da saúde (Vanderlei *et al.*, 2009).

Nossos resultados mostraram uma diminuição da variabilidade da PA em animais 6-OHDA. Encontramos, também, uma diminuição em LF da PAS, que indicou uma modulação simpática mais baixa. Estes resultados corroboram os achados em seres humanos que mostram que a atividade do sistema nervoso simpático é atenuada em pacientes com DP e distúrbio comportamental do sono REM, especialmente quando observaram diferenças nas variáveis da variabilidade da frequência cardíaca que são atribuídas à atividade parassimpática, indicando

que o sistema nervoso parassimpático cardíaco, que se origina nos corpos celulares do núcleo ambíguo, pode ser relativamente bem conservado nos doentes com Parkinson. A redução progressiva da atividade do sistema nervoso simpático está relacionada à disfunção do sistema nervoso simpático pós-ganglionar que é visto em pacientes com DP precoce (Sorensen *et al.*, 2013). Da mesma forma, (Valko *et al.*, 2012) relataram que os pacientes com síndrome de apnéia obstrutiva do sono apresentaram a atividade do sistema nervoso simpático atenuada em comparação com seus controles e que esta foi ainda mais atenuada em pacientes com DP. O sistema nervoso parassimpático cardíaco parece estar também relativamente bem preservado em pacientes com síndrome de apnéia obstrutiva do sono e DP.

A resposta de redução da PA quando administrado um bloqueador α -adrenérgico nos animais submetidos ao modelo 6-OHDA comparado com a resposta da PAM nos controles, sugerindo que o parkinsonismo induzido pela lesão bilateral com 6-OHDA prejudica a transmissão sináptica simpática vascular. Esses dados corroboram os resultados de outros estudos (Orimo *et al.*, 2007; Ziemssen e Reichmann, 2007; Wolters, 2009). (Goldstein, 2003) propôs que as alterações autonômicas em pacientes com DP sejam em decorrência das alterações pós-ganglionares simpáticas.

A falha neurocirculatória simpática subjacente a HO, em pacientes com DP, envolve desnervação simpática noradrenérgica (Sharabi e Goldstein, 2011). Estudos avaliaram a inervação simpática do coração na DP. Há evidências consistentes para uma perda de nervos simpáticos noradrenérgicos no coração.

Além disso, ocorre denervação noradrenérgica também nos rins de doentes com DP (Goldstein, 2007).

O barorreflexo espontâneo foi utilizado para verificar a efetividade e o ganho barorreflexo por uma técnica simples em que as pequenas flutuações espontâneas de pressão arterial geram alterações no intervalo RR (Schwartz *et al.*, 2013). Nossos dados mostraram que ratos com lesão por 6-OHDA apresentaram aumentos tanto no ganho de "up" e ganho "down", assim como no ganho total do barorreflexo espontâneo. Estudos anteriores demonstraram que a via nigrostriatal dopaminérgica medeia a sensibilidade barorreflexa em ratos (Lu *et al.*, 1995). Além disso, em um modelo de DP, com lesão unilateral pela 6-OHDA, o ganho barorreflexo foi atenuado (Yu *et al.*, 2008). Estudos anteriores demonstraram que o barorreflexo é prejudicado em pacientes com DP (Rahman e Goldstein, 2014). No entanto, não tem sido observadas alterações na sensibilidade barorreflexa em pacientes com DP (Barbic *et al.*, 2007; Lipp *et al.*, 2009a). No presente trabalho, procuramos explicar estas diferenças, utilizando um modelo animal de DP que apresenta uma redução tônica na atividade simpática vascular. Houve um aumento no ganho barorreflexo que sugerimos que poderia ser decorrente da regulação dos receptores adrenérgicos. Esta hipótese deve ser testada.

Nossos resultados sugerem que o sistema nervoso simpático vascular está prejudicado no modelo 6-OHDA de parkinsonismo. Estes dados podem colaborar com a fisiopatologia da HO na DP, visto que uma diminuição no tônus simpático pode ser uma das causas de redução do débito cardíaco, assim, contribuindo para a

HO. No entanto, mais estudos, avaliando a função cardiovascular, durante alterações ortostáticas, poderiam esclarecer esta questão.

Neste trabalho, mostramos alterações cardiovasculares em um modelo animal de parkinsonismo induzido por infusão bilateral de 6-OHDA. Consideramos que os prejuízos vistos se devem a mudanças na transmissão sináptica simpática em receptores α -adrenérgicos pós-ganglionares. A investigação das características de disfunção autonômica é de extrema importância no desenvolvimento de testes terapêuticos mais eficazes e no estudo da fisiopatologia da disautonomia em pacientes com DP.

3.2. Estudo II

ALTERAÇÕES NOS REFLEXOS CARDIOVASCULARES NO PARKINSONISMO INDUZIDO POR 6-OHDA EM RATOS

3.2.1. Introdução

Na doença de Parkinson (DP), clinicamente caracterizada por sintomas motores como bradicinesia, rigidez, tremor e instabilidade postural (Przedborski, 2005), também há presença de sintomas não-motores, que prejudicam consideravelmente sua qualidade de vida (Buob *et al.*, 2010; Marrachelli *et al.*, 2010). Dentre esses sintomas, distúrbios cardiovasculares como a hipotensão ortostática (HO), hipotensão pós-prandial, arritmias cardíacas, *livedo reticularis* e edema de membros posição dependente podem estar presentes em pacientes com DP (Nicaretta *et al.*, 1998; Ziemssen e Reichmann, 2007; 2010). Isto seria em decorrência das alterações tanto no sistema nervoso central (SNC), caracterizada principalmente pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos da parte compacta da substância negra (SNpc), associada a inclusões citoplasmáticas denominadas de corpos de Lewy (Przedborski, 2005), quanto em vias periféricas do sistema nervoso autônomo (SNA) (Goldstein *et al.*, 2002; Jost, 2003; Adhiyaman *et al.*, 2008).

O SNA permite ao organismo ajustar sua circulação e ventilação para manter o aporte de oxigênio aos tecidos. O equilíbrio autonômico é mantido por uma complexa interação, e o barorreflexo e o quimiorreflexo periférico apresentam importante papel nesses ajustes. Dessa forma, os mecanismos neurais de controle cardiovascular envolvem a ativação de sensores periféricos, os quais transmitem, por meio de suas aferências, as informações captadas para regiões específicas do SNC (Dampney, 1994).

Dados recentes do nosso laboratório, apresentados no primeiro estudo dessa tese, mostraram que animais induzidos ao parkinsonismo por lesão com 6-hidroxidopamina (6-OHDA), na substância negra *pars compacta* (SNpc), apresentam níveis pressóricos menores que seus controles. A análise da variabilidade da pressão arterial, também, mostrou menor modulação simpática. Dessa forma, é possível que essas alterações, também, comprometam funções reflexas para a manutenção do fluxo sanguíneo.

Os barorreceptores arteriais exercem grande influência na função cardiovascular por atuarem tanto no sistema nervoso simpático como no parassimpático. Os quimiorreceptores representam um importante grupo de aferentes que controlam a função autonômica interferindo tanto na função respiratória como cardiovascular (Dampney, 1994; Marshall, 1994).

Alteração nos reflexos cardiovasculares no parkinsonismo vem sendo discutido por alguns autores (Lipp *et al.*, 2009b; Jain e Goldstein, 2012). No entanto, ainda não há uma conclusão absoluta sobre o funcionamento dos sensores

periféricos após o acometimento central ocasionado pela patologia, principalmente, sobre as respostas cardiovasculares durante uma situação de hipóxia.

3.2.2. Material e métodos

Animais

Foram utilizados ratos Wistar adultos (n= 32), pesando entre 280-320 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina. Os animais foram mantidos no biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas, em condições controladas de temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e luz (ciclo 12/12 horas, luzes acesas às 7h), com livre acesso a alimento e água. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta mesma universidade (número do processo: 1288.2012.55).

Cirurgia estereotáxica

Lesão da SNpc com 6-OHDA

Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100mg/kg) e cloridrato de xilazina (20mg/kg). Em seguida, os ratos foram colocados em um aparelho estereotáxico (David Kopf, modelo 957L) e receberam a microinfusão bilateral da toxina 6-OHDA (6-OHDA - 6mg/mL; Sigma Chemical Co., EUA, dissolvido em salina estéril complementado com ácido ascórbico 2%) na SNpc, utilizando as seguintes coordenadas estereotáxicas determinadas a partir do bregma: - 5,0 mm do bregma; latero-lateral (LL) \pm 2,1 mm da linha média;

dorsoventral (DV), - 8,0 mm do crânio segundo Paxinos e Watson (1986). Em seguida, foram feitas perfurações nos crânios dos animais com uma broca de baixa rotação, permitindo a microinfusão da neurotoxina diretamente na SNpc. A microinfusão da toxina foi realizada com o auxílio de uma agulha (30 gauge), conectada a um tubo de polietileno, adaptado a uma microseringa de 10 µl (Hamilton, EUA) que, por sua vez, foi encaixada em uma bomba de infusão (Harvard Apparatus, EUA). Seguida à infusão da toxina (3 minutos), a agulha permaneceu no local por mais 2 minutos, para evitar o refluxo da substância. O grupo falso operado (*sham*) foi submetido ao mesmo procedimento cirúrgico, porém foi infundido somente o veículo nas mesmas coordenadas estereotáxicas (Ariza *et al.*, 2010). Como medida profilática, após a cirurgia, os animais receberam 80.000 UI de Pentabiótico Veterinário (Fontoura-Wyeth, Brasil) aplicados em 0,2 mL (i.m.).

Cateterização da artéria e veia femorais

No 6º dia após a cirurgia, os animais foram submetidos à nova cirurgia sob anestesia (cloridrato de cetamina- 100mg/kg e cloridrato de xilazina - 20mg/kg), para canulação crônica da artéria (para registro de parâmetros cardiovasculares) e veia (para infusão de drogas) femorais. Os cateteres foram constituídos por segmentos de polietileno PE-10 (4-5cm) soldados a segmentos de polietileno PE-50 (12-13 cm) (Clay Adams, EUA), previamente preenchidos por solução salina e anticoagulante (15 U/mL de heparina em solução salina) e obstruídos com pino de metal. Após a implantação dos cateteres, estes foram exteriorizados na região dorsal do animal e fixados à pele por sutura cirúrgica.

Registro da pressão arterial e frequência cardíaca

Vinte e quatro horas após a cirurgia de cateterização, os animais foram submetidos ao procedimento para registro da pressão arterial e frequência cardíaca (De Abreu *et al.*, 2009; Karlen-Amarante *et al.*, 2012; Da Cunha *et al.*, 2014). O cateter implantado na artéria femoral foi conectado a um transdutor de pressão e a pressão arterial pulsátil foi registrada, utilizando um amplificador, conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizado (Powerlab system 4/20 ADInstruments). Os valores de pressão arterial média (PAM), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) foram obtidos a partir dos sinais da pressão arterial pulsátil. O registro foi realizado com os animais não anestesiados e com livre movimentação.

Avaliação do quimiorreflexo e barorreflexo

Para avaliação do quimiorreflexo, após o registro basal dos parâmetros cardiovasculares, foi realizada uma injeção endovenosa *in bolus* de solução de cianeto de potássio (KCN), na concentração de 50µg/1mL/Kg (Sigma Chemical)(Franchini e Krieger, 1993; Sato *et al.*, 1999), seguido do registro cardiovascular.

O teste do barorreflexo foi realizado, por meio de injeção endovenosa *in bolus* de fenilefrina (FE) (3µg/1mL/Kg; Sigma Chemical) e nitroprussiato de sódio (NPS) 16µg/1mL/Kg (Sigma Chemical), com intervalo de, no mínimo, 15 minutos entre a dose pressora e a dose depressora (Sato *et al.*, 1999; Karlen-Amarante *et al.*, 2012). A sensibilidade do barorreflexo foi avaliada relacionando-se as alterações

reflexas de FC induzidas por alterações transitórias da PAM. As alterações de FC foram convertidas em intervalo de pulso (IP) pela fórmula: IP (em milisegundos, ms) = $60.000/FC$. A sensibilidade do barorreflexo foi estimada pela média aritmética das razões entre as alterações de IP (ms) e alterações da PAM (mmHg), para cada dose de FE e NPS utilizadas ($\Delta IP/\Delta PAM$, ms/mmHg), denominado índice de sensibilidade barorreflexa (De Moura *et al.*, 2010).

Confirmação do local da lesão

Para controle da lesão na SNpc, foram quantificados os níveis de dopamina e seus metabólitos no estriado (dissecado da parte anterior, plano frontal). Para esta mensuração, os estriados dos cérebros dos animais foram pesados e armazenados em freezer -80°C até a realização da análise por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance) com detecção eletroquímica. Para isso, 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 $\mu\text{L}/\text{mg}$ de material cerebral. Esta amostra foi, então, fragmentada com caneta sonicadora e centrifugada a 10.000 G por 40 minutos. O sobrenadante (20 μL) foi injetado em uma estação de cromatografia líquida de alta performance. As áreas de pico foram comparadas às áreas dos padrões externos (Sigma-Aldrich, EUA) para identificação das monoaminas e metabólitos. Os resultados foram expressos como ng/g de peso úmido do tecido (Ariza *et al.*, 2010).

Análise estatística

As diferenças entre os grupos experimentais e controle foram comparados utilizando-se o teste t de Student para amostras não pareadas. Os dados recolhidos foram expressos como média \pm erro padrão da média e o nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

3.2.3. Resultados

Diminuição dos níveis de dopamina no estriado e alterações na PA e FC após lesão na SNpc

Os animais com lesão confirmada por diminuição de dopamina no estriado (Figura 1) (sham: 4.07 ± 0.23 n=16; 6-OHDA: 0.9 ± 0.12 n=16, $p < 0,05$) mostraram uma menor PAM (sham= 107 ± 1 e 6-OHDA= 101 ± 1 ; SAP: Sham= 130 ± 1 e 6-OHDA= 122 ± 1 ; DAP: sham= 89 ± 1 e 6-OHDA= 85 ± 1 , $p < 0,05$) sem diferença estatisticamente significativa na FC (sham: 339 ± 7 ; 6-OHDA: 327 ± 8) (Figura 2).

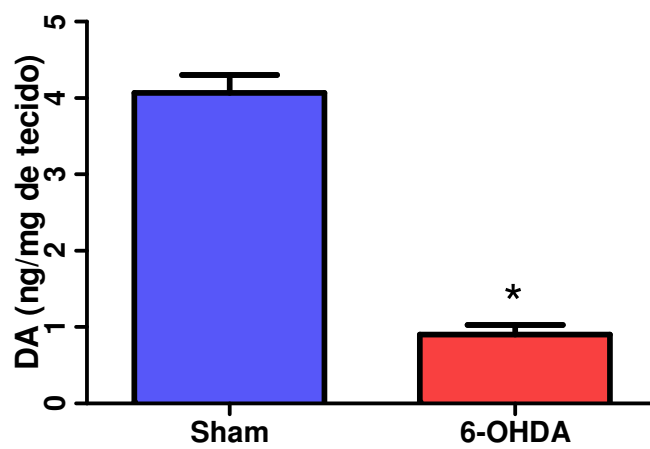


Figura 1: Nível de dopamina (DA) no estriado quantificado por HPLC após 7 dias da infusão bilateral de veículo (sham) ou toxina (6-OHDA). Os resultados foram expressos como média \pm SEM e a diferença entre o grupo sham (n= 16) e com lesão - 6-OHDA (n=16) considerada significativa foi de $p < 0,05$.

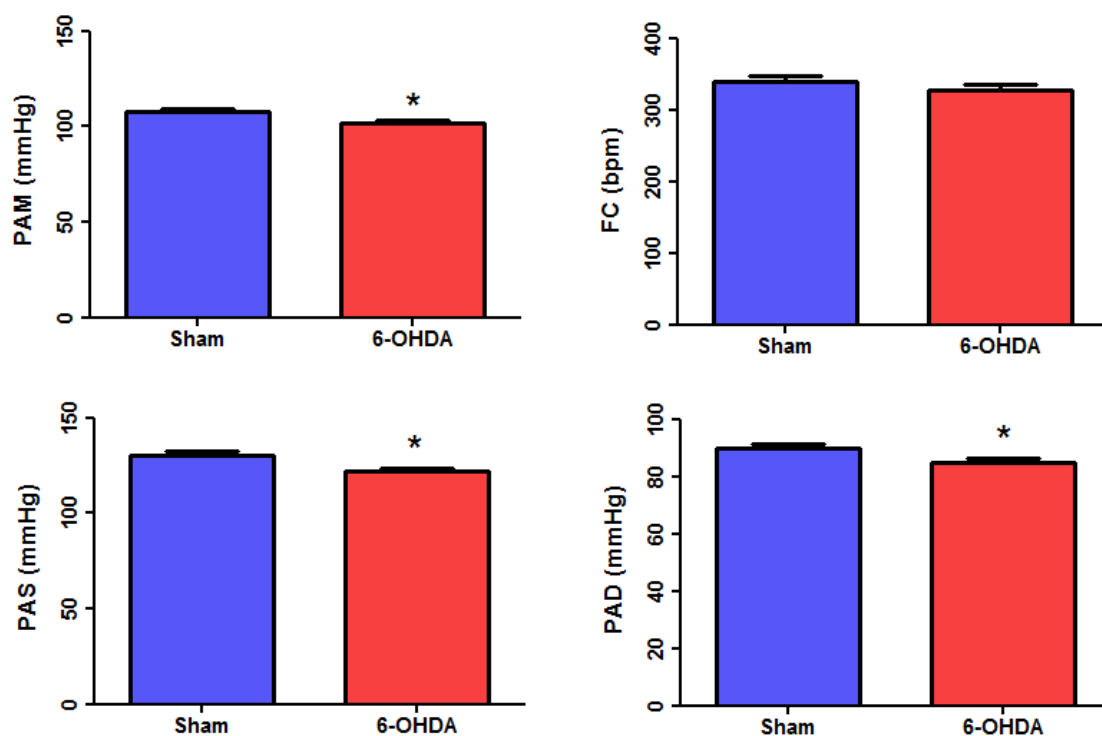


Figura 2: Análise dos parâmetros cardiovasculares em ratos não anestesiados depois de 7 dias da infusão bilateral de 6-OHDA intranigral. PAM: Pressão arterial média; FC: Frequência cardíaca; PAS: Pressão arterial sistólica; PAD: Pressão arterial diastólica Os resultados foram expressos como média \pm SEM e a diferença entre o grupo sham (n= 16) e com lesão - 6-OHDA (n=16) considerada significativa foi de $p < 0,05$.

Quimiorreflexo

Após infusão de KCN, houve um maior aumento na PAM dos animais com lesão bilateral na SNpc por 6-OHDA (Δ PAM sham: 51 ± 4 n=8; 6-OHDA: 64 ± 2 n=8, $p < 0,05$) assim como maior aumento na PAS (Δ PAS sham: 76 ± 5 ; 6-OHDA: 99 ± 4 , $p < 0,05$) e maior bradicardia (Δ FC sham: -133 ± 27 ; 6-OHDA: -202 ± 13 , $p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa na PAD (Δ PAD sham: 40 ± 5 ; 6-OHDA: 46 ± 6) (Figuras 3 e 4).

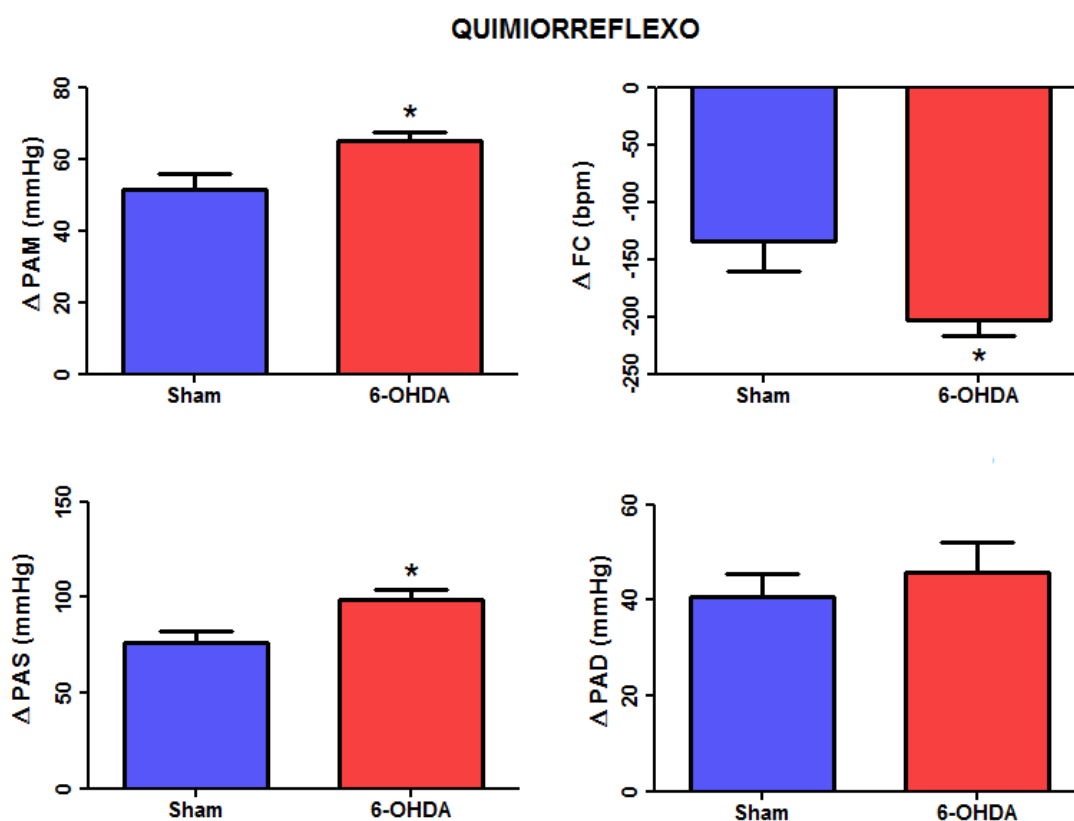


Figura 3: Análise do quimiorreflexo em ratos não anestesiados depois de 7 dias da infusão bilateral de 6-OHDA intranigral. PAM: Pressão arterial média; FC: Frequência cardíaca; PAS: Pressão arterial sistólica; PAD: Pressão arterial diastólica. Os resultados foram expressos como média \pm SEM e a diferença considerada significativa foi de $p < 0,05$.

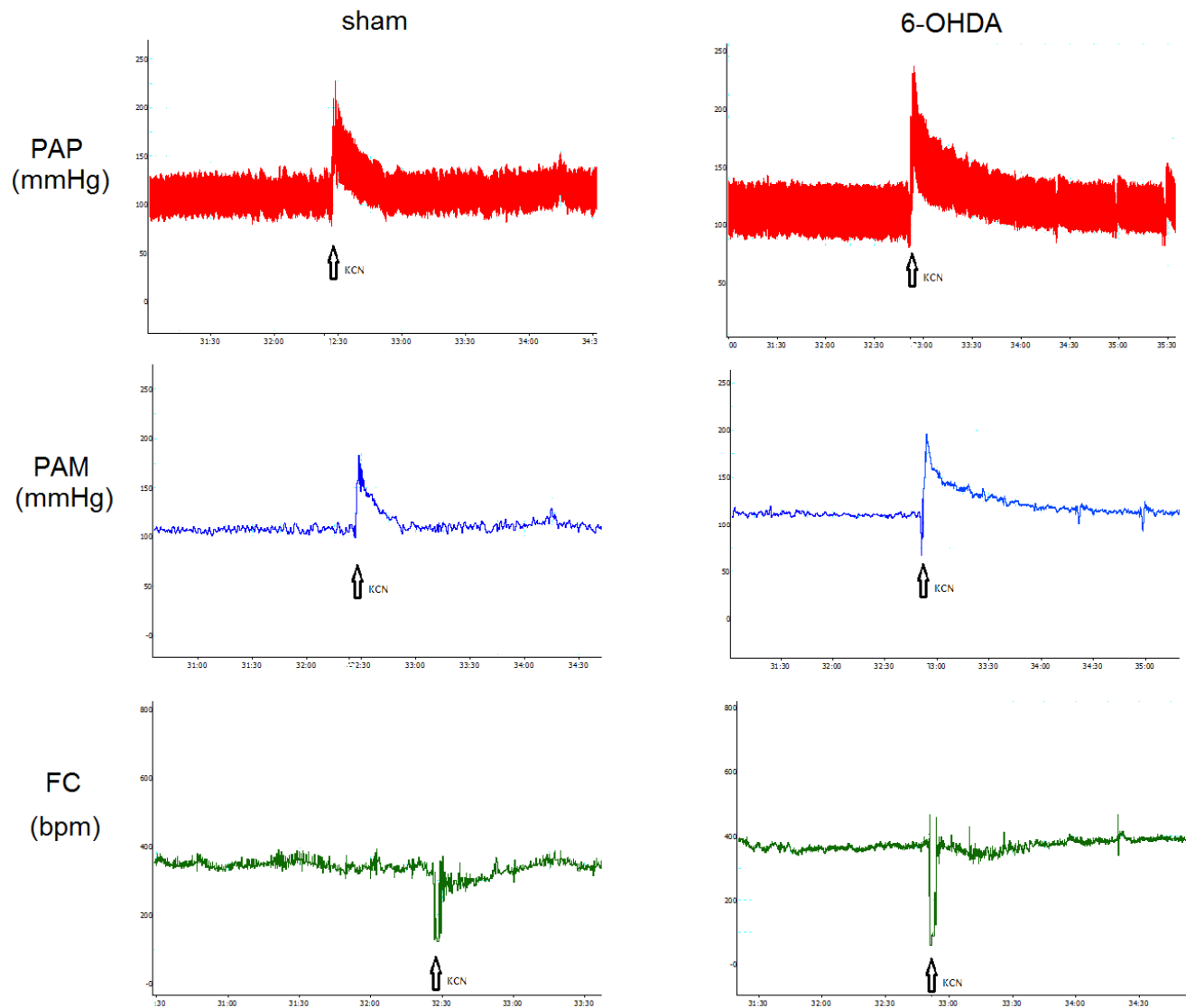


Figura 4: Traçados típicos da pressão arterial pulsátil, pressão arterial média, frequência cardíaca após KCN endovenoso. As setas indicam o momento da injeção de KCN. PAP: Pressão arterial pulsátil; PAM: Pressão arterial média; FC: Frequência cardíaca; KCN: Cianeto de potássio.

Barorreflexo

Houve maior variação no aumento da PAM e PAS nos animais lesados quando administrado FE iv (sham: 55 ± 2 n=8; 6-OHDA: 62 ± 1 n=8, $p < 0,05$ and sham: 69 ± 4 ; 6-OHDA: 81 ± 3 , $p < 0,05$) sem diferença estatisticamente significativa na PAD (sham: 51 ± 3 ; 6-OHDA: 56 ± 1), assim como na FC (sham: -202 ± 26 ; 6-OHDA: -199 ± 21) (Figuras 5 e 6).

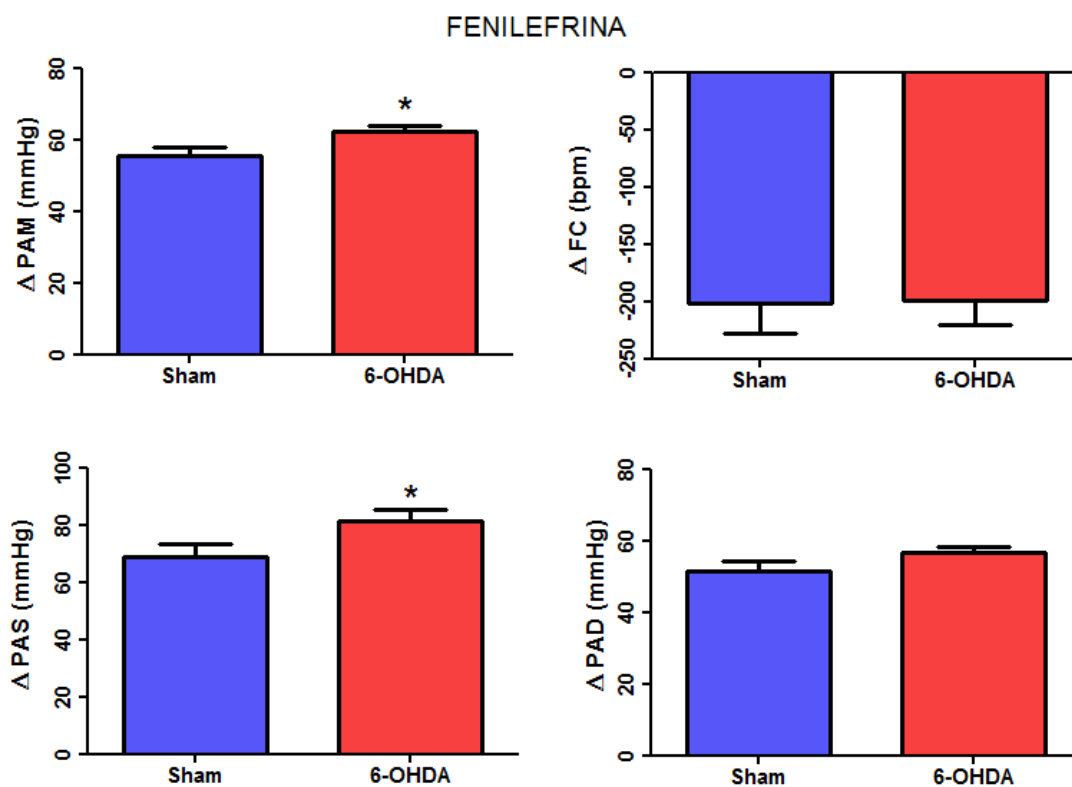


Figura 5: Análise do barorreflexo após infusão endovenosa de fenilefrina (FE) em ratos não anestesiados depois de 7 dias da infusão bilateral de 6-OHDA intranigral. PAM: Pressão arterial média; FC: Frequência cardíaca; PAS: Pressão arterial sistólica; PAD: Pressão arterial diastólica. Os resultados foram expressos como média \pm SEM e a diferença considerada significativa foi de $p < 0,05$.

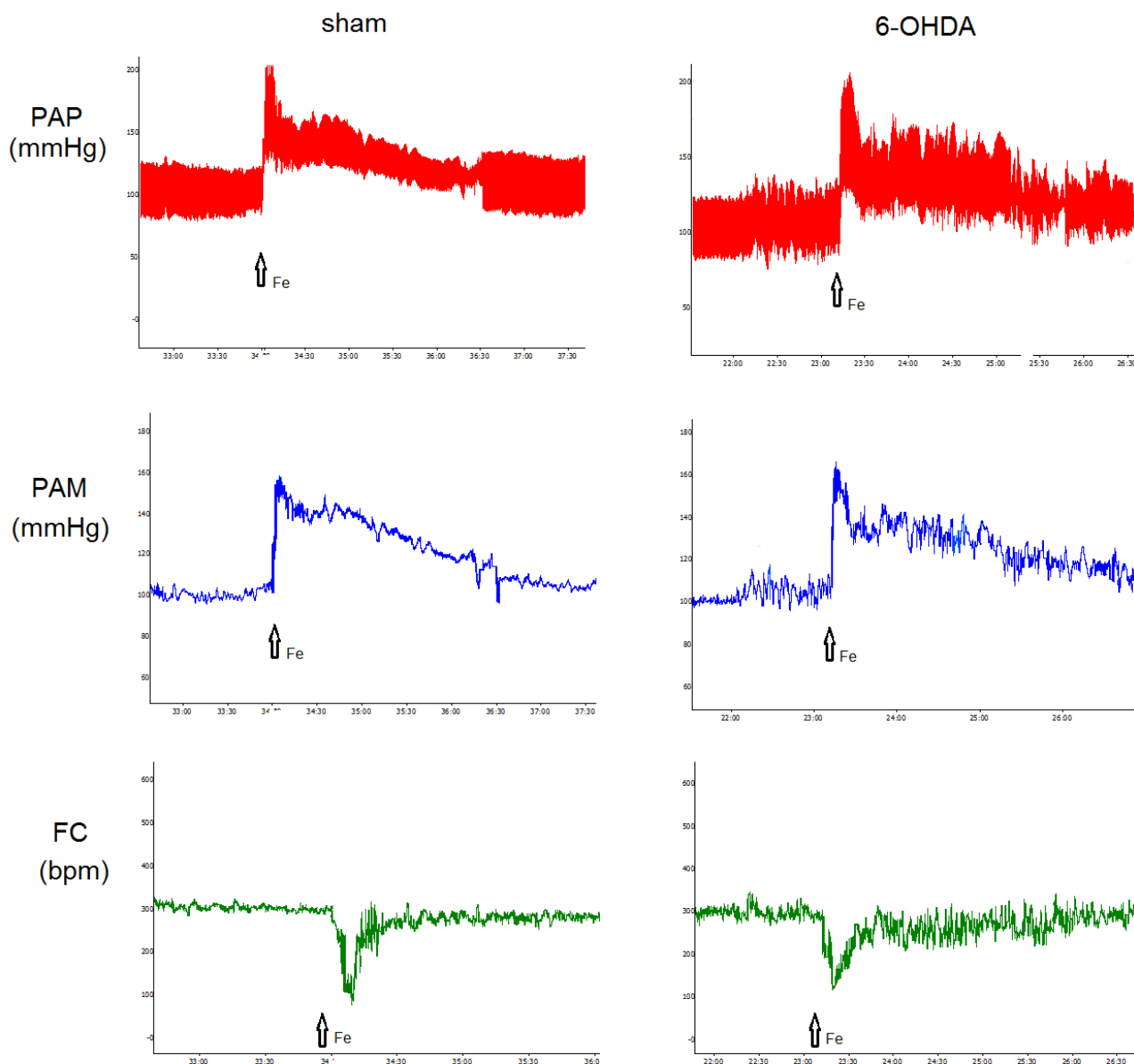


Figura 6: Traçados típicos de pressão arterial pulsátil, pressão arterial média, frequência cardíaca após fenilefrina endovenosa. As setas indicam o momento da injeção. PAM: Pressão arterial pulsátil; PAM: Pressão arterial média; FC: Frequência cardíaca; FE: Fenilefrina.

Quando administrado NPS, houve maior variação no aumento da FC nos animais lesados (sham: 90 ± 14 n=8; 6-OHDA: 145 ± 10 n=8, $p < 0,05$). Porém, não houve diferença significativa na PA entre os grupos (PAM: sham -45 ± 5 ; 6-OHDA: -47 ± 7 ; PAS: sham -48 ± 5 ; 6-OHDA -54 ± 8 ; PAD: sham -40 ± 5 ; 6-OHDA -40 ± 6) (Figuras 7 e 8).

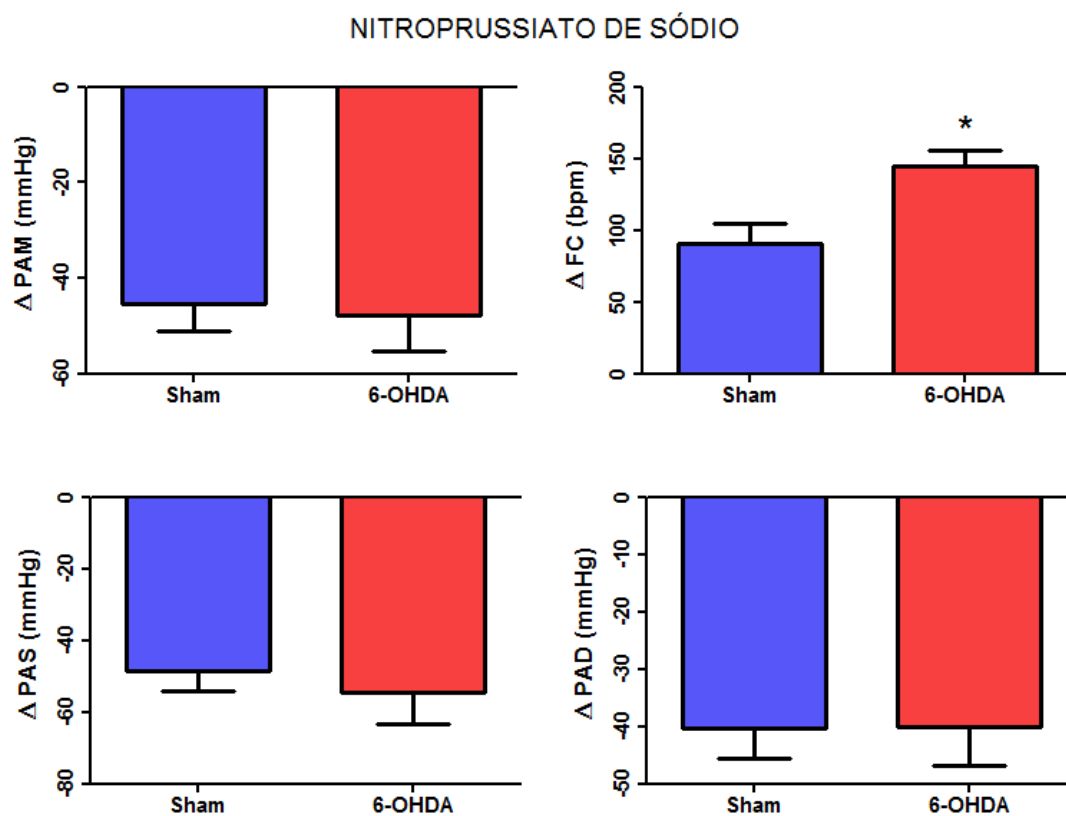


Figura 7: Análise do barorreflexo após infusão endovenosa de nitroprussiato de sódio (NPS) em ratos não anestesiados depois de 7 dias da infusão bilateral de 6-OHDA intranigral. PAM: Pressão arterial média; FC: Frequência cardíaca; PAS: Pressão arterial sistólica,; PAD: Pressão arterial diastólica. Os resultados foram expressos como média \pm SEM e a diferença considerada significativa foi de $p < 0,05$

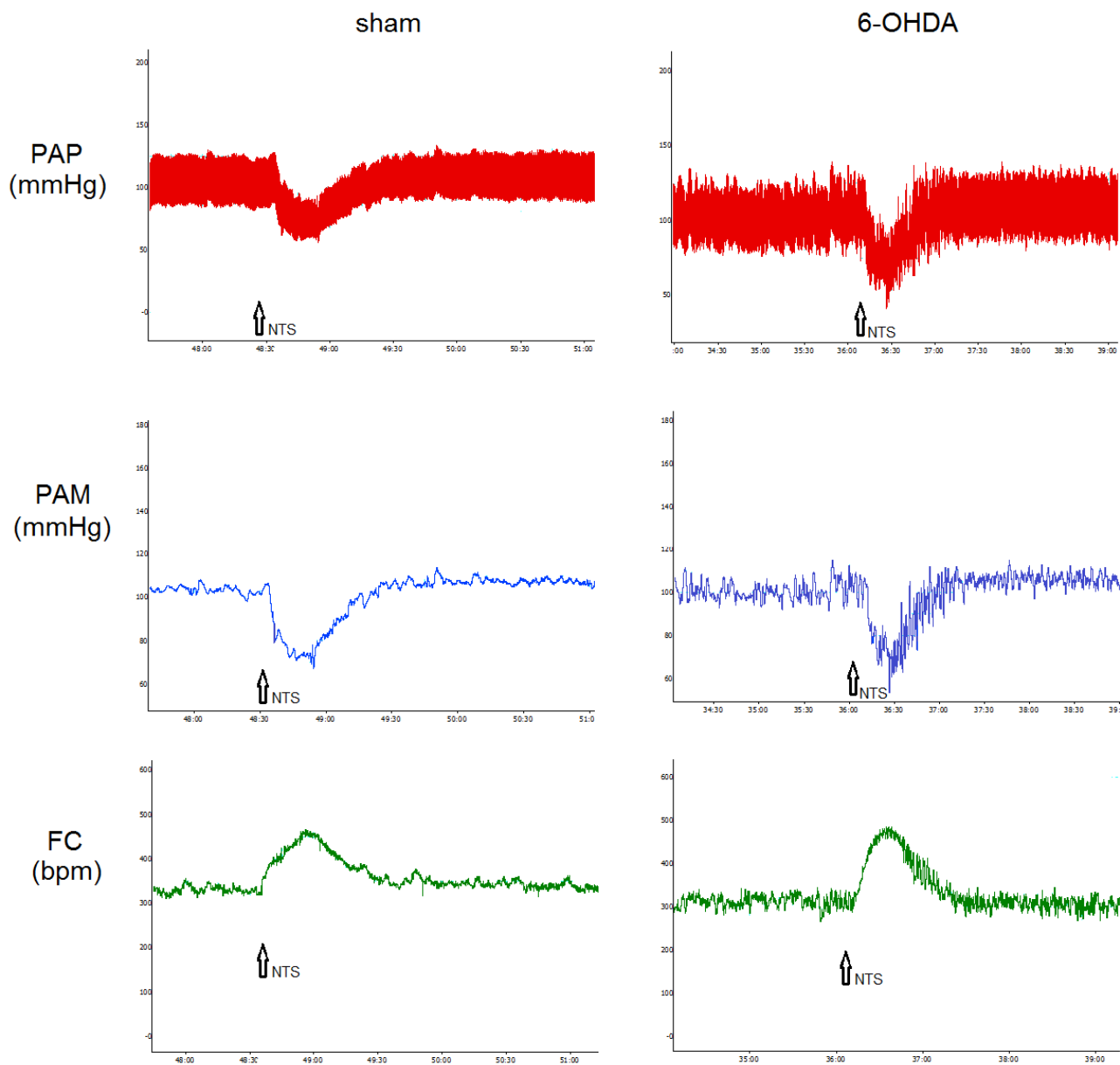


Figura 8: Traçados típicos da pressão arterial pulsátil, pressão arterial média, frequência cardíaca após NPS endovenoso. As setas indicam o momento da injeção de NPS. PAP: Pressão arterial pulsátil; PAM: Pressão arterial média; FC: Frequência cardíaca; NPS: Nitroprussiato de sódio.

A sensibilidade barorreflexa ($\Delta IP/\Delta PAM$ ms/mmHg) não se mostrou diferente entre os grupos quando administrado FE (sham: 6.2 ± 1.3 ; 6-OHDA: 6 ± 1) assim como quando administrado NPS (sham: 1 ± 0.3 ; 6-OHDA: 1.6 ± 0.4) (Figura 9).

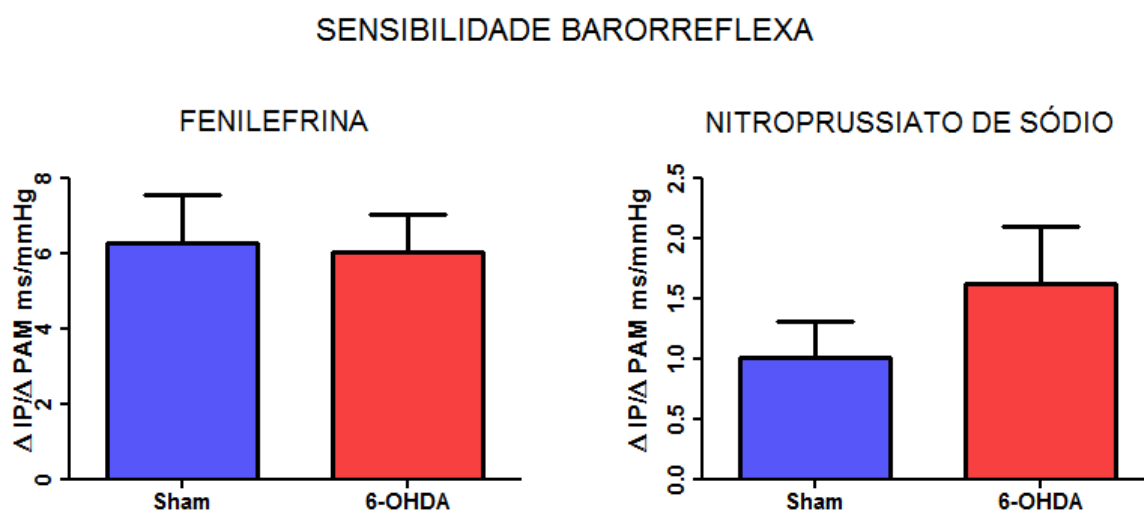


Figura 9: Análise da sensibilidade barorreflexa, $\Delta IP/\Delta MAP$ ms/mmHg, em ratos não anestesiados, depois de 7 dias da infusão bilateral de 6-OHDA intranigral. PAM: Pressão arterial média; IP: Intervalo de pulso. Os resultados foram expressos como média \pm SEM e a diferença considerada significativa foi de $p < 0,05$

3.2.4. Discussão

O presente estudo mostrou que, após ativação dos quimiorreceptores periféricos, por meio de injeção de KCN, ocorreu uma maior resposta pressórica e bradicárdica nos animais lesados bilateralmente com 6-OHDA. Após ativação do barorreceptores, o índice de sensibilidade barorreflexa não se mostrou alterado entre os grupos, no entanto, ocorreu um maior aumento na PA quando estimulados com FE e maior taquicardia quando estimulado com NPS nos animais 6-OHDA. Nossos resultados sugerem mudanças de sensibilidade nos reflexos cardiovasculares em animais com parkinsonismo induzido por 6-OHDA. A maior resposta pressora e bradicárdica ao KCN pode ser um importante mecanismo de adaptação para preservar o fluxo sanguíneo cerebral nesses animais.

As pressões parciais de dióxido de carbono arterial (PaCO_2) e oxigênio (PaO_2), desempenham um papel importante na regulação do fluxo sanguíneo cerebral (FSC) (Ainslie e Ogoh, 2010). A vasculatura cerebral dilata durante hipercapnia e contrai durante a hipocapnia. Estes efeitos do dióxido de carbono (CO_2) na circulação cerebral são, principalmente, demonstrados na resistência das arteríolas cerebrais que desempenham um papel importante na autorregulação cerebral que permite constante FSC durante variações da pressão de perfusão (Gur *et al.*, 2012).

Embora a circulação cerebral seja ricamente inervada por fibras simpáticas, o efeito da atividade do nervo simpático na regulação do FSC permanece controverso (Ainslie e Ogoh, 2010). Parece provável que qualquer potencial influência da

atividade nervosa simpática que regula o FSC seja mascarada por outro efeito mais influente sobre essa regulação como, por exemplo, a autorregulação, a reatividade vascular cerebral ao CO₂, e o débito cardíaco (Ainslie e Ogoh, 2010); (Ogoh, 2008). Além disso, na presença de comprometimento na autorregulação, qualquer elevação da pressão arterial pode resultar em um aumento do FSC (Ainslie e Ogoh, 2010). A diminuição observada nas velocidades de FSC, como o que ocorre durante o estresse ortostático, pode levar à hipoperfusão cerebral e consequente tontura ou síncope. É possível que a síncope seja resultado de falhas na autorregulação, essa, por sua vez, podendo ser em razão da falha no SNA. No entanto, este conceito permanece controverso (Gur *et al.*, 2012; Isaacson e Skettini, 2014).

Normalmente, as quedas de pressão arterial são compensadas por aumento do tônus simpático e vasodilatação cerebral, mas na DP temos o comprometimento do autônomo simpático (Gurevich *et al.*, 2006; Jain e Goldstein, 2012), assim como no modelo utilizado nesse estudo (Silva *et al.*, 2015). O débito cardíaco, por sua vez, representa um fator importante para estabelecer a velocidade média de sangue na artéria cerebral (Ogoh *et al.*, 2005). Observa-se, também, que há menor fluxo sanguíneo cerebral no paciente com DP e que este paciente está propenso à síncope (Gurevich *et al.*, 2006), no entanto a autorregulação parece estar normal na DP (Niehaus *et al.*, 2002). Dessa forma, o aumento na resposta à infusão de KCN, observado no presente estudo, poderia ser uma compensação pelo menor débito cardíaco, e estaria colaborando para evitar uma síncope, por exemplo, em decorrência da falta de fluxo sanguíneo adequado para o cérebro.

Há trabalhos que discutem os efeitos da hipóxia em parâmetros respiratórios (Naudin *et al.*, 1991; Seccombe *et al.*, 2011; Seccombe *et al.*, 2013; Budzinska e Andrzejewski, 2014) e sua relação com a DP, no entanto, não há trabalhos que relatem as alterações cardiovasculares correlacionando o papel dos quimiorreceptores e as disfunções autonômicas após hipoxia no parkinsonismo. Deve-se ressaltar a importância em aprofundar o estudo dos parâmetros cardiovasculares, frente à hipoxia na DP, em função das já conhecidas relações entre os sistemas cardiovascular e respiratório, para a manutenção dos níveis de oxigênio e gás carbônico no sangue, e os achados envolvendo as disfunções autonômicas e cardiovasculares em indivíduos doentes. Além disso, esses aspectos poderão ajudar a desenvolver um diagnóstico precoce da doença, já que é sugerido que alterações autonômicas e cardiovasculares aparecem antes dos sinais clássicos motores que surgem em um estágio mais avançado de perda neuronal (Braak *et al.*, 2003).

Com relação ao barorreflexo, no trabalho de Lipp e colaboradores (2009b), envolvendo pacientes com DP, eles também observaram uma maior resposta pressora à fenilefrina sem alteração na sensibilidade barorreflexa. Os autores concluem que essas alterações seriam em consequência de diferentes lesões no sistema nervoso autônomo. Já, no trabalho de Haensch e Jörg (Haensch e Jorg, 2006), o que ocorre é a diminuição na função barorreflexa na DP.

Vários autores (Yang e Lin, 1993; Lin e Yang, 1994; Lu *et al.*, 1995) têm mostrado que ocorre uma maior liberação de dopamina no estriado, quando a pressão sanguínea na carótida foi aumentada (por injeção de fenilefrina) e que

houve menor liberação de dopamina quando a pressão sanguínea na carótida foi diminuída (por oclusão bilateral da carótida). Esses dados fornecem evidências de que os barorreceptores arteriais interferem na liberação de dopamina na via nigroestriatal como um meio de integração com a atividade cardiovascular. Contrariamente, Jain e Goldstein (Jain e Goldstein, 2012) defendem que a desnervação noradrenérgica cardíaca e extra cardíaca caracterizam a falência barorreflexa e, provavelmente, seriam responsáveis pela hipotensão postural nos pacientes com DP e que isso pode ocorrer independentemente da depleção de dopamina do corpo estriado.

Em resumo, os resultados apresentados aqui indicam importantes alterações na função dos sensores periféricos na função cardiovascular na DP, evidenciando uma integração entre o sistema cardiovascular, respiratório e autonômico. Entretanto, mais estudos serão necessários para entender os mecanismos neurobiológicos que possam contribuir nas disfunções cardiovasculares relacionadas com o parkinsonismo.

3.3 Estudo III

REATIVIDADE VASCULAR EM ANÉIS DE AORTA DE RATOS INDUZIDOS AO PARKINSONISMO POR 6-OHDA

3.3.1. Introdução

Uma das funções mais importantes do sistema nervoso autônomo é a rápida regulação da pressão arterial (PA) e da frequência cardíaca (FC). Essa função é crucial para a homeostase e necessita do funcionamento adequado do sistema cardiovascular, em que há envolvimento dos sensores aferentes (barorreflexo e quimiorreflexo), do volume e dos componentes plasmáticos e dos centros regulatórios centrais onde as informações serão integradas, e por meio do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático, serão repassadas aos órgãos efetores como o coração, os vasos e os rins (Guimaraes e Moura, 2001).

No parkinsonismo existe disfunção autonômica. Na última meia década tem visto a acumulação de provas convincentes da falha ou desregulação da inervação simpática noradrenérgica do sistema cardiovascular na doença de Parkinson (DP). Essas alterações na inervação noradrenérgica simpática são potencialmente importantes clinicamente, em virtude da hipotensão ortostática que é uma manifestação cardinal de falha neurocirculatória na DP (Jain e Goldstein, 2012).

Dados do nosso laboratório demonstraram que ratos com lesão bilateral por 6-OHDA apresentam diminuição da resposta pressórica ao bloqueio α 1-adrenérgico. Entretanto, não está claro se esta menor resposta ao antagonista α 1-adrenérgico se deve a redução do tônus simpático vascular ou de mecanismos que envolvam a ativação dos receptores α 1 vasculares. Neste estudo, testaremos a hipótese de que a diminuição do tônus simpático no parkinsonismo induzido por 6-OHDA tenha sua origem periféricamente.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi investigar a reatividade vascular ao agonista alfa1-adrenérgico em aorta de ratos com parkinsonismo induzido por 6-OHDA.

3.3.2. Material e Métodos

Animais

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

Foram utilizados ratos Wistar adultos, provenientes do biotério central da universidade (UEL), pesando entre 280-320 gramas no início do experimento. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (45X25X25cm), em sala com temperatura controlada ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com comida e água à vontade.

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

Cirurgia Estereotáxica

Previamente à cirurgia, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (100mg/kg) e cloridrato de xilazina (20mg/kg). Os animais do grupo que receberam a toxina foram colocados em um aparelho estereotáxico (David Kopf, modelo 957L) e receberam a microinfusão bilateral da toxina 6-OHDA (6-OHDA - 6mg/mL; Sigma Chemical Co., EUA, dissolvido em salina estéril complementado com ácido ascórbico 2%) na SNpc, utilizando as seguintes coordenadas estereotáxicas determinadas a partir do bregma: - 5,0 mm do bregma; látero-lateral (LL) \pm 2,1 mm da linha média; dorsoventral (DV), - 8,0 mm do crânio (Paxinos e Watson, 1998). Em seguida, foram feitas perfurações nos crânios dos animais com uma broca de baixa rotação, permitindo a microinfusão da neurotoxina diretamente na SNpc. A microinfusão da toxina foi realizada com o auxílio de uma agulha (30 gauge), conectada a um tubo de polietileno, adaptado a uma microseringa de 10 μ l (Hamilton, EUA) que, por sua vez, será encaixada em uma bomba de infusão (Havard Apparatus, EUA). Seguida à infusão da toxina (3 minutos), a agulha permaneceu no local por mais 2 minutos para evitar o refluxo da substância. O grupo sham foi submetido ao mesmo procedimento cirúrgico, entretanto, não

recebeu a infusão de nenhuma toxina, sendo infundido somente veículo nas mesmas coordenadas estereotáxicas.

Avaliação da reatividade da aorta isolada à fenilefrina, acetilcolina e nitroprussiato de sódio

Os ratos foram decaptados e após toracotomia a aorta torácica foi removida, dissecada e seccionada em dois anéis transversais de 5mm (Carvalho *et al.*, 1987). Um dos anéis de aorta teve o endotélio removido por fricção com uma haste fina de algodão e no outro anel o endotélio foi preservado. Ambos os anéis foram suspensos por um par de ganchos de aço inoxidável, um fixo à base da cuba para órgãos isolados e o outro conectado a um transdutor isométrico (FT03, Grass), que foi acoplado a um amplificador de sinal (AECAD 04, AVS Projetos) e este a um computador. A aorta permaneceu sob tensão de 1,5g, em solução nutriente, solução de Krebs-Henseleit modificada (concentrações em mM: 130 NaCl; 14,9 NaHCO₃; 4,7 KCl; 1,18 KH₃PO₄; 1,17 MgSO₄; 7 H₂O; 5,5 glicose; 1,56 CaCl₂·2 H₂O e 0,026 EDTA), gaseificada, com mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂, que foi mantida aquecida a 37°C durante todo o protocolo experimental. Para avaliar a viabilidade do músculo liso vascular, os anéis de aorta foram estimulados com KCl (90mM), e após este procedimento, foram lavados durante 40 minutos, ou até que voltassem à tensão basal. Anéis de aorta que não responderam ao KCl foram descartados. Para comprovação da presença ou remoção do endotélio, os anéis de aorta foram pré-contráidos com fenilefrina e, após estabilização da resposta, foi aplicada acetilcolina (0,1 µM), agente vasodilatador dependente do endotélio. O endotélio foi considerado

íntegro, quando o anel de aorta relaxou entre 70-80% da pré-contracção e ausente quando a vasodilatação promovida pela Ach foi inferior a 5% da pré-contracção.

Para a avaliação da capacidade contrátil em anéis de aorta com e sem endotélio, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para fenilefrina (1 nM a 30 μ M), agonista α 1-adrenérgico. Após a avaliação da reatividade da aorta à Fenil, os anéis de aorta foram lavados com solução de Krebs, durante 40 minutos, com troca de solução a cada 10 minutos. Após este período, os anéis de aorta foram pré-contráidos com 0,3 μ M de fenilefrina, concentração que causa de 60 a 80% da contracção máxima. Quando a contracção foi estabilizada, nos anéis de aorta com endotélio (E+) foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para a acetilcolina (1 nM a 30 μ M) e para nitroprussiato de sódio (0,1 nM a 3 μ M).

Controle do local da lesão

Para controle da lesão na SNpc avaliamos os níveis de dopamina no estriado (que foi dissecado da parte anterior, plano frontal). Para esta mensuração, os estriados dos cérebros dos animais, foram pesados e armazenados em freezer - 80°C até a realização da análise por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance) com detecção eletroquímica. As amostras foram suspensas com ácido perclórico 0,1M com 0,02% de metabissulfito de sódio como antioxidante, em concentração de 15 μ L/mg de material cerebral. Esta amostra foi, então, fragmentada com caneta sonicadora e centrifugada a 10.000 G por 40 minutos. O sobrenadante (20 μ L) foi injetado em uma estação de cromatografia líquida de alta performance. As áreas de pico foram comparadas às áreas dos padrões externos

(Sigma-Aldrich, EUA) para identificação das monoaminas e metabólitos. Os resultados foram expressos como ng/g de peso úmido do tecido (Ariza *et al.*, 2010).

Apresentação dos resultados e análise estatística

As respostas ao agente vasoconstritor Fenil foram expressas em gramas (g) de tensão e as respostas dos agentes vasodilatadores em porcentagem de resposta em relação à pré-contracção. As comparações entre os diferentes grupos experimentais foram realizadas pela determinação da resposta máxima (Rmax) e pD2 (logaritmo negativo da concentração efetiva de 50% (EC 50) para os fármacos, calculadas utilizando o programa de computador GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, USA). Para as comparações estatísticas foi utilizado o teste ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey como pós-teste, e as diferenças foram consideradas quando $p < 0.05$.

3.3.3. Resultados

A análise neuroquímica indicou que os níveis de DA do grupo 6-OHDA foram menores ($1,27 \pm 0,15$; $n = 19$) comparado com o grupo sham (4.6 ± 0.2 $n = 16$) (Fig 1).

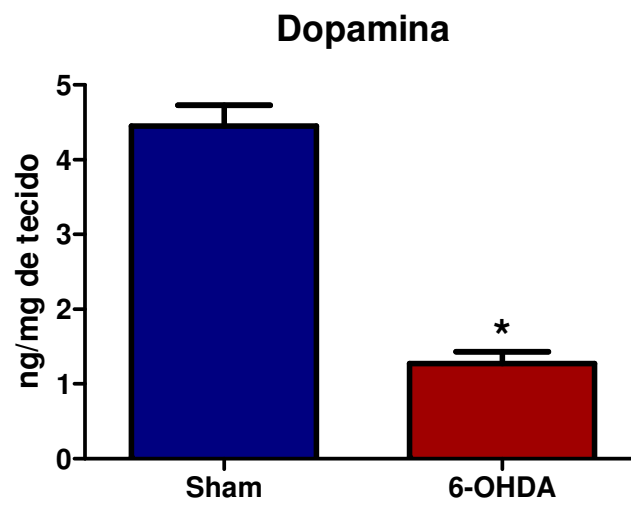


Figura 1: Nível de dopamina no estriado quantificado por HPLC após 7 dias da infusão bilateral de 6-OHDA ou veículo (sham). Os resultados foram expressos como média \pm SEM e a diferença considerada significativa foi de $p < 0,05$.

A contração induzida pelo KCL foi semelhante entre os grupos experimentais.
(sham E+: $2,5 \pm 0,2$ n=8; sham E-: $2,7 \pm 0,2$ n=8; 6-OHDA E+: $2,7 \pm 0,1$ n=8; 6-OHDA
E-: $3 \pm 0,1$ n=11) (Fig 2).

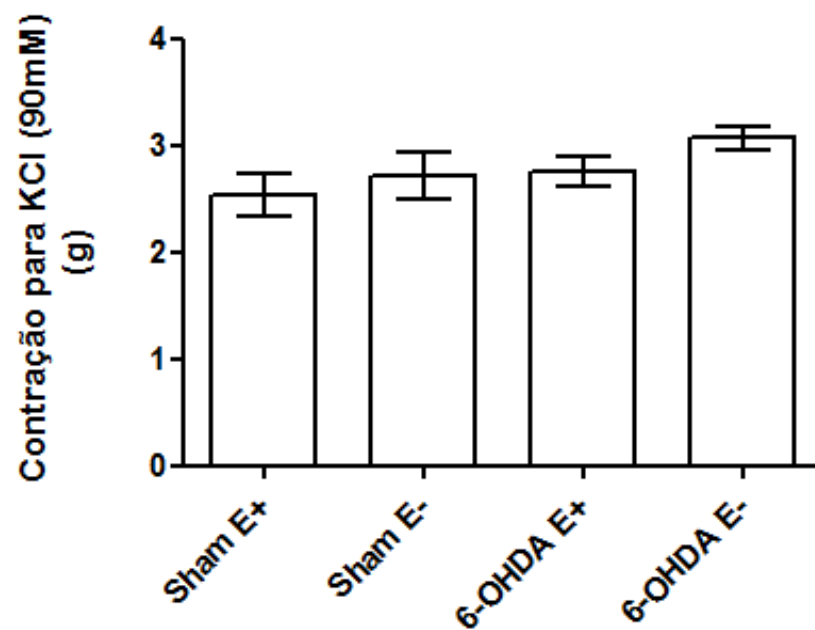


Figura 2: Viabilidade do músculo liso vascular. Não houve diferença entre a viabilidade muscular nos grupos sham e 6-OHDA. ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey. Os valores foram expressos como média \pm epm e a diferença considerada significativa foi de $p < 0,05$.

A FE promoveu contração concentração dependente em anéis de aorta Endo+ e Endo- de ratos Sham e 6-OHDA. A Rmax para FE foi menor nos anéis Endo+ dos 6-OHDA (2.26 ± 0.10 N=12) em comparação com Endo+ dos Sham (2.77 ± 0.15 N=9) (Fig 2).

Nos anéis Endo-, de ambos os grupos, a Rmax para FE foi maior em relação aos Endo+. Entretanto, não houve diferença entre os grupos Sham (3.55 ± 0.13 N=10) e 6-OHDA (3.40 ± 0.22 N=12) na Rmax dos anéis Endo- (Fig 2).

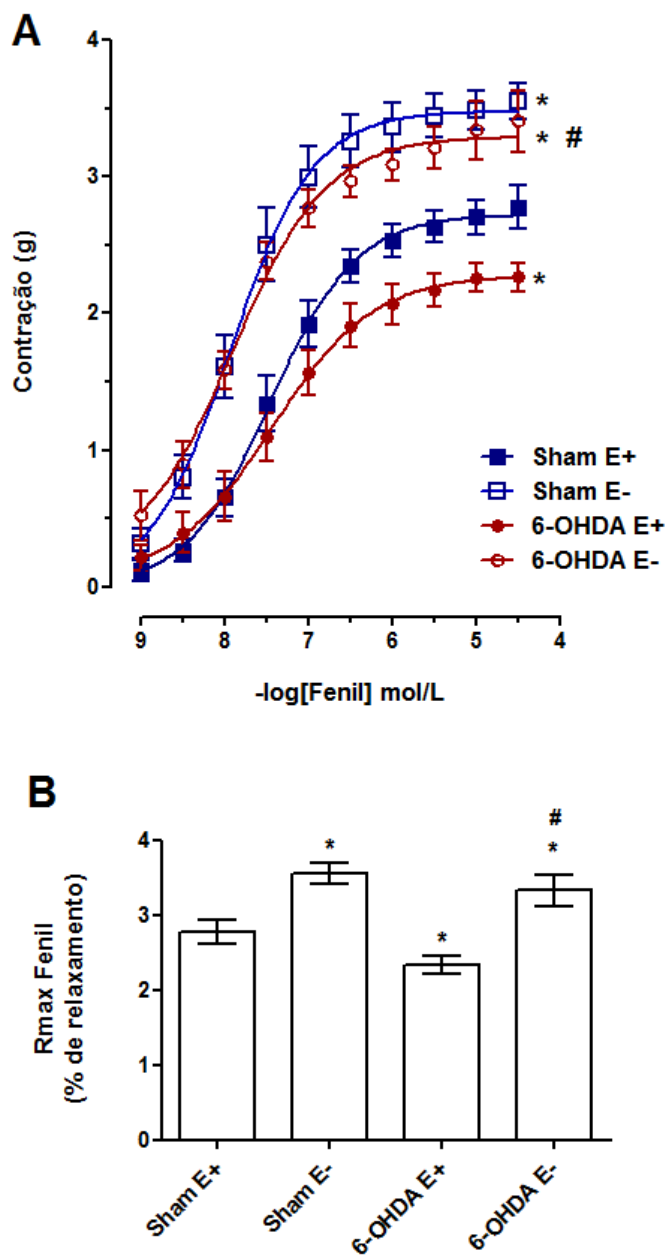


Figura 3: A. Curvas concentração-efeito cumulativas para Fenil, obtidas em anéis de aorta E+ e E-, isolados de ratos sham e lesados com 6-OHDA. Os valores foram expressos como média±epm. * $p < 0,05$ vs resposta máxima do sham E+; # $p < 0,05$ vs resposta máxima do 6-OHDA E+. One way ANOVA, seguido do teste de Tukey. **B.** Resposta máxima para Fenil.

Não houve diferença estatisticamente significativa da Rmax (Endo+) entre sham e 6-OHDA para Ach (sham: 97.6 ± 0.7 n=7; 6-OHDA: 94.6 ± 2.1 n=9) e NPS (sham: 100.7 ± 0.3 n=7; 6-OHDA: 100.3 ± 0.6 n=9) (Fig 4 e 5).

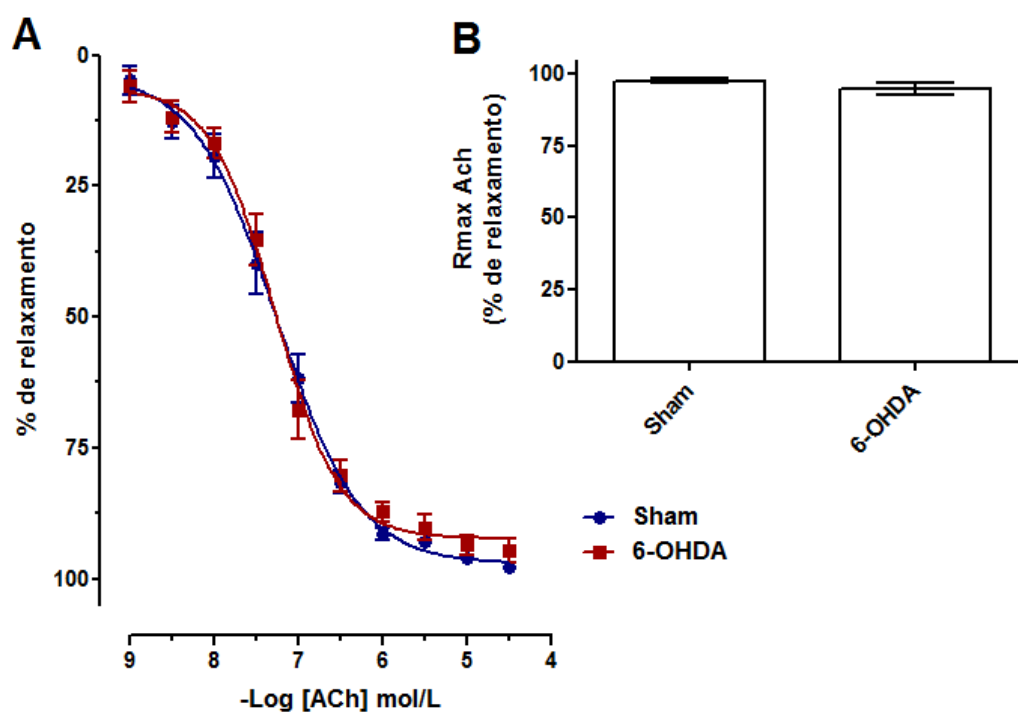


Figura 4: A. Curvas concentração-efeito cumulativas para acetilcolina (Ach), obtidas em anéis de aorta E+, isolados de ratos sham e lesados com 6-OHDA. ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey. Os valores foram expressos como média \pm epm.

B. Resposta máxima para Ach.

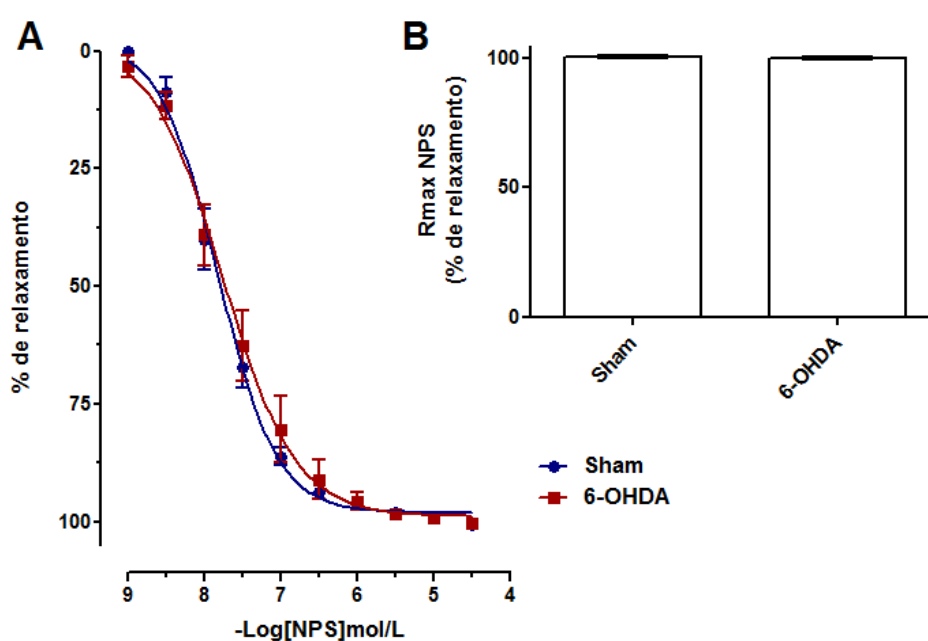


Figura 5: A. Curvas concentração-efeito cumulativas para nitroprussiato de sódio (NPS), obtidas em anéis de aorta E+ , isolados de ratos sham e lesados com 6-OHDA. ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey. Os valores foram expressos como média±epm. **B.** Resposta máxima para NPS.

3.3.4. Discussão

Os resultados mostraram hiporreatividade da aorta de ratos submetidos à lesão bilateral por 6-OHDA na SNpc ao agonista adrenérgico FE, provavelmente, por mecanismo dependente do endotélio. Quando em presença da acetilcolina e do nitroprussiato de sódio não houve diferença na resposta vasodilatadora entre os animais lesados e os controles.

O sistema vascular é regulado pelo sistema nervoso simpático, que influencia, principalmente, a vasculatura por meio 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 à 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. O efeito de baixos níveis de noradrenalina na DP associado à hipotensão ortostática (HO) ainda é desconhecida. Uma diminuição dos adrenoreceptores ou na sua sensibilidade à noradrenalina poderia ser uma explicação, especialmente em combinação com níveis mais baixos de noradrenalina (Groothuis *et al.*, 2011).

Segundo trabalho de (Senard *et al.*, 1990) em pacientes com DP, a hipotensão ortostática (HO), está associada com um aumento da sensibilidade dos receptores α_2 -adrenérgico vascular à noradrenalina. Suas observações sugerem a

existência de hipersensibilidade α -adrenérgica em resposta aos baixos níveis de noradrenalina no plasma, efeito característico do conhecido “up-regulation”.

Um sinal característico da DP é a presença de aglomerados de proteínas como α -sinucleína e parkina, denominados corpos de Lewy (Dauer e Przedborski, 2003; Schulz e Falkenburger, 2004). Autores trabalharam com camundongos “knockout” e transgênicos para α -sinucleína e relatam que a presença dessas proteínas em neurônios autônomos periféricos causaria alteração na regulação da resposta vascular contribuindo para a disfunção autonômica (Marrachelli *et al.*, 2010).

No entanto, é importante ressaltar que a presença dos corpos de Lewy não são achados específicos no parkinsonismo, são também encontrados em outras doenças neurodegenerativas como na Doença de Alzheimer, em um tipo de demência (demência com corpos de Lewy) e na doença de Huntington (Schulz e Falkenburger, 2004; Marrachelli *et al.*, 2010).

O modelo utilizado no presente trabalho, por infusão bilateral de 6-OHDA na SNpc, não apresenta a característica formação de corpos de Lewy (Duty e Jenner, 2011), mas apresenta alterações autonômicas, como discutido no primeiro estudo dessa tese, assim como alterações na regulação das respostas vasculares demonstradas pelos resultados aqui descritos.

A resistência vascular, avaliada na circulação da perna de pacientes com DP com ou sem HO, testada de forma não invasiva foi significativamente menor em pacientes com DP mais HO em comparação com DP menos HO, e com pessoas saudáveis. A resistência vascular aumentada significativamente durante o teste

“head-up tilt” não mostrou diferença significativa entre os grupos de pacientes. O volume plasmático foi significativamente maior na DP mais HO em comparação com o DP menos OH e seus controles. Estes resultados indicam que na DP HO há uma resistência vascular inferior em combinação com um volume plasmático maior em comparação com DP-HO e controles. Apesar do aumento na resistência vascular inicial no teste “head-up tilt”, DP+HO são incapazes de manter os níveis pressóricos durante o teste (Groothuis *et al.*, 2011).

Nossos dados mostraram um comprometimento cardiovascular em um modelo animal de parkinsonismo induzido por 6-OHDA, o que acreditamos ser em virtude de mudanças na transmissão sináptica simpática reduzida em receptores α -adrenérgicos pós-ganglionares, ou menor sensibilidade dos mesmos às catecolaminas. Além disso, nossos dados sugerem o envolvimento do endotélio nessas alterações. Portanto, mais estudos seriam necessários para identificar o tipo de alteração que promove essa hiporresponsividade. Além disso, como avaliamos apenas a reatividade vascular em aorta, outros estudos que avaliem esses aspectos em outros leitos vasculares se fazem necessários.

4. CONCLUSÃO

Nossos achados indicam que animais induzidos ao parkinsonismo por 6-OHDA apresentam, além de menores valores de pressão arterial e frequência cardíaca, uma redução na modulação simpática vascular e alterações na atividade parassimpática e simpática sobre o coração, alterações nos reflexos cardiovasculares (barorreflexo e quimiorreflexo), e hiporreatividade α -adrenérgica nos vasos sanguíneos, provavelmente, por mecanismo dependente do endotélio.

Dessa forma, os resultados do presente trabalho fornecem evidências de um comprometimento autonômico e cardiovascular nos animais submetidos à lesão bilateral por infusão de 6-OHDA na SNpc, que envolve, em parte, alterações periféricas. No entanto, não descartamos que tais alterações possam, também, ser resultantes de modificações em áreas centrais de controle cardiovascular.

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

5. REFERENCIAS

ADHIYAMAN, V.; HOBSON, P.; MEARA, R. J. Central and peripheral autonomic integrity in Parkinson's disease. **Age Ageing**, v. 37, n. 5, p. 578-81, Sep 2008. ISSN 1468-2834 (Electronic)

0002-0729 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18687873> >.

AINSLIE, P. N.; OGOH, S. Regulation of cerebral blood flow in mammals during chronic hypoxia: a matter of balance. **Exp Physiol**, v. 95, n. 2, p. 251-62, Feb 2010. ISSN 1469-445X (Electronic)

0958-0670 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19617269> >.

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. **Neurochem Res**, v. 35, n. 10, p. 1620-7, Oct 2010. ISSN 1573-6903 (Electronic)

0364-3190 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20582568> >.

BARBIC, F. et al. Early abnormalities of vascular and cardiac autonomic control in Parkinson's disease without orthostatic hypotension. **Hypertension**, v. 49, n. 1, p. 120-6, Jan 2007. ISSN 1524-4563 (Electronic)

0194-911X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17101845> >.

BOULAMERY, A. et al. Effects of L-Dopa on circadian rhythms of 6-OHDA striatal lesioned rats: a radiotelemetric study. **Chronobiol Int**, v. 27, n. 2, p. 251-64, Jan 2010. ISSN 1525-6073 (Electronic)

0742-0528 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20370468> >.

BRAAK, H. et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiol Aging**, v. 24, n. 2, p. 197-211, Mar-Apr 2003. ISSN 0197-4580 (Print)

0197-4580 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12498954> >.

BUDZINSKA, K.; ANDRZEJEWSKI, K. Respiratory activity in the 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease in the rat. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**, v. 74, n. 1, p. 67-81, 2014. ISSN 1689-0035 (Electronic)

0065-1400 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24718045> >.

BUOB, A. et al. Parasympathetic but not sympathetic cardiac dysfunction at early stages of Parkinson's disease. **Clin Res Cardiol**, v. 99, n. 11, p. 701-6, Nov 2010. ISSN 1861-0692 (Electronic)

1861-0684 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20443012> >.

CARVALHO, M. H. et al. Reactivity of aorta and mesenteric microvessels to drugs in spontaneously hypertensive rats: role of the endothelium. **J Hypertens**, v. 5, n. 3, p. 377-82, Jun 1987. ISSN 0263-6352 (Print)

0263-6352 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3611786> >.

CHAUDHURI, K. R.; HEALY, D. G.; SCHAPIRA, A. H. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. **Lancet Neurol**, v. 5, n. 3, p. 235-45, Mar 2006. ISSN 1474-4422 (Print)

1474-4422 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16488379> >.

CHAUDHURI, K. R.; SCHAPIRA, A. H. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. **Lancet Neurol**, v. 8, n. 5, p. 464-74, May 2009. ISSN 1474-4422 (Print)

1474-4422 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19375664> >.

CHIARAVALLLOTI, A. et al. Cardiac sympathetic denervation is not related to nigrostriatal degeneration in Parkinson's disease. **Ann Nucl Med**, v. 27, n. 5, p. 444-51, Jun 2013. ISSN 1864-6433 (Electronic)

0914-7187 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23443954> >.

DA CUNHA, N. V. et al. Decreased endothelial nitric oxide, systemic oxidative stress, and increased sympathetic modulation contribute to hypertension in obese rats. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 306, n. 10, p. H1472-80, May 15 2014. ISSN 1522-1539 (Electronic)

0363-6135 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24633548> >.

DAMPNEY, R. A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiol Rev**, v. 74, n. 2, p. 323-64, Apr 1994. ISSN 0031-9333 (Print)

0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8171117> >.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, v. 39, n. 6, p. 889-909, Sep 11 2003. ISSN 0896-6273 (Print)

0896-6273 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12971891> >.

DE ABREU, S. B. et al. Role of paraventricular nucleus in exercise training-induced autonomic modulation in conscious rats. **Auton Neurosci**, v. 148, n. 1-2, p. 28-35, Jun 15 2009. ISSN 1872-7484 (Electronic)

1566-0702 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19297253> >.

DE MOURA, M. M. et al. Altered cardiovascular reflexes responses in conscious Angiotensin-(1-7) receptor Mas-knockout mice. **Peptides**, v. 31, n. 10, p. 1934-9, Oct 2010. ISSN 1873-5169 (Electronic)

0196-9781 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20603170> >.

DUNNETT, S. B.; BJORKLUND, A. Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. **Nature**, v. 399, n. 6738 Suppl, p. A32-9, Jun 24 1999. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10392578> >.

DUTRA, S. G. et al. Cardiac autonomic modulation is determined by gender and is independent of aerobic physical capacity in healthy subjects. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e77092, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24098577> >.

DUTY, S.; JENNER, P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. **Br J Pharmacol**, v. 164, n. 4, p. 1357-91, Oct 2011. ISSN 1476-5381 (Electronic)

0007-1188 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21486284> >.

EMBORG, M. E. Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. **J Neurosci Methods**, v. 139, n. 2, p. 121-43, Oct 30 2004. ISSN 0165-0270 (Print)

0165-0270 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15488225> >.

ESPOSITO, E. et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Parkinson's disease. **Exp Neurol**, v. 205, n. 2, p. 295-312, Jun 2007. ISSN 0014-4886 (Print)

0014-4886 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17433296> >.

FAHN, S.; SULZER, D. Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease. **NeuroRx**, v. 1, n. 1, p. 139-54, Jan 2004. ISSN 1545-5343 (Print)

1545-5343 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15717014> >.

FAZAN JUNIOR, R. et al. Influence of sympathetic blockade on the acute hypertensive response to aortic constriction. **Am J Physiol**, v. 273, n. 6 Pt 2, p. H2648-51, Dec 1997. ISSN 0002-9513 (Print)

0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9435599> >.

FRANCHINI, K. G.; KRIEGER, E. M. Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. **J Auton Nerv Syst**, v. 42, n. 1, p. 63-9, Jan 1993. ISSN 0165-1838 (Print)

0165-1838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8436807> >.

GERLACH, M.; RIEDERER, P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. **J Neural Transm**, v. 103, n. 8-9, p. 987-1041, 1996. ISSN 0300-9564 (Print)

0300-9564 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9013391> >.

GOLDSTEIN, D. S. Dysautonomia in Parkinson's disease: neurocardiological abnormalities. **Lancet Neurol**, v. 2, n. 11, p. 669-76, Nov 2003. ISSN 1474-4422 (Print)

1474-4422 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14572735> >.

_____. Cardiac denervation in patients with Parkinson disease. **Cleve Clin J Med**, v. 74 Suppl 1, p. S91-4, Feb 2007. ISSN 0891-1150 (Print)

0891-1150 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17455553> >.

GOLDSTEIN, D. S. et al. Neurocirculatory abnormalities in Parkinson disease with orthostatic hypotension: independence from levodopa treatment. **Hypertension**, v. 46, n. 6, p. 1333-9, Dec 2005. ISSN 1524-4563 (Electronic)

0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16216982> >.

GOLDSTEIN, D. S. et al. Orthostatic hypotension from sympathetic denervation in Parkinson's disease. **Neurology**, v. 58, n. 8, p. 1247-55, Apr 23 2002. ISSN 0028-3878 (Print)

0028-3878 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11971094> >.

GROOTHUIS, J. T. et al. Lower vascular tone and larger plasma volume in Parkinson's disease with orthostatic hypotension. **J Appl Physiol (1985)**, v. 111, n. 2, p. 443-8, Aug 2011. ISSN 1522-1601 (Electronic)

0161-7567 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21636563> >.

GUIMARAES, S.; MOURA, D. Vascular adrenoceptors: an update. **Pharmacol Rev**, v. 53, n. 2, p. 319-56, Jun 2001. ISSN 0031-6997 (Print)

0031-6997 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11356987> >.

GUR, A. Y. et al. Vasomotor reactivity as a predictor for syncope in patients with orthostatism. **Acta Neurol Scand**, v. 126, n. 1, p. 32-6, Jul 2012. ISSN 1600-0404 (Electronic)

0001-6314 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21916853> >.

GUREVICH, T. et al. Cerebral vasomotor reactivity in Parkinson's disease, multiple system atrophy and pure autonomic failure. **J Neurol Sci**, v. 243, n. 1-2, p. 57-60, Apr 15 2006. ISSN 0022-510X (Print)

0022-510X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16438986> >.

HAENSCH, C. A.; JORG, J. Beat-to-beat blood pressure analysis after premature ventricular contraction indicates sensitive baroreceptor dysfunction in Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 21, n. 4, p. 486-91, Apr 2006. ISSN 0885-3185 (Print)

0885-3185 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16258941> >.

HALD, A.; LOTHARIUS, J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? **Exp Neurol**, v. 193, n. 2, p. 279-90, Jun 2005. ISSN 0014-4886 (Print)

0014-4886 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15869932> >.

Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North

American Society of Pacing and Electrophysiology. **Circulation**, v. 93, n. 5, p. 1043-65, Mar 1 1996. ISSN 0009-7322 (Print)

0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8598068> >.

ISAACSON, S. H.; SKETTINI, J. Neurogenic orthostatic hypotension in Parkinson's disease: evaluation, management, and emerging role of droxidopa. **Vasc Health Risk Manag**, v. 10, p. 169-76, 2014. ISSN 1178-2048 (Electronic)

1176-6344 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24729712> >.

JAIN, S. Multi-organ autonomic dysfunction in Parkinson disease. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 17, n. 2, p. 77-83, Feb 2011. ISSN 1873-5126 (Electronic)

1353-8020 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20851033> >.

JAIN, S.; GOLDSTEIN, D. S. Cardiovascular dysautonomia in Parkinson disease: from pathophysiology to pathogenesis. **Neurobiol Dis**, v. 46, n. 3, p. 572-80, Jun 2012. ISSN 1095-953X (Electronic)

0969-9961 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22094370> >.

JOST, W. H. Autonomic dysfunctions in idiopathic Parkinson's disease. **J Neurol**, v. 250 Suppl 1, p. I28-30, Feb 2003. ISSN 0340-5354 (Print)

0340-5354 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12761632> >.

KARLEN-AMARANTE, M. et al. Altered baroreflex and autonomic modulation in monosodium glutamate-induced hyperadipose rats. **Metabolism**, v. 61, n. 10, p. 1435-42, Oct 2012. ISSN 1532-8600 (Electronic)

0026-0495 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22554831> >.

KHEDR, E. M. et al. Prevalence of non motor features in a cohort of Parkinson's disease patients. **Clin Neurol Neurosurg**, v. 115, n. 6, p. 673-7, Jun 2013. ISSN 1872-6968 (Electronic)

0303-8467 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22902078> >.

KORCZYN, A. D. Autonomic nervous system disturbances in Parkinson's disease. **Adv Neurol**, v. 53, p. 463-8, 1990. ISSN 0091-3952 (Print)

0091-3952 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2239485> >.

LEV, N.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Apoptosis and Parkinson's disease. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 27, n. 2, p. 245-50, Apr 2003. ISSN 0278-5846 (Print)

0278-5846 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12657363> >.

LIN, M. T.; YANG, J. J. Stimulation of the nigrostriatal dopamine system produces hypertension and tachycardia in rats. **Am J Physiol**, v. 266, n. 6 Pt 2, p. H2489-96, Jun 1994. ISSN 0002-9513 (Print)

0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8024010> >.

LIPP, A.; SANDRONI, P.; LOW, P. A. Systemic postganglionic adrenergic studies do not distinguish Parkinson's disease from multiple system atrophy. **J Neurol Sci**, v. 281, n. 1-2, p. 15-9, Jun 15 2009a. ISSN 1878-5883 (Electronic)

0022-510X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19345959> >.

_____. Systemic postganglionic adrenergic studies do not distinguish Parkinson's disease from multiple system atrophy. **Journal of the neurological sciences**, v. 281, n. 1-2, p. 15-9, Jun 15 2009b. ISSN 1878-5883 (Electronic)

0022-510X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19345959> >.

LOW, P. A. Prevalence of orthostatic hypotension. **Clin Auton Res**, v. 18 Suppl 1, p. 8-13, Mar 2008. ISSN 0959-9851 (Print)

0959-9851 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18368301> >.

LU, S. F.; YOUNG, H. J.; LIN, M. T. Nigrostriatal dopamine system mediates baroreflex sensitivity in rats. **Neurosci Lett**, v. 190, n. 1, p. 17-20, Apr 28 1995. ISSN 0304-3940 (Print)

0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7624045> >.

MARRACHELLI, V. G. et al. Perivascular nerve fiber alpha-synuclein regulates contractility of mouse aorta: a link to autonomic dysfunction in Parkinson's disease. **Neurochem Int**, v. 56, n. 8, p. 991-8, Jul 2010. ISSN 1872-9754 (Electronic)

0197-0186 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20420875> >.

MARSHALL, J. M. Peripheral chemoreceptors and cardiovascular regulation. **Physiol Rev**, v. 74, n. 3, p. 543-94, Jul 1994. ISSN 0031-9333 (Print)

0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8036247> >.

MEISSNER, W. et al. Neuroprotective strategies for Parkinson's disease: conceptual limits of animal models and clinical trials. **Trends Pharmacol Sci**, v. 25, n. 5, p. 249-53, May 2004. ISSN 0165-6147 (Print)

0165-6147 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15120490> >.

MOSNAIM, A. D. et al. Etiology and risk factors for developing orthostatic hypotension. **Am J Ther**, v. 17, n. 1, p. 86-91, Jan-Feb 2010. ISSN 1536-3686 (Electronic)

1075-2765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19433976> >.

NAUDIN, B.; SALIGAUT, C.; COSTENTIN, J. Influence of oxygen availability on the neurotoxic effect of 6-hydroxydopamine on nigro-striatal dopaminergic neurons. **Neurosci Lett**, v. 130, n. 1, p. 22-6, Sep 2 1991. ISSN 0304-3940 (Print)

0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1749514> >.

NICARETTA, D. H.; PEREIRA, J. S.; PIMENTEL, M. L. [Autonomic disorders in Parkinson's disease]. **Rev Assoc Med Bras**, v. 44, n. 2, p. 120-2, Apr-Jun 1998. ISSN 0104-4230 (Print)

0104-4230 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9699329> >.

NIEHAUS, L. et al. Normal cerebral hemodynamic response to orthostasis in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 8, n. 4, p. 255-9, Mar 2002. ISSN 1353-8020 (Print)

1353-8020 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12039420> >.

OGOH, S. Autonomic control of cerebral circulation: exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v. 40, n. 12, p. 2046-54, Dec 2008. ISSN 1530-0315 (Electronic)

0195-9131 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18981945> >.

OGOH, S. et al. The effect of changes in cardiac output on middle cerebral artery mean blood velocity at rest and during exercise. **J Physiol**, v. 569, n. Pt 2, p. 697-704, Dec 1 2005. ISSN 0022-3751 (Print)

0022-3751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16210355> >.

OKA, H. et al. Cardiovascular dysautonomia in de novo Parkinson's disease without orthostatic hypotension. **Eur J Neurol**, v. 18, n. 2, p. 286-92, Feb 2011. ISSN 1468-1331 (Electronic)

1351-5101 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20602633> >.

ORIMO, S. et al. Degeneration of cardiac sympathetic nerve begins in the early disease process of Parkinson's disease. **Brain Pathol**, v. 17, n. 1, p. 24-30, Jan 2007. ISSN 1015-6305 (Print)

1015-6305 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17493034> >.

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

PRZEDBORSKI, S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 11 Suppl 1, p. S3-7, Jun 2005. ISSN 1353-8020 (Print)

1353-8020 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15885625> >.

RAHMAN, F.; GOLDSTEIN, D. S. Quantitative indices of baroreflex-sympathoneural function: application to patients with chronic autonomic failure. **Clin Auton Res**, v. 24, n. 3, p. 103-10, Jun 2014. ISSN 1619-1560 (Electronic)

0959-9851 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24706176> >.

ROSSO, A. L. Z. N., D. H.; DE MATOS, J. P. Anatomoclinical Correlation in Parkinson's Disease. **Revista Brasileira de Neurologia**, v. 44, n. 4, p. 41-47, 2008.

SAKATA, M. et al. Mesolimbic dopaminergic system is involved in diurnal blood pressure regulation. **Brain Res**, v. 928, n. 1-2, p. 194-201, Feb 22 2002. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11844487> >.

SATO, M. A. et al. Commissural NTS lesions and cardiovascular responses in aortic baroreceptor-denervated rats. **Hypertension**, v. 34, n. 4 Pt 2, p. 739-43, Oct 1999. ISSN 0194-911X (Print)

0194-911X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10523352> >.

SCHULZ, J. B.; FALKENBURGER, B. H. Neuronal pathology in Parkinson's disease. **Cell Tissue Res**, v. 318, n. 1, p. 135-47, Oct 2004. ISSN 0302-766X (Print)

0302-766X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15365812> >.

SCHWARTZ, C. E. et al. Spontaneous fluctuation indices of the cardiovagal baroreflex accurately measure the baroreflex sensitivity at the operating point during upright tilt. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 304, n. 12, p. R1107-13, Jun 15 2013. ISSN 1522-1490 (Electronic)

0363-6119 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23576616> >.

SECCOMBE, L. M. et al. Abnormal ventilatory control in Parkinson's disease--further evidence for non-motor dysfunction. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 179, n. 2-3, p. 300-4, Dec 15 2011. ISSN 1878-1519 (Electronic)

1569-9048 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21982817> >.

SECCOMBE, L. M. et al. Reduced hypoxic sympathetic response in mild Parkinson's disease: further evidence of early autonomic dysfunction. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 19, n. 11, p. 1066-8, Nov 2013. ISSN 1873-5126 (Electronic)

1353-8020 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23891342> >.

SENARD, J. M. et al. Adrenergic supersensitivity in parkinsonians with orthostatic hypotension. **Eur J Clin Invest**, v. 20, n. 6, p. 613-9, Dec 1990. ISSN 0014-2972 (Print)

0014-2972 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1964123> >.

SHARABI, Y.; GOLDSTEIN, D. S. Mechanisms of orthostatic hypotension and supine hypertension in Parkinson disease. **J Neurol Sci**, v. 310, n. 1-2, p. 123-8, Nov 15 2011. ISSN 1878-5883 (Electronic)

0022-510X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21762927> >.

SHIMOHAMA, S. et al. Disease model: Parkinson's disease. **Trends Mol Med**, v. 9, n. 8, p. 360-5, Aug 2003. ISSN 1471-4914 (Print)

1471-4914 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12928038> >.

SILVA, A. S. et al. Cardiovascular and autonomic alterations in rats with Parkinsonism induced by 6-OHDA and treated with L-DOPA. **Life Sci**, Mar 2 2015. ISSN 1879-0631 (Electronic)

0024-3205 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25744393> >.

SINGER, C.; WEINER, W. J.; SANCHEZ-RAMOS, J. R. Autonomic dysfunction in men with Parkinson's disease. **Eur Neurol**, v. 32, n. 3, p. 134-40, 1992. ISSN 0014-3022 (Print)

0014-3022 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1592069> >.

SINGH, S.; DIKSHIT, M. Apoptotic neuronal death in Parkinson's disease: involvement of nitric oxide. **Brain Res Rev**, v. 54, n. 2, p. 233-50, Jun 2007. ISSN 0165-0173 (Print)

0165-0173 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17408564> >.

SLACK, K. et al. Subtle cardiovascular dysfunction in the unilateral 6-hydroxydopamine-lesioned rat. **Parkinsons Dis**, v. 2010, p. 427810, 2010. ISSN 2042-0080 (Electronic)

2042-0080 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20976085> >.

SORENSEN, G. L.; MEHLSSEN, J.; JENNUM, P. Reduced sympathetic activity in idiopathic rapid-eye-movement sleep behavior disorder and Parkinson's disease. **Auton Neurosci**, v. 179, n. 1-2, p. 138-41, Dec 2013. ISSN 1872-7484 (Electronic)

1566-0702 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24021939> >.

SOUZA, H. C. et al. Heart rate and arterial pressure variability in the experimental renovascular hypertension model in rats. **Auton Neurosci**, v. 139, n. 1-2, p. 38-45, May 30 2008. ISSN 1566-0702 (Print)

1566-0702 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18276197> >.

STOESSL, A. J. Prevention and management of late stage complications in Parkinson's disease. **Can J Neurol Sci**, v. 19, n. 1 Suppl, p. 113-6, Feb 1992. ISSN 0317-1671 (Print)

0317-1671 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1571855> >.

TAKAHASHI, H.; WAKABAYASHI, K. Controversy: is Parkinson's disease a single disease entity? Yes. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 11 Suppl 1, p. S31-7, Jun 2005. ISSN 1353-8020 (Print)

1353-8020 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15885626> >.

TEIVE, H. A. [Charcot's contribution to Parkinson's disease]. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 56, n. 1, p. 141-5, Mar 1998. ISSN 0004-282X (Print)

0004-282X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9686138> >.

TEZINI, G. C.; DIAS, D. P.; SOUZA, H. C. Aerobic physical training has little effect on cardiovascular autonomic control in aging rats subjected to early menopause. **Exp Gerontol**, v. 48, n. 2, p. 147-53, Feb 2013. ISSN 1873-6815 (Electronic)

0531-5565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23201548> >.

THOMAS, G. D. Neural control of the circulation. **Adv Physiol Educ**, v. 35, n. 1, p. 28-32, Mar 2011. ISSN 1522-1229 (Electronic)

1043-4046 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21385998> >.

TIEU, K. A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 1, n. 1, p. a009316, Sep 2011. ISSN 2157-1422 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22229125> >.

VALKO, P. O. et al. Heart rate variability in patients with idiopathic Parkinson's disease with and without obstructive sleep apnea syndrome. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 18, n. 5, p. 525-31, Jun 2012. ISSN 1873-5126 (Electronic)

1353-8020 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22366275> >.

VALLDEORIOLA, F.; NOBBE, F. A.; TOLOSA, E. Treatment of behavioural disturbances in Parkinson's disease. **J Neural Transm Suppl**, v. 51, p. 175-204, 1997. ISSN 0303-6995 (Print)

0303-6995 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9470138> >.

VANDERLEI, L. C. et al. Basic notions of heart rate variability and its clinical applicability. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, v. 24, n. 2, p. 205-17, Apr-Jun 2009. ISSN 1678-9741 (Electronic)

0102-7638 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19768301> >.

VILA, M.; PRZEDBORSKI, S. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. **Nat Rev Neurosci**, v. 4, n. 5, p. 365-75, May 2003. ISSN 1471-003X (Print)

1471-003X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12728264> >.

WILLNER, P. Validation criteria for animal models of human mental disorders: learned helplessness as a paradigm case. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 10, n. 6, p. 677-90, 1986. ISSN 0278-5846 (Print)

0278-5846 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3809518> >.

WOLTERS, E. Non-motor extranigral signs and symptoms in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 15 Suppl 3, p. S6-12, Dec 2009. ISSN 1873-5126 (Electronic)

1353-8020 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20083010> >.

YANG, J. J.; LIN, M. T. Arterial baroreceptor information affects striatal dopamine release measured by voltammetry in rats. **Neurosci Lett**, v. 157, n. 1, p. 21-4, Jul 9 1993. ISSN 0304-3940 (Print)

0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8233024> >.

YU, J. G. et al. Arterial baroreflex dysfunction fails to mimic Parkinson's disease in rats. **J Pharmacol Sci**, v. 108, n. 1, p. 56-62, Sep 2008. ISSN 1347-8613 (Print)

1347-8613 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18776711> >.

ZIEMSEN, T.; REICHMANN, H. Non-motor dysfunction in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 13, n. 6, p. 323-32, Aug 2007. ISSN 1353-8020 (Print)

1353-8020 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17349813> >.

_____. Cardiovascular autonomic dysfunction in Parkinson's disease. **J Neurol Sci**, v. 289, n. 1-2, p. 74-80, Feb 15 2010. ISSN 1878-5883 (Electronic)

0022-510X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19740484> >.

ANEXO

TRANSLATIONAL PHYSIOLOGY |

Dysautonomias in Parkinson's disease: cardiovascular changes and autonomic modulation in conscious rats after infusion of bilateral 6-OHDA in substantia nigra

D. Ariza,¹ L. Sisdeli,¹ C. C. Crestani,² R. Fazan,³ and M. C. Martins-Pinge¹

¹Department of Physiological Sciences¹, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil; ²Department of Natural Active Principles and Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, State University Paulista-UNESP, Araraquara, SP, Brazil; and ³Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Submitted 11 June 2014; accepted in final form 14 November 2014

Ariza D, Sisdeli L, Crestani CC, Fazan R, Martins-Pinge MC. Dysautonomias in Parkinson's disease: cardiovascular changes and autonomic modulation in conscious rats after infusion of bilateral 6-OHDA in substantia nigra. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 308: H250–H257, 2015. First published November 21, 2014; doi:10.1152/ajpheart.00406.2014.—It is important to elucidate the mechanism of dysautonomias in patients with Parkinson's disease; therefore, this study aimed to investigate the cardiovascular and autonomic changes that occur in an animal model of Parkinsonism. Adult male Wistar rats were anesthetized before bilateral microinfusions of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) into the substantia nigra. The sham group underwent the same surgical procedure but received vehicle. After 7 days, the mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) were measured, and various drugs were injected into conscious rats through cannulas previously implanted in the femoral artery and vein. Spectral analyses of systolic arterial pressure (SAP) and pulse interval (PI) were conducted with the CardioSeries software as the spontaneous baroreflex gain and effectivity. The animals were subjected to α -, β -adrenergic, or muscarinic receptor antagonism. For confirmation of the lesion, the levels of dopamine in the striatum were quantified by high-performance liquid chromatography. Animals that underwent 6-OHDA microinfusion had lower MAP and HR compared with those in the sham group. Spectral analysis of SAP showed that 6-OHDA animals exhibited a decrease in the sympathetic component. The PI values did not differ between groups. After the administration of muscarinic and β -adrenergic antagonists, the cardiovascular measures did not differ between the groups. However, upon administration of the α -adrenergic antagonist, the 6-OHDA animals exhibited a lower decrease in the MAP. We report cardiovascular impairments in 6-OHDA animals, possibly due to decreased sympathetic activity. Determination of the origin of these changes (central or peripheral) requires further investigation.

sympathetic; parasympathetic; prazosin; spectral analysis; dopamine; baroreflex

PARKINSON'S DISEASE (PD) is characterized by a decrease in striatal dopamine (DA) levels due to the death of neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc). After an 80% decrease of DA levels in the striatum, the classic motor symptoms of PD appear (11, 38). These include bradykine-

sia, rigidity, tremor, and postural instability (29). Although the motor signs of PD are well studied and recognized, symptoms of dysautonomia, despite being reported at all stages of PD, are rarely considered clinically even if they are the main complaint. Dysautonomia considerably impairs the quality of life in the early stages, and it can be debilitating with advancing disease (7, 8).

Cardiovascular involvement is very common in patients with PD (21, 24). Orthostatic hypotension (OH), postprandial hypotension, as well as cardiac arrhythmias, livedo reticularis, and leg edema are commonly reported (26, 43). OH is the most reported symptom with a prevalence of up to 58% in patients with PD (18, 24). However, despite all of the speculation, the pathophysiology of OH, as well as the severity of hemodynamic compromise, remains controversial. This has been associated with a central disorder that impacts the medulla, namely, the involvement of both the central nervous system and the peripheral postganglionic pathways of the autonomic nervous system (2, 17, 19, 26, 34).

Buob et al. (6) directly determined the catecholamine-mediated chronotropic and contractile responses and provided evidence against functionally relevant sympathetic dysfunction. The authors suggest that sympathetic denervation might be incomplete and that the remaining fibers are sufficient for the maintenance of autonomic control. Moreover, they suggested that the depression of the various parameters of heart rate (HR) support significant changes in parasympathetic activity at early stages of PD with subclinical autonomic failure. In contrast, the literature suggests that cardiac dysfunction, even without OH, is due to sympathetic changes (17).

An understanding of the pathophysiology of dysautonomia in PD is very important because the symptoms of dysautonomia, especially in the advanced stages of the disease, are often responsible for limiting and contributing to a poor quality of life. This understanding is needed for the advancement of the search of new treatments. Moreover, this could facilitate a possible early diagnosis of PD.

Considering the importance of elucidating the role and involvement of autonomic function in patients with PD and the paucity of studies in animal models, this study investigated cardiovascular function by assessing autonomic modulation in an animal model of Parkinsonism, the 6-hydroxydopamine (6-OHDA) model.

Address for reprint requests and other correspondence: M. C. Martins-Pinge, Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina; Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380, Campus Universitário, CEP 86055-900 Londrina, PR, Brazil (e-mail: martinspinge@uel.br).