TAIS HARUMI DE CASTRO SASAHARA

**Efeitos da neurotoxina MPTP na estrutura do miocárdio de
camundongos C57/BL**

São Paulo

2010

TAIS HARUMI DE CASTRO SASAHARA

**Efeitos da neurotoxina MPTP na estrutura do miocárdio de camundongos
C57/BL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Antonio Augusto Coppi

São Paulo

2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2304
FMVZ

Sasahara, Tais Harumi de Castro
Efeitos da neurotoxina MPTP na estrutura do miocárdio de camundongos C57/BL /
Tais Harumi de Castro Sasahara. -- 2010.
80 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Augusto Coppi.

1. Doença de Parkinson. 2. Desnervação cardíaca. 3. Cardiomiopatia. 4. MPTP.
5. Estereologia. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Desnervação cardíaca induzida por MPTP: um possível modelo para estudar a doença de Parkinson", protocolado sob o nº1068/2007, utilizando 20 (vinte) camundongos, sob responsabilidade do Prof. Dr. Antonio Augusto Coppi Maciel Ribeiro, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/08/07.

(We certify that the Research "Cardiac denervation induced by MPTP: a possible model to study Parkinson's disease", protocol number 1068/2007, utilizing 20 (twenty) mice, under the responsibility Prof. Dr. Antonio Augusto Coppi Maciel Ribeiro, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 08/22/07.

São Paulo, 22 de agosto de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SASAHARA, Tais Harumi de Castro

Título: Efeitos da neurotoxina MPTP na estrutura do miocárdio de camundongos C57/BL

Tese apresentada junto ao programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

A **Deus**, pela grandiosidade de nos conduzir, iluminar e mostrar o caminho que devemos trilhar. Por colocar pessoas especiais em nossas vidas. De nos dar a oportunidade de viver situações e conhecer lugares que nos permitem aprender, mudar e crescer... Que nos dá força e luz para acreditar no amanhã...

Amanhã!
Será um lindo dia
Da mais louca alegria
Que se possa imaginar
Amanhã!
Redobrada a força
Prá cima que não cessa
Há de vingar
Amanhã!
Mais nenhum mistério
Acima do ilusório
O astro rei vai brilhar
Amanhã!
A luminosidade
Alheia a qualquer vontade
Há de imperar!
Há de imperar!
Amanhã!
Está toda a esperança
Por menor que pareça
Existe e é prá vicejar
Amanhã!
Apesar de hoje
Será a estrada que surge
Prá se trilhar
Amanhã!
Mesmo que uns não queiram
Será de outros que esperam
Ver o dia raiar
Amanhã!
Ódios aplacados
Temores abrandados
Será pleno!
Será pleno!

Amanhã (Guilherme Arantes)

Dedico àqueles que sempre me apoiaram em todos os momentos, felizes e tristes. Que me disseram palavras de conforto e incentivo quando a dificuldade estava presente. Que me deram esperanças quando tudo parecia não ter solução. Que me mostraram o caminho da vitória quando a desistência parecia ser o único fim. Aos meus pais, **Rubens** e **Maria Zélia**, meus grandes mestres.

Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas que já têm a forma do nosso corpo

E esquecer os nossos caminhos que nos levam sempre aos mesmos lugares...

É o tempo da travessia e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado para sempre à margem de nós mesmos

(Fernando Pessoa)

“Bons profissionais vivem ilhados, enquanto excelentes profissionais vivem interagindo. Bons profissionais valorizam a força do indivíduo, profissionais brilhantes valorizam a força do grupo. Bons profissionais lutam pelo estrelismo, enquanto profissionais excelentes lutam pelo sucesso da equipe.”

“Bons profissionais são aptos para cobrar, pressionar, punir, mas excelentes profissionais são aptos para encorajar, estimular e apostar no seu time. Sabem que quem pressiona e pune seus pares está apto para lidar com números, mas não com seres humanos. Não têm a necessidade neurótica de estar sempre certo ou de ser o centro das atenções.”

“Excelentes profissionais sabem que o poder do elogio é muito mais eficiente do que o poder do medo e das pressões. Vive esse pensamento: *quem não sabe elogiar não é digno de receber elogios.*”

Augusto Cury (O Código da Inteligência)

"Depois de algum tempo, você aprende a diferença, a sutil diferença, entre dar a mão e acorrentar uma alma..."

... Descubra que as pessoas com quem você mais se importa na vida são tomadas de você muito depressa, por isso sempre devemos deixar as pessoas que amamos com palavras amorosas, pode ser a última vez que as vejamos. Aprenda que as circunstâncias e os ambientes têm influência sobre nós, mas nós somos responsáveis por nós mesmos. Começa a aprender que não se deve comparar com os outros, mas com o melhor que pode ser. Descubra que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser, e que o tempo é curto. Aprenda que não importa onde já chegou, mas onde está indo, mas se você não sabe para onde está indo, qualquer lugar serve. Aprenda que, ou você controla seus atos ou eles o controlarão, e que ser flexível não significa ser fraco ou não ter personalidade, pois não importa quão delicada e frágil seja uma situação, sempre existem dois lados

Aprenda que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiência que se teve e o que você aprendeu com elas do que com quantos aniversários você celebrou. Aprenda que há mais dos seus pais em você do que você supunha. Aprenda que nunca se deve dizer a uma criança que sonhos são bobagens, poucas coisas são tão humilhantes e seria uma tragédia se ela acreditasse nisso. Portanto... plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores. E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!"

William Shakespeare

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.**

Ao Departamento de Cirurgia e ao Programa de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (07-50524-5)** pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES** pela concessão da bolsa do Programa de Estágio de Doutorando no Exterior (PDEE).

Ao **Prof. Dr. Antonio Augusto Coppi**, pela orientação e oportunidade de desenvolver este trabalho no Laboratório de Estereologia Estocástica e Anatomia Química (LSSCA).

À **Prof. Maria Grazia Spillantini** pela orientação e apoio durante o período de estágio na Universidade de Cambridge.

Aos **amigos do LSSCA**: Ana Paula Frigo, Ana Paula Bianchi, Andrea Almeida, Aliny Lobo Ladd, Demilto Yamaguchi da Pureza, Eliane Muniz, Felipe Oliveira, Fernando Ladd, Fernanda Vieira, Kelly, Luciana Maria Bigaram Abrahão e Silvio Pires Gomes pela convivência diária no lab.

Agradecimento especial para Andrea, Aliny, Felipe, Fernando, Luciana e Silvio pela grande ajuda nesta tese. Foi vital a participação de vocês!

Aos amigos de uma década, Silvio e Demilto por essa longa jornada na Anatomia.

Aos **funcionários do Programa de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.**

Aos **funcionários da Biblioteca** da FMVZ-USP

Aos **funcionários da Comissão de Pós-Graduação** da FMVZ- USP

E a **todos** que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

RESUMO

SASAHARA, T. H. C. **Efeitos da neurotoxina MPTP na estrutura do miocárdio de camundongos C57/BL**. [Effects of the neurotoxin MPTP on the myocardial structure in C57/BL mice]. 2010. 80 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela progressiva depleção dos neurônios dopaminérgicos da substância negra (*pars compacta*). A DP não ocasiona apenas uma desordem motora, mas também pode provocar uma disautonomia cardiovascular. A DP com sintomas similares aos que ocorrem em humanos pode ser experimentalmente induzida em ratos e camundongos com a administração das neurotoxinas 1-metil-1-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropirimidina (MPTP), 6-hidroxidopamina (6-OHDA) e rotenona. Mais, na década de 90, camundongos transgênicos que expressam altos níveis de alfa-sinucleína mutante humana têm sido produzidos e utilizados para investigar a possível relação entre a agregação da proteína alfa-sinucleína e a DP, uma vez que em humanos, a alta expressão dessa proteína está relacionada ao desenvolvimento do parkinsonismo associado à desnervação cardíaca simpática. No entanto, a desnervação cardíaca e suas conseqüências no miocárdio na DP não estão claramente caracterizadas, pois na literatura os métodos quantitativos empregados para tal finalidade têm sua confiabilidade e acurácia questionáveis. Desta forma, avaliou-se, no modelo de indução neurotóxico (MPTP), o miocárdio de camundongos C57/BL aplicando-se métodos morfoquantitativos tridimensionais (estereológicos). Neste trabalho, observamos que o volume da parede ventricular, o volume e a densidade de volume do interstício cardíaco foram, respectivamente, 0,8%, 5,3% e 2,4% maior no grupo MPTP. O volume do lúmen ventricular, o volume ventricular, o volume das fibras musculares cardíacas e a sua densidade de volume foram, respectivamente, 11,7%, 0,9%, 2,3% e 1,7% maior no grupo controle. O número total de núcleos de cardiomiócitos foi 14,8% menor no grupo MPTP bem como o número total de cardiomiócitos que foi 19% menor também neste grupo. Houve diferença estatística significativa entre os grupos para o parâmetro número de

cardiomiócitos. Não houve, porém, diferença estatística significativa para os outros parâmetros avaliados.

Palavras-chave: Doença de Parkinson. Desnervação cardíaca. Cardiomiopatia.
MPTP. Estereologia.

ABSTRACT

SASAHARA, T. H. C. **Effects of the neurotoxin MPTP on the myocardial structure in C57/BL mice.** [Efeitos da neurotoxina MPTP na estrutura do miocárdio de camundongos C57/BL]. 2010. 80 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder mostly characterised by a profound reduction of dopamine in the striatum due to a dramatic loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra (*pars compacta*). The disease is not only characterised by a motor disorder but also present cardiovascular dysautonomia. The disease has been chemically induced in rats and mice using neurotoxins such as 1-methyl-1-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyrimidina (MPTP), 6-OHDA and rotenone. In the nineties, transgenic α -synuclein mice have recently been used as a model of PD and alpha-synuclein aggregation, because the overexpression of this protein is related to the development of parkinsonism associated to the sympathetic cardiac denervation. Although, the cardiac denervation in PD and its consequences in myocardium is not well defined because the literature reports no reliable quantitative methods. Therefore, the myocardium of the C57/BL mice was investigated in the neurotoxin animal model (MPTP) applying tridimensional morphoquantitative methods (stereological). In this study, we observed an increase of 0,8%, 5,3% and 2,4% in ventricular wall volume, in cardiac interstitial volume and in cardiac interstitial volume density, respectively, in the MPTP group. The lumen ventricular volume, the ventricular volume, the cardiac muscle fibre and their volume density were, respectively, 11,7%, 0,9% , 2,3% and 1,7% larger in control group. The total number of cardiomyocyte nuclei was 14,8% lower in MPTP group as well as the total number of cardiomyocyte that was 19% lower for this group too. Significant difference was observed between the groups to the total number of cardiomyocyte. No significant difference, however, was detected for the others estimated parameters.

Key-words: Parkinson's disease. Cardiac denervation. Cardiomyopathy. MPTP.

Stereology

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVOS INICIAIS	20
2.2 OBJETIVOS EFETIVAMENTE ALCANÇADOS	21
2.2.1 Coração	21
3 REVISÃO DA LITERATURA	23
3.1 MODELOS DE INDUÇÃO DA DP	23
3.1.1 6-Hidroxidopamina (6-OHDA)	23
3.1.2 Rotenona	24
3.1.3 1-metil-1-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP)	25
3.1.3.1 Modelo neurotóxico ou químico de estudo da doença de Parkinson e deprivação da inervação cardíaca	26
3.2 DOENÇA DE PARKINSON E ALTERAÇÕES CARDÍACAS	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 MATERIAIS	31
4.1.1 Estudo piloto	31
4.1.2 Estudo propriamente dito	31
4.2 MÉTODOS	32
4.2.1 Modelo químico	32
4.2.2 Teste comportamental	33
4.2.3 Eutanásia	33
4.2.4 Estudo morfoquantitativo (estereológico) do coração	34
4.2.4.1 Volume do ventrículo esquerdo (VE)	34
4.2.4.2 Amostragem do VE	36
4.2.4.3 Microestrutura quantitativa do coração	39
4.2.4.3.1 <i>Número total de núcleos de cardiomiócitos (Nn)</i>	39
4.2.4.3.2 <i>Número médio de núcleos de cardiomiócitos por célula</i>	40

4.2.4.3.3 Número total de cardiomiócitos (N_c)	42
4.2.4.3.4 Densidade de volume das fibras musculares cardíacas e do interstício cardíaco (V_v)	43
4.2.4.3.5 Volume total de fibras musculares cardíacas ($V(FMC)$)	43
4.2.4.3.6 Volume total do interstício cardíaco ($V(IC)$)	44
4.2.5 Análise estatística	44
5 RESULTADOS	46
5.1 ESTUDO PILOTO	46
5.1.1 Teste comportamental	46
5.2 ESTUDO PROPRIAMENTE DITO	49
5.2.1 Volumes do ventrículo esquerdo - $V(VE)$	49
5.2.2 Número total de núcleos de cardiomiócitos (N_n)	50
5.2.3 Número total de cardiomiócitos (N_c)	51
5.2.4 Densidade de volume da fibra muscular cardíaca (FMC) e do interstício cardíaco (IC)	52
5.2.5 Volume total de fibra muscular cardíaca e volume total do interstício cardíaco	54
6 DISCUSSÃO	58
6.1 PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE INDUÇÃO	58
6.2 MPTP E A QUANTIFICAÇÃO TRIDIMENSIONAL ESTEREOLÓGICA	59
6.3 ESTUDO MORFOQUANTITATIVO DO MIOCÁRDIO	60
6.3.1 Volume do ventrículo esquerdo	61
6.3.2 Densidade de volume e volume total das fibras musculares cardíacas (FMC) e do interstício cardíaco (IC)	62
6.3.3 Número total de núcleos de cardiomiócitos e número total de cardiomiócitos	63
6.3.4 MPTP como modelo para o estudo morfoquantitativo do miocárdio	64
7 JUSTIFICATIVA PARA AS MUDANÇAS DOS OBJETIVOS INICIAIS DO PROJETO	67
8 CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é caracterizada pela degeneração progressiva de neurônios dopaminérgicos na substância negra e um dos sinais clássicos da doença é a presença dos corpúsculos de Lewy, uma inclusão fibrilar citoplasmática cujo componente principal é a proteína alfa-sinucleína (SPILLANTINI et al., 1998; SHIMOJI et al., 2005; TOFARIS et al., 2006).

Esta doença não é apenas caracterizada por uma desordem motora, mas uma desordem multisistêmica com o envolvimento de vários sistemas extranigrais incluindo a degeneração dos sistemas colinérgicos, serotoninérgicos e catecolaminérgicos. Desordens gastrointestinais, urogenitais, cardiovasculares e termoregulatórias são, dessa maneira, freqüentemente observadas em pacientes com a doença de Parkinson (PROBST et al., 2008; SCHAPIRA, 2008).

Na DP, o processo patológico (corpúsculo de Lewy e neuritos) envolve precocemente o gânglio simpático cardíaco no curso da doença e continua seguindo uma seqüência topográfica: tronco encefálico, *locus ceruleus*, núcleo motor dorsal do vago e o núcleo colinérgico basalis de Meynert seguindo a hipótese proposta por Braak (HAENSCH et al., 2009). De acordo com Braak et al. (2006) a patologia de corpúsculo de inclusão associada com a DP segue uma seqüência de seis estágios em que os sistemas olfatório, autônomo, límbico e somatomotor tornam-se progressivamente envolvidos e afetados topograficamente.

Numerosos estudos têm demonstrado disfunções na inervação cardíaca simpática em pacientes acometidos pela DP e no modelo químico da doença, em que há a aplicação da neurotoxina MPTP em camundongos da linhagem C57/BL (GOLDSTEIN et al., 2000; LI et al., 2002; REN et al., 2004; METZ et al., 2005; HAENSCH et al., 2009). Esta disautonomia cardiovascular também é observada na DP que acomete uma mesma família em que o gene que codifica a proteína alfa-sinucleína sofreu mutação. Os resultados indicaram que tanto o parkinsonismo quanto a desnervação cardíaca simpática resultaram da expressão excessiva da proteína alfa-sinucleína (SINGLETON et al., 2004).

Todos os pacientes apresentaram um decréscimo na inervação cardíaca, especialmente na parede lateral do ventrículo esquerdo e esta desnervação cardíaca precede a perda neuronal nos gânglios simpáticos. Estes gânglios são conhecidos como locais de predileção para ocorrência dos corpúsculos de Lewy (ORIMO et al., 2005).

Embora a desnervação cardíaca tenha sido reportada em pacientes acometidos pela DP, há relativamente poucos estudos utilizando métodos quantitativos acurados e eficientes. Neste sentido, há poucos experimentos com delineamento estereológico empregados no coração.

O emprego da estereologia tem se limitado, mais particularmente, aos neurônios dopaminérgicos no estriado e na substância negra durante o envelhecimento (CABELLO et al., 2002) ou durante o advento da DP (MA et al., 1997). Não obstante, há estudos baseados em métodos quantitativos morfométricos assumindo modelos geométricos e utilizando fatores de correção como, por exemplo, o de Abercrombie (1946).

Desta forma, os resultados reportando uma desnervação cardíaca produzida pela DP foram obtidos por técnicas de imaginologia como a cintilografia e a tomografia cardíaca ou por meio de estudos eletrofisiológicos, dosagens bioquímicas e imunorreatividade em humanos e no modelo animal (TAKATSU et al., 2000; REN et al., 2004; AMINO et al., 2005; GOLDSTEIN et al., 2005, HAENSCH et al., 2009, ZIEMSEN; REICHMANN, 2010).

Assim, este trabalho é inovador uma vez que empregou métodos baseados em delineamento estereológico tridimensional, no qual se usa a probabilidade e a geometria estocástica para estimar o número total de cardiomiócitos, o número total de núcleos de cardiomiócitos, o volume ventricular e o volume de fibras cardíacas e do interstício em camundongos C57/BL após a aplicação da neurotoxina MPTP. É de se esperar que este tipo de estudo possa nos dar mais informações a respeito do processo patogênico presente no coração de camundongos e os resultados nos forneçam suporte para o diagnóstico e tratamento da DP para melhorar a qualidade de vida dos pacientes portadores desta enfermidade.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS INICIAIS

Objetivou-se avaliar inicialmente neste projeto:

- *Inervação cardíaca extrínseca e intrínseca*

- Extrínseca: estimar o número total e tamanho de seus neurônios: população neuronal total, neurônios colinérgicos e dopaminérgicos.

- Intrínseca: estimar o tamanho e numero total dos neurônios cardíacos: população neuronal total, neurônios dopaminérgicos e possíveis neurônios colinérgicos.

- *Testes de função cardíaca*

Avaliar os seguintes parâmetros:

- Débito cardíaco.
- Volume sistólico.
- Frequência cardíaca.
- Pressão arterial.
- Resistência periférica total.
- Participação do sistema nervoso autônomo na manutenção da frequência cardíaca basal.

- *Sistema nigroestriatal dopaminérgico*

Estimar:

- Volume da substância negra (*pars compacta*) e do estriado.

- Número total, volume médio e volume total dos neurônios: população neuronal inespecífica, neurônios dopaminérgicos.

- ***Quantificação cromatográfica das catecolaminas cardíacas e do sistema nigroestriatal***

- dosagem de dopamina nigroestriatal e de catecolamina cardíaca

2.2 OBJETIVOS EFETIVAMENTE ALCANÇADOS

Objetivou-se descrever, morfoquantitativamente, baseando-se nos métodos quantitativos estereológicos, as possíveis alterações no coração (miocárdio) de camundongos resultantes da aplicação da neurotoxina MPTP.

2.2.1 Coração

Os seguintes parâmetros foram estimados:

- Volume do ventrículo esquerdo (VE): volume da parede do VE e volume do lúmen do VE.
- Número total de núcleos de cardiomiócitos no ventrículo esquerdo.
- Número total de cardiomiócitos no ventrículo esquerdo.
- Densidade de volume das fibras musculares cardíacas.
- Densidade de volume do interstício cardíaco.
- Volume total de fibras musculares cardíacas.
- Volume total de interstício cardíaco.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Para facilitar a compreensão deste estudo, este capítulo de revisão da literatura está dividido como se segue abaixo:

3.1 MODELOS DE INDUÇÃO DA DP

Modelos animais constituem uma ferramenta extremamente valiosa para estudar a patogênese e avaliar estratégias de intervenção terapêutica de doenças humanas. Como a doença de Parkinson não se desenvolve espontaneamente nos animais, esta deve ser mimetizada a partir do uso de agentes tóxicos. O modelo ideal, portanto, deve reproduzir a evolução e sinais clínicos similares àqueles da doença de Parkinson. Os animais devem, por exemplo, apresentar perda progressiva de neurônios dopaminérgicos, deposição de corpúsculos de inclusão no cérebro e movimentos descoordenados. Existem três principais toxinas que são utilizadas para induzir a doença: 6-hidroxidopamina (6-OHDA), 1-metil-1-4fenil-1,2,3,6-tetrahidropirimidina (MPTP) e pesticidas/herbicidas rotenona. Todas estas drogas provocam a morte de neurônios dopaminérgicos associados com parkinsonismo (UVERSKY, 2004).

3.1.1 6-Hidroxidopamina (6-OHDA)

A 6-hidroxidopamina (6-OHDA) foi a primeira droga descoberta que induzia a destruição seletiva das células catecolaminérgicas. Este modelo tem sido empregado em diversas espécies, incluindo camundongos, ratos, felinos, cães e primatas não-humanos. O rato tem sido a espécie mais comumente usada devido à fácil replicabilidade e estabilidade deste modelo animal (EMBORG, 2004). As lesões causadas pela 6-OHDA não resultam na formação do corpúsculo de Lewy na

substância negra e pode produzir dano não específico em outros neurônios. A maior vantagem desse modelo é a quantificação do déficit motor (rotação) (BEAL., 2001).

Turgut et al. (1998) avaliaram a assimetria da atividade simpática em ratos após a aplicação da 6-OHDA na porção direita e esquerda da substância negra. Não foram encontradas diferenças no número total de células positivas para tirosina hidroxilase para ambas as porções da substância negra, no entanto alterações hemodinâmicas, eletrocardiográficas e bioquímicas foram observadas. Os resultados indicaram que a lesão no lado direito apresentou maiores conseqüências no sistema nervoso simpático. Os resultados também sugerem que há efeitos diferentes na inervação cardíaca simpática quando realizada a lesão na porção direita da substância negra em comparação à lesão na produzida na porção esquerda.

3.1.2 Rotenona

A rotenona tem sido empregada como pesticida e é também utilizada em lagos e reservatórios para erradicar peixes que são considerados pragas. Ela é extremamente lipofílica, atravessando livremente as membranas celulares independente de qualquer transportador. Desta forma, atravessa facilmente a barreira hemato-encefálica, atingindo o cérebro rapidamente, acumulando-se nas organelas subcelulares, tais como mitocôndrias. O modelo da rotenona tem sido uma ferramenta valiosa para investigações das bases moleculares para a formação do corpúsculo de Lewy e a morte dos neurônios dopaminérgicos e também um excelente suporte experimental para as hipóteses ambientais da patogênese da doença de Parkinson (UVERSKY, 2004).

A aplicação da rotenona reproduz os sinais neuroquímicos, neuropatológicos e comportamentais da doença de Parkinson. A droga foi administrada diariamente em ratos por via intraperitoneal com duas doses diferentes: 1,5mg/kg e 2,5 mg/kg, durante dois meses. Este tratamento causou depleção de dopamina no estriado e no córtex pré-frontal e também reduziu a imunoreatividade da tirosina hidroxilase no estriado (ALAM; SCHMIDT, 2002).

A infusão contínua de rotenona por uma cânula venosa jugular conectada a uma minibomba osmótica subcutânea em ratos Sprague-Dawley e Lewis causou uma degeneração altamente seletiva dopaminérgica nigroestriatal associada à hipocinesia e rigidez. Os neurônios nigrais apresentaram em seu citoplasma acúmulo de inclusões fibrilares que continham ubiquitina e alfa-sinucleína, similar ao encontrado nos corúsculos de Lewy (BETARBET et al., 2000)

3.1.3 1-metil-1-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP)

O 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) é uma neurotoxina altamente lipofílica que atravessa facilmente a barreira hematoencefálica. O MPTP é convertido em 1-metil-4-fenilpiridina (MPP^+) pela enzima monoamina oxidase B (MAOB), uma enzima envolvida na degradação de catecolamina. O MPP^+ , o metabólito tóxico, é transportado para o terminal dopaminérgico pelo transportador de dopamina (DAT), bem como pelos transportadores de norepinefrina e serotonina (JAVITCH et al., 1985; MAYER et al., 1986). O MPP^+ intracelular acumula-se no interior da mitocôndria onde inibi o complexo I da cadeia transportadora de elétron, reduzindo a geração de ATP. O efeito, porém, mais danoso é o aumento da produção de radicais livres. Como na DP, além da perda de neurônios dopaminérgicos da substância negra, a toxina também causa perda em neurônios do *locus ceruleus* (BEAL, 2001).

Devido às seqüelas degenerativas que ocorrem após a administração do MPTP em animais, este têm sido considerado um bom modelo de parkinsonismo porque induz sinais e sintomas clínicos similares aos observados em humanos. As mudanças celulares e bioquímicas que ocorrem após a administração da droga são similares aos observados na doença de Parkinson idiopática. (SMEYNE; JACKSON-LEWIS, 2005).

Um estudo experimental conduzido em duas linhagens diferentes de camundongos (C57/BL e CD-1) demonstrou que após a administração do MPTP ocorreu uma redução de 33% no número de neurônios-TH positivos da substância negra da linhagem C57/BL que se mostrou altamente sensível ao MPTP. Esta

diferença foi observada ao longo do eixo rostrocaudal do mesencéfalo que parece estar especificamente implicado na via nigroestriatal mesencefálica ventral (MUTHANE et al., 1994).

3.1.3.1 Modelo neurotóxico ou químico de estudo da doença de Parkinson e deprivação da inervação cardíaca

O modelo químico de indução da DP a partir do uso do MPTP em camundongos tem sido reportado como o mais eficiente, de fácil replicação e pouco invasivo porque geralmente as vias de aplicação são as sistêmicas: subcutânea, intraperitoneal, intravenosa e intramuscular (PRZEDBORSKI et al., 2001). No entanto, o uso desta neurotoxina requer cuidados e exige responsabilidade e treino por parte do pesquisador já que é extremamente tóxica para humanos também (JACKSON-LEWIS; PRZEDBORSKI, 2007).

Ren et al. (2004) avaliaram as propriedades mecânicas dos receptores adrenérgicos e do cálcio intracelular em cardiomiócitos isolados *in vitro* a partir de camundongos C57/BL6 induzidos com MPTP e não tratados com a droga. Para a avaliação da propriedade mecânica foram aplicadas diferentes frequências de estímulos elétricos nos cardiomiócitos *in vitro*. Foi observada uma tendência na redução da amplitude do pico de encurtamento do cardiomiócito dos camundongos tratados com MPTP quando comparado com os animais controle. No entanto, a diferença não foi significativa. Este resultado sugere que o armazenamento e a liberação do cálcio intracelular estão preservados nos cardiomiócitos dos animais tratados.

A desnervação cardíaca foi avaliada comparativamente entre pacientes humanos com DP e camundongos C57/BL usando a cintilografia cardíaca. A redução da metaiodobenzilguanidina radiomarcada (123I-MIBG), um análogo da norepinefrina, pode ser usada como um índice da desnervação ou disfunção simpática cardíaca. Os pacientes portadores da DP e os camundongos pré-tratados com MPTP apresentaram redução na acumulação cardíaca do 123I-MIBG. Esta redução sugere que os nervos simpáticos pós-ganglionares foram comprometidos

pelo MPTP nos camundongos e na PD nos pacientes humanos (TAKATSU et al., 2000). A redução do 123I-MIBG em camundongos C57BL pré-tratados com duas doses diferentes de MPTP (10 mg/kg e 40 mg/kg) também foi constatada por Fukumitsu e colaboradores (2006) que observaram além da diminuição na concentração dos transportadores de norepinefrina uma diminuição das concentração de norepinefrina em comparação com o grupo controle. A diferença não foi significativa, no entanto, entre os dois grupos tratados com doses diferentes de MPTP.

Foi investigado em corações de camundongos C57/BL por meio das técnicas de imunohistoquímica, HPLC and Western-blot as conseqüências da administração de MPTP (30 mg/kg/ip duas aplicações com intervalos de 12h). Encontrou-se redução nos níveis de dopamina e noradrenalina, sugerindo disfunção simpática. A imunoreatividade para sinaptofisina, tirosina hidroxilase e NET foi abundante tanto para o grupo controle, que recebeu apenas solução salina, e para o grupo MPTP, demonstrando nenhuma diferença aparente entre os grupos. Na análise de Western blot também não foi evidenciada diferença na quantidade dessas proteínas. Assim, conclui-se que embora as fibras nervosas miocárdicas estivessem preservadas, há uma aparente disfunção simpática cardíaca (ANIMO et al., 2008).

3.2 DOENÇA DE PARKINSON E ALTERAÇÕES CARDÍACAS

Amino et al. (2005) examinaram a parede anterior do ventrículo esquerdo cujas células musculares foram marcadas imunohistoquimicamente com tirosina hidroxilase (TH), neurofilamento (NF) e proteína S-100 em pacientes com doença de Parkinson e em indivíduos controle para estimarem a densidade de axônios imunorreativos por área. Nos portadores da doença, os axônios imunoreativos à TH quase desapareceram e os axônios imunorreativos a NF diminuíram e a degeneração morfológica dos nervos simpáticos cardíacos na doença de Parkinson foi confirmada. A tripla marcação para NF, TH e mielina mostrou claramente o profundo envolvimento dos axônios simpáticos na DP.

Goldstein et al. (2005) detectaram, utilizando técnicas de imaginologia, um déficit na inervação simpática cardíaca em pacientes com a DP que foi corroborada por um decréscimo na reatividade da tirosina hidroxilase na inervação do miocárdio. Vários pacientes apresentavam corpúsculo de Lewy ou α -sinucleinopatia nos gânglios simpáticos.

Neste estudo ainda foi verificado que a disautonomia cardiovascular ocorre como parte de um processo que envolve a combinação da falha reflexiva cardiovagal, falha na neurocirculação simpática e na desnervação parcial extracardíaca noradrenérgica. Esta combinação constitui a patofisiologia da doença e mostra que o tratamento das desordens de movimento, usando drogas que direta ou indiretamente propiciam a vasodilatação, podem piorar a tolerância ortostática e reduzir a pressão sanguínea ortostática, como a reportada pela Levodopa e agonistas dos receptores dopaminérgicos.

Em um estudo conduzido por Goldstein et al. (2000) todos os pacientes com a DP e deficiência neurocirculatória simpática apresentaram evidências de desnervação cardíaca. Os pacientes que também apresentaram atrofia de múltiplo sistema e deficiência neurocirculatória simpática apresentaram concomitante inervação cardíaca normal. Estes achados sugerem que a falha neurocirculatória em pacientes com parkinsonismo resulta de processos que envolvem a perda dos terminais nervosos simpáticos. Devido ao fato de que a falha autonômica pode estar associada à perda difusa da inervação terminal simpática, sugere-se que a desnervação simpática pode ser cardioseletiva na doença de Parkinson.

A doença reflete uma anormalidade na função das catecolaminas não só no sistema nervoso central, mas também no sistema nervoso periférico. Vários artigos suportam a noção de que a perda de células dopaminérgicas nigroestriatais resulta de injúrias oxidativas e neurotóxicas. A alta taxa de deaminação oxidativa da norepinefrina explica em parte a cardioseletividade da desnervação simpática cardíaca. De acordo com os resultados obtidos por Goldstein et al. (2000), somente a DP e não a atrofia de múltiplos sistemas está associada a perda do terminal nervoso simpático.

Para confirmar o envolvimento dos terminais simpáticos na inervação cardíaca foi realizada a tomografia de emissão de positron 6-[^{18}F] fluorodopamina que mostrou que os pacientes com a doença de Parkinson apresentaram uma perda progressiva da inervação cardíaca ao longo do tempo, especialmente na parede

lateral ventricular cardíaca, na qual a radioatividade derivada do 6-[¹⁸F] fluorodopamina reduziu em 30% em uma média de dois anos. Esta taxa na perda dos terminais simpáticos foi maior do que a perda dos terminais dopaminérgicos nigroestriatais. Metade dos pacientes que não apresentaram hipotensão ortostática já apresentavam um decréscimo na concentração de radiação emitida por 6-[¹⁸F] fluorodopamina na parede lateral do ventrículo esquerdo do miocárdio e a outra metade dos pacientes apresentou um decréscimo na parede lateral ou ápice do ventrículo cardíaco. Como esses pacientes não apresentaram uma perda progressiva da radioatividade do 6-[¹⁸F] fluorodopamina no fígado e no córtex renal, mas somente no coração e no baço, isto indica que na doença de Parkinson existe uma cardioseletividade na desnervação simpática (LI et al., 2002).

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são descritos os materiais utilizados e os métodos empregados neste trabalho.

4.1 MATERIAIS

Os materiais foram divididos em estudo piloto e estudo propriamente dito.

4.1.1 Estudo piloto

No estudo piloto foram utilizados 14 camundongos machos da linhagem C57/BL, com 2 meses de idade e com peso médio de 20g ($\pm$ 2DP). Os animais foram obtidos no biotério de camundongos isogênicos do Instituto de Ciências Biomédica (ICB) (USP). Estes animais foram organizados em três grupos:

- Grupo controle: Animais injetados com solução salina 0,9% (4 animais).
- Grupo agudo: Animais induzidos com MPTP (modelo neurotóxico) (5 animais).
- Grupo crônico: Animais induzidos com MPTP (modelo neurotóxico) (5 animais).

4.1.2 Estudo propriamente dito

Para este estudo foram utilizados 10 camundongos machos da linhagem C57/BL, com 2 meses de idade, com peso médio de 20g ($\pm$ 2DP) e provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME) (Unifesp), sob a

aprovação do comitê de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP sob o número 1068/2007. De acordo com o tratamento empregado, os animais foram assim alocados:

Grupo I – Animais induzidos com MPTP (modelo neurotóxico) (5 animais)

Grupo II- Animais controle “sham” (injetados com solução salina 0,9%) (5 animais)

4.2 MÉTODOS

Para o melhor entendimento dos procedimentos realizados nesta pesquisa, os métodos serão descritos em itens.

4.2.1 Modelo químico

No estudo piloto, a neurotoxina 1-metil-1-4fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP Sigma®) foi diluída em 100 ml de solução salina para se obter uma solução 1%. Os animais do grupo agudo receberam uma dose de 30mg/kg (i.p) em duas aplicações com intervalo de 16h. Os animais do grupo crônico receberam uma dose de 4mg/kg (i.p) com aplicações diárias durante 20 dias. O grupo controle recebeu solução salina 0,9% (i.p). No trabalho de Takatsu et al. (1999) ficou comprovado que a dose de 50mg/kg (i.p) (2 vezes) com intervalo de 16 horas resultou em um maior comprometimento da inervação cardíaca. Dessa forma, foi escolhido este último protocolo para ser usado neste projeto. Tal escolha será melhor justificada no capítulo da discussão.

Finalizado o estudo piloto e definido o protocolo, os animais do grupo I (do estudo propriamente dito) receberam uma dose de 50mg/kg (i.p) em duas aplicações com intervalos de 16 horas. Os animais foram mantidos vivos por sete dias. Esta dose tem sido reportada como promotora da depleção quase completa das células dopaminérgicas nigroestriatais em estudos prévios (SONSALLA et al., 1986; SUNDSTRÖM et al., 1987) e suficiente para provocar alterações cardíacas

(TAKATSU et al., 1999; REN et al., 2004 e AMINO et al., 2008). Os animais do grupo controle “sham” (grupo II) receberam solução salina (0,9%), na mesma dose e com a mesma periodicidade do grupo tratado com MPTP (grupo I) também por via i.p. Tanto os animais tratados como aqueles do grupo controle foram eutanasiados no sétimo dia.

4.2.2 Teste comportamental

Para avaliar a atividade locomotora espontânea foi realizado nos animais do estudo piloto o teste de campo aberto, cujo protocolo baseou-se no trabalho de Glynn et al. (2003), porém com algumas modificações. Cada animal foi avaliado por cinco minutos e os seguintes parâmetros foram investigados: locomoção periférica, locomoção central e ato de levantar. Para evitar possíveis alterações no resultado, os animais foram avaliados no mesmo horário, no mesmo ambiente e a caixa era higienizada com álcool 70% antes da avaliação de cada animal.

O teste foi aplicado nos três grupos. O teste foi realizado no sétimo dia após a última aplicação da droga nos grupos controle e agudo e no grupo crônico foi realizado no 20º dia após a última aplicação da droga. Os resultados para a locomoção central e para a locomoção periférica foram obtidos contando-se o número de vezes que os animais cruzaram as linhas das arenas do círculo externo e do círculo interno. Para o parâmetro levantar, foi contado o número de vezes em que os animais apoiaram apenas nos membros pélvicos.

4.2.3 Eutanásia

Os animais foram eutanasiados com uma sobredose de pentobarbital sódico (120 mg/kg/IP) no sétimo dia após a última aplicação da neurotoxina e solução salina.

Após a constatação do óbito dos animais, a cavidade torácica foi aberta e a aorta cranial canalizada a partir de uma abertura pontual mínima do ventrículo esquerdo. O sistema foi lavado inicialmente com uma solução contendo tampão fosfato salino (PBS) (0.1M, pH 7.4), nitrito de sódio 0.1% e heparina 2%. Para que o sistema fosse lavado adequadamente, uma pequena abertura foi feita na aurícula direita para permitir o extravasamento de líquido.

A seguir, a solução fixadora composta por 4% formoldeído em tampão fosfato de sódio (PBS) (0.1M, pH 7.4) foi perfundida sistemicamente (via aorta cranial) utilizando-se uma bomba perfusora digital (Masterflex ®) sob um fluxo pulsátil de 8ml/min. Para promover uma melhor fixação cardíaca, uma perfusão retrógrada foi realizada a partir da aorta cranial. Os corações foram então removidos dos animais e imersos na mesma solução fixadora e armazenados a temperatura de 4°C por no mínimo 72 horas.

4.2.4 Estudo morfoquantitativo (estereológico) do coração

O estudo morfoquantitativo (estereológico) do coração foi dividido nos seguintes itens: volume do ventrículo esquerdo, amostragem do VE e microestrutura quantitativa do coração seguindo a ordem de procedimentos realizados no coração.

4.2.4.1 Volume do ventrículo esquerdo (VE)

O volume do VE foi obtido pelo princípio de Cavalieri. O VE foi seccionado seriadamente em fatias de 1 mm de espessura. Sobre estas fatias foi sobreposto um sistema de pontos. Em cada fatia foi contado o número de pontos que tocavam a parede do ventrículo esquerdo e o lúmen (Figura 1). Para se obter o volume da parede do VE e do lúmen, a partir do princípio de Cavalieri, foram aplicadas as seguintes fórmulas:

$$V(P): \Sigma pp \times a(p) \times t$$

$$V(L): \Sigma pl \times a(p) \times t$$

Onde:

$V(P)$: volume da parede do ventrículo esquerdo.

Σpp : somatório de pontos que tocaram a parede do VE.

$a(p)$: área por ponto: $0,518 \text{ mm}^2$ (para a parede do VE).

t : espessura do corte: 1 mm.

$V(L)$: volume do lúmen.

Σpl : somatório de pontos que tocaram o lúmen.

$a(p)$: área por ponto: $0,038 \text{ mm}^2$ (para o lúmen).

t : espessura do corte: 1 mm.

O Volume do VE foi obtido somando-se $V(P)$ e $V(L)$. O coeficiente de erro do princípio de Cavalieri foi estimado de acordo com Gundersen et al. (1999).

Figura 1 - Fatias do VE de camundongo. Sistema de pontos utilizado para a estimativa do volume da parede do VE **(A)** e lúmen **(B)** para determinar o volume do VE a partir do princípio de Cavalieri. Escala de barra: 2mm

4.2.4.2 Amostragem do VE

A amostragem do VE foi baseada no princípio do “smooth fractionator” (GUNDERSEN, 2002). Posteriormente à contagem de pontos para a estimativa do

volume pelo princípio de Cavalieri, as fatias foram seccionadas em fragmentos de diferentes tamanhos e organizadas em ordem crescente de tamanho seguindo o design do “smooth fractionator” (Figura 2). Os fragmentos de tecido foram distribuídos em quatro conjuntos. Esta distribuição baseou-se na amostragem sistemática, uniforme e aleatória (SURS) e seguindo uma fração de $\frac{1}{4}$.

O primeiro conjunto de fragmentos de tecido foi destinado para se estimar o número total de núcleos de cardiomiócitos. O segundo conjunto foi embebido em parafina para estimar o número médio de núcleos de cardiomiócitos por célula. O terceiro e o quarto conjunto foram mantidos armazenados. Para criar uma orientação isotrópica, os fragmentos foram embebidos em ágar e isotropizada em “i-sectors” (NYENGAARD; GUNDERSEN, 1992).

Figura 2 - Amostragem do VE. Coração (A) a partir do qual foi isolado o VE. Fatias do VE (B) obtidas com o uso do "tissue slicer" (C). Fragmentos de diferentes tamanhos do VE (D). Fragmentos do VE organizados em ordem crescente de tamanho de acordo com o princípio do "smooth fractionator" (E)

4.2.4.3 Microestrutura quantitativa do coração

A microestrutura quantitativa do coração foi separada em: número total de núcleos de cardiomiócitos, número médio de núcleos de cardiomiócitos, número total de cardiomiócitos, volume total das fibras musculares cardíacas e volume total do interstício cardíaco.

4.2.4.3.1 Número total de núcleos de cardiomiócitos (N_n)

Para a estimativa do número total de núcleos de cardiomiócitos foi usado o princípio do fractionator óptico. Este método consiste em multiplicar o número de núcleos amostrados (Q^-) pelo inverso das sucessivas frações de amostragem do VE, ou seja, blocos de tecido (F1), secções histológicas (F2), área de contagem (F4) e altura de contagem (F5). A partir do primeiro conjunto de fragmentos foram realizados cortes com 40 μm de espessura em criostato e corados com cresil violeta. As secções foram amostradas seguindo uma fração (1/24) e de acordo com o princípio SURS. A contagem de núcleos de cardiomiócitos foi realizada utilizando-se o software estereológico CAST (versão 3.4.1.0). Seguindo o mesmo princípio SURS, os núcleos de cardiomiócitos foram amostrados nos disectors ópticos. Conforme se aprofundava no eixo z, aqueles núcleos que estavam dentro ou que tocavam a linha de inclusão da “frame” de contagem eram contados (Figura 3). A fração da área de contagem foi obtida dividindo-se a área da “frame” de contagem, cuja área foi de 1600 μm^2 , pelo deslocamento em μm da “frame” no eixo x e no eixo y (375,16 μm no eixo x e 375,16 μm no eixo y). A fração da altura de contagem foi estimada dividindo-se a altura do disector (10 μm para o grupo controle e 15 μm para o grupo MPTP) pela espessura média total das secções (40 μm). O coeficiente de erro da estimativa do número total de núcleos de cardiomiócitos ($CE(N)$) foi estimado conforme Gundersen et al. (1999).

Figura 3 - Fotomicrografia do VE mostrando a “frame” de contagem. A linha verde é de inclusão e a vermelha de exclusão. Os núcleos de cardiomiócitos (A) que estavam dentro da “frame” ou que tocavam a linha verde foram contados. Coloração: cresil violeta. Escala de barra: 10µm

4.2.4.3.2 Número médio de núcleos de cardiomiócitos por célula

Para a estimativa do número médio de cardiomiócitos por célula foi necessário definir os limites dos cardiomiócitos. Para tanto, a reação de imunohistoquímica usando-se dois anticorpos foi aplicada em secções sequenciais e isotropizadas do ventrículo esquerdo.

Para a isotropização, os fragmentos de VE foram embebidos em isectors (NYENGAARD; GUNDERSEN, 1992). Os fragmentos de tecido foram colocados dentro de um molde de silicone cuja cavidade foi preenchida com ágar a 10% (Figura 4). Os isectors foram lançados em uma superfície plana antes de serem embedidos na parafina. Cortes sequenciais de 2µm de espessura foram realizados.

Figura 4 - Isector contendo fragmento de VE embebido em ágar (A,B)

Para a visualização do disco intercalar foi usado o anticorpo policlonal de coelho contra pan-caderina (H-300, Santa Cruz Biotechnology, California, USA) e para a visualização das membranas do cardiomiócito foi usado o anticorpo policlonal de coelho contra distrofina (Abcam, Cambridge, UK). Em uma descrição breve, as secções foram desparafinizadas com xilol e em série decrescente de etanol e posteriormente submetidas ao processo de desmascaramento antigênico. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 0,3% por 30 minutos. Em seguida, foram incubadas em soro normal caprino a 10% também por 30 minutos. Os anticorpos foram incubados separadamente overnight a temperatura ambiente. O primeiro anticorpo incubado foi a pan-caderina (1:500) e o segundo anticorpo a distrofina (1:200). A seguir, foram incubadas em anticorpo secundário IgG caprino anti-coelho (1:200) conjugado com HRP por uma hora e trinta minutos. O controle negativo da reação foi conduzido omitindo-se o anticorpo primário e mantendo-se o anticorpo secundário. O complexo peroxidase foi visualizado com incubação em 3,3-diaminobenzidina tetraclorada (DAB) (Figura 5).

Figura 5 - Imunomarcção para pan-caderina e distrofina (A). Controle negativo da reação (B). Escala de barra: 10 μ m

4.2.4.3.3 Número total de cardiomiócitos (Nc)

O número total de cardiomiócitos foi obtido dividindo-se o número total de núcleos de cardiomiócitos pelo número médio de núcleos por cardiomiócito, o qual foi obtido por seqüenciamento de uma mesma célula marcada por imunohistoquímica. O número médio de núcleos por cardiomiócito foi de 1,88 para o grupo controle e 2,03 para o grupo MPTP.

4.2.4.3.4 Densidade de volume das fibras musculares cardíacas e do interstício cardíaco (V_v)

Para determinar o V_v (FMC) e V_v (IC) as secções foram seleccionadas de acordo com o princípio de amostragem SURS. Diante das secções seleccionadas, um sistema de pontos eqüidistantes, gerado pelo software estereológico CAST (versão 3.4.1.0) foi sobreposto aleatoriamente à imagem das secções. Os pontos que tocavam as FMC foram contados bem como os pontos que tocavam o IC. A fórmula usada para o cálculo de V_v foi:

$$V_v(\text{FMC}) := \sum p(\text{FMC}) / \sum p(\text{P})$$

$$V_v(\text{IC}) := \sum p(\text{IC}) / \sum p(\text{P})$$

Onde:

$\sum p(\text{FMC})$: somatório de pontos que tocaram a fibra muscular cardíaca.

$\sum p(\text{IC})$: somatório de pontos que tocaram o interstício cardíaco.

$\sum p(\text{P})$: somatório de pontos que tocaram todos os estratos da parede do ventrículo esquerdo.

O CE foi calculado de acordo com Gundersen et al. (1999) e Nyengaard (1999). O CE para o grupo controle e MPTP foi respectivamente 0,09 para FMC e 0,11 para IC.

4.2.4.3.5 Volume total de fibras musculares cardíacas ($V(\text{FMC})$)

O Volume total de fibras musculares cardíacas foi calculado multiplicando-se o V_v (FMC) pelo volume da parede do ventrículo esquerdo ($V(\text{P})$).

$$V(\text{FMC}) := V_v(\text{FMC}) \times V(P)$$

4.2.4.3.6 Volume total do interstício cardíaco ($V(\text{IC})$)

O volume total do interstício cardíaco foi calculado multiplicando-se o $V_v(\text{IC})$ pelo volume da parede do ventrículo esquerdo ($V(P)$).

$$V(\text{IC}) := V_v(\text{IC}) \times V(P)$$

4.2.5 Análise estatística

Para a análise estatística foi aplicado o “2-sample T-test” e “GLM-ANOVA”, realizada no software MINITAB 15 (2007). Diferenças entre grupos foram consideradas significativas quando ($p < 0,05$). Os seguintes testes de comparação múltipla foram aplicados: Tukey, Sidak, Fisher e Bonferroni.

Os resultados são expressos pela média seguida pelo coeficiente de variação (CV) calculado pela razão entre o desvio padrão e a média.

5 RESULTADOS

Os resultados foram divididos em estudo piloto e estudo propriamente dito.

5.1 ESTUDO PILOTO

Os resultados do estudo piloto são apresentados a seguir.

5.1.1 Teste comportamental

No teste de campo aberto, para o parâmetro locomoção periférica, o número médio de vezes que os animais dos grupos controle, agudo e crônico cruzaram a linha periférica foi respectivamente 67,5 (2,35), 84 (3,35) e 96 (7,57). Não foi detectada diferença estatística significativa ($p=0,21$) (Tabela 1). Para o parâmetro locomoção central, o número médio de vezes que os animais dos três grupos cruzaram a linha central foi respectivamente 8,25 (2,76), 12,8 (2,85) e 11 (1,71). Para este parâmetro também não foi observada diferença estatística significativa ($p=0,42$). A frequência para ambos os parâmetros foi demonstrada na figura 6.

Para o parâmetro ato de levantar, o número médio de vezes que os animais dos três grupos experimentais executaram este movimento foi respectivamente 30,5 (2,36), 35,4 (6,33) e 41,6 (5,86) (Tabela 2). Não foi observada diferença estatística significativa para este parâmetro ($p=0,21$). A sua frequência foi registrada na figura 7.

Número de cruzamentos (crossing)	Controle	Agudo	Crônico	p
Locomoção periférica	67,5(2,35) ^a	84 (3,35) ^a	96 (7,57) ^a	0,21
Locomoção central	8,25 (2,76) ^b	12,8 (2,85) ^b	11 (1,71) ^b	0,42

Tabela 1 - Número de cruzamentos: número médio de vezes em que os animais cruzaram linhas referentes à região periférica e central do campo aberto (média, CV). A diferença entre os grupos não foi significativa

Figura 6 - Frequência dos cruzamentos dos animais nas linhas referente à região central (A) e à região periférica (B) do campo aberto para os três grupos

Ato de Levantar	Controle	Agudo	Crônico	p
	30,5 (2,36) ^a	35,4 (6,33) ^a	41,6 (5,86) ^a	0,21

Tabela 2 - Levantar: número médio de vezes em que os animais permeceram apoiados com os membros pélvicos (média, CV). A diferença entre os grupos não foi significativa

Figura 7 - Frequência com que os animais ficaram apoiados nos os membros pélvicos

5.2 ESTUDO PROPRIAMENTE DITO

Os resultados do estudo propriamente dito são descritos como se segue.

5.2.1 Volumes do ventrículo esquerdo - V(VE)

O volume da parede do VE foi para o grupo controle e tratado com MPTP respectivamente 73,25 mm³ (0,05) e 73,87 mm³ (0,09). A diferença entre os grupos não foi estatisticamente significativa ($p=0,864$). O volume do lúmen foi para o grupo controle 13,58 mm³ (0,49) e para o grupo MPTP 12,15 mm³ (0,22). Essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,674$). O volume do VE, calculado a partir do princípio de Cavalieri, foi para o grupo controle de 86,83 mm³ (0,09) e para o grupo MPTP, 86,02 mm³ (0,10). A diferença de volume do VE entre os animais controle e tratados com a neurotoxina não foi estatisticamente significativa ($p=0,879$) (Figura 8) (Figura.14).

Figura 8 - Volumes da parede do ventrículo (V(P), do lúmen (V(L) e do ventrículo esquerdo (V(VE) estimados pelo princípio de Cavalieri. A diferença entre os grupos para o V(P) não foi estatisticamente significativa ($p=0,864$). Para o volume do lúmen não foi detectada diferença estatística entre os grupos ($p=0,674$) e para o volume de VE também não foi detectada diferença estatística ($p=0,879$). Os triângulos representam os valores individuais e a barra horizontal a média

5.2.2 Número total de núcleos de cardiomiócitos (Nn)

O número total de núcleos de cardiomiócitos foi para o grupo controle e para o grupo que recebeu o MPTP respectivamente $10,67 \times 10^6$ (0,31) e $9,30 \times 10^6$ (0,44). Não foi detectada diferença estatística significativa entre os grupos para o Nn ($p=0,571$) (Figura. 9). O CE (Nn) foi 0,06 para o grupo controle e 0,05 para o grupo MPTP.

Figura 9 - Número total de núcleos de cardiomiócitos no VE (Nn). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos para o Nn ($p=0,571$). Os triângulos representam os valores individuais e a barra horizontal a média

5.2.3 Número total de cardiomiócitos (Nc)

O número total de cardiomiócitos foi para o grupo controle e MPTP respectivamente, $5,67 \times 10^6$ (0,31) e $4,57 \times 10^6$ (0,44). Diferença entre grupos foi significativa ($p=0,0319$) (Figura.10). O CE (Nc) foi 0,06 para o grupo controle e 0,05 para o grupo MPTP.

Figura 10 - Número total de cardiomiócitos no VE (Nc). Houve diferença estatística significativa entre os grupos para o Nc ($p=0,0319$). Os triângulos representam os valores individuais e a barra horizontal a média

5.2.4 Densidade de volume da fibra muscular cardíaca (FMC) e do interstício cardíaco (IC)

A densidade de volume da FMC para o grupo controle foi de 0,59 (0,10) e para o grupo MPTP foi de 0,58 (0,15). Para IC, a densidade de volume foi de 0,41 (0,14) para o grupo controle e para o grupo MPTP foi de 0,42 (0,23). Não houve diferença estatística significativa entre os grupos para FMC ($p= 0,786$) e para IC ($p=0,786$) (Figura 11) (Figura 12).

Figura 11 - Densidade de volume das fibras musculares cardíacas (FMC) e do interstício cardíaco (IC) para o grupo controle e MPTP. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos para FMC ($p=0,786$) e para IC ($p=0,786$). Os triângulos representam os valores individuais e a barra horizontal a média

Figura 12 - Densidade de volume em valores percentuais de FMC e IC para os grupos controle e MPTP

5.2.5 Volume total de fibra muscular cardíaca e volume total do interstício cardíaco

O volume total de fibra muscular cardíaca foi para o grupo controle 43,17 mm³ (0,12) e 42,20 mm³ (0,12) para o grupo MPTP. O volume total de IC para o grupo controle foi de 30,07 mm³ (0,14) e 31,70 mm³ (0,26) para o grupo MPTP. Não foi encontrada diferença estatística significativa entre o grupo controle e MPTP para volume total de FMC ($p=0,773$) e para volume total de IC ($p=0,723$) (Figura 13) (Figura 14).

Figura 13 - Volume total de FMC e IC para os grupos controle e MPTP. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos para volume total de FMC ($p=0,773$) e para IC ($p=0,723$). Os triângulos representam os valores individuais e a barra horizontal a média

Figura 14 - Comparação entre os volumes do miocárdio para os grupos controle e MPTP. Volume do ventrículo esquerdo (V(VE), volume do lúmen (V(L), volume da parede do ventrículo esquerdo (V(P), volume total da fibra muscular cardíaca (V(FMC) e volume total do interstício cardíaco (V(IC)

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A discussão foi separada nos seguintes tópicos: padronização do protocolo de indução, MPTP e a quantificação tridimensional estereológica e estudo morfoquantitativo do miocárdio.

6.1 PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO DE INDUÇÃO

De acordo com trabalhos de Sonsalla e Heikkila (1986); Przedborski et al. (2001); Emborg (2004) e Luchtman et al. (2009) os efeitos do MPTP variam de acordo com a linhagem do camundongo, sexo, idade, dose e intervalos de aplicação. A linhagem mais susceptível de acordo com Sonsalla e Heikkila (1986); Sundström et al. (1987) e Muthane et al. (1994) é a C57/BL, sendo os camundongos machos com idade entre 8 a 10 semanas os são mais susceptíveis (PRZEDBORSKI et al., 2001; EMBORG, 2004). Dois esquemas de aplicação da droga têm sido adotados em camundongos: o agudo e o crônico (EMBORG, 2004). Ambos causam a redução de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais bem como a diminuição dos níveis de dopamina (SONSALLA; HEIKKILA, 1986; LUCHTMAN et al., 2009). O modelo agudo induz a perda de neurônio nigral principalmente pelos mecanismos de necrose celular, apresenta um índice maior de mortalidade e testes comportamentais podem ser detectados com testes específicos. O modelo crônico induz a morte celular principalmente pela apoptose e quase não se detecta alteração comportamental (EMBORG, 2004).

Em nosso estudo piloto testamos os dois modelos de indução, o agudo e o crônico. O protocolo usado para o modelo agudo baseou-se nos resultados do trabalho de Haobam et al. (2005). Neste estudo foram comparadas diferentes doses de aplicação de MPTP (10, 20 e 30 mg/kg, duas aplicações com 16 horas de intervalo) em duas linhagens de camundongos, a Swiss e a C57/BL. Foi demonstrado que os camundongos C57/BL que receberam a dose total de 60mg/kg tiveram uma redução maior no nível de dopamina estriatal, cerca de 67%, bem como um rendimento menor no teste comportamental quando comparado com as outras

duas doses e com os camundongos Swiss. Na tentativa de reproduzir uma degeneração progressiva e contínua dos neurônios dopaminérgicos, como ocorre na DP, utilizamos o modelo crônico cujo protocolo de aplicação (4 mg/kg, aplicações únicas por 20 dias) foi baseado no estudo de Bezard et al. (1997).

No nosso estudo piloto não encontramos diferenças no teste comportamental para ambos os modelos e embora tenha sido reportada na literatura perda neuronal nigroestriatal e redução do nível de dopamina para estes protocolos, não foi relatada alteração cardíaca. Assim, como os modelos usados no estudo piloto não satisfaziam este propósito, buscamos um protocolo de indução que resultasse também em comprometimento cardíaco.

Na literatura, os trabalhos que investigaram o modelo químico com uso de MPTP e as conseqüências no coração utilizaram o modelo agudo com aplicação da dose de 30 a 50mg/kg (2 vezes) com intervalos de 12 a 16 horas (TAKATSU et al., 1999, 2001; REN et al., 2004; AMINO et al., 2008). Para definir qual seria a dose e a periodicidade de aplicação do MPTP a ser utilizada, de fato, neste projeto nos baseamos no trabalho de Takatsu et al. (1999). Neste estudo, em que o autor mimetizou a fase pré-motora da DP, foram utilizadas três doses diferentes: 5mg/kg (aplicação única), 5mg/kg (2 aplicações) e 50 mg/kg (2 aplicações) ambas as doses com intervalos de aplicação de 16 horas. Como resultado, observou-se que no grupo que recebeu 50mg/kg (2 aplicações com intervalo de 16 horas) houve uma maior redução do 123-I-MIBG, um análogo da norepinefrina, indicando um maior dano cardíaco. Diante desta constatação, resolvemos selecionar este protocolo de indução.

6.2 MPTP E A QUANTIFICAÇÃO TRIDIMENSIONAL ESTEREOLÓGICA

Em camundongos da linhagem C57/BL, o MPTP causa seletiva degeneração dos neurônios dopaminérgicos (SONSALLA; HEIKKILA, 1986; SUNDSTRÖM et al., 1987) e a administração de agentes de imagiologia simpatoneuronal como o I-MIBG (TAKATSU et al., 2000; FUKUMITSU et al., 2006) e 6-[18^F] fluorodopamina (GOLDSTEIN et al., 2000) e eletrofisiológicos, bioquímicos e moleculares (REN et al., 2004) comprovam o comprometimento da disfunção cardíaca, similar ao que

ocorre em pacientes humanos. No entanto, são nulos ou quase escassos os trabalhos que aplicam a quantificação tridimensional em modelos animais e mesmo em pacientes humanos para o estudo cardíaco na doença de Parkinson, restringindo-se apenas ao sistema nervoso central, em particular aos neurônios da substância negra (MA et al., 1997; CABELLO et al., 2000) e do neocórtex (PEDERSEN et al., 2005). A estereologia, contudo, tem sido amplamente utilizada para a quantificação das estruturas cardíacas e de sua inervação (WULFSON et al., 2004; BRÜEL et al., 2005, 2007; BRÜEL; NYENGAARD, 2005; TANG et al., 2009; CAVALCANTI et al., 2009; MÜHLFELD et al., 2009). Ao que tudo nos indica, este trabalho é pioneiro no uso do delineamento estereológico tridimensional para investigar as consequências do MPTP no miocárdio de camundongos.

Os parâmetros estimados com o uso da estereologia estão fortemente vinculados aos princípios de amostragem estatística. Assim, a tendenciosidade e o erro são uma consequência direta da amostragem (GUNDERSEN, 2002). Para minimizar o erro e promover a aleatoriedade foi escolhido como método de amostragem neste trabalho o “smooth fractionator” que até o momento, segundo Gundersen (2002), é provavelmente a estratégia de amostragem mais eficiente na Estereologia.

O Princípio do fractionator é uma maneira elegante e direta de amostragem para a quantificação, o qual elimina os potenciais erros devido à retração durante o procedimento e embebição do tecido (GUNDERSEN, 1986; MÜHLFELD et al., 2009). O fractionator óptico usado neste trabalho permitiu estimar o número de núcleos de cardiomiócitos sem a necessidade de se conhecer o volume referência e a densidade numérica de núcleos de cardiomiócitos como foi realizado nos trabalhos de Wulfsohn et al. (2004); Brüel e Nyengaard (2005) e Tang et al. (2009).

6.3 ESTUDO MORFOQUANTITATIVO DO MIOCÁRDIO

O estudo morfoquantitativo está discutido a seguir conforme itens abaixo:

6.3.1 Volume do ventrículo esquerdo

O método de Cavalieri apesar de demandar um tempo maior para a sua execução tem sido reportado como sendo um método eficiente e acurado (GUNDERSEN; JENSEN, 1987; GUNDERSEN et al., 1988; GRAVES; DOMMETT, 2000; YAN et al., 2003; VAN VRÉ et al., 2007) e o mais indicado para estimar o volume de órgãos cavitários, apesar de na literatura ter sido encontrado trabalhos que determinam o peso do coração ou de seus compartimentos utilizando-se o método de Scherle (ÁGUILA et al., 1998; MEDEIROS et al., 2005). O método de Scherle consiste em determinar o peso de um órgão ou fragmento pela imersão (SCHERLE, 1970).

Nesse trabalho em particular, além do volume do VE, pudemos determinar o volume de outros dois componentes do ventrículo cardíaco, a parede ventricular e o lúmen, o que nos permitiu obter mais informações e tecer possíveis conclusões sobre as conseqüências do MPTP sobre o VE ao nível macroscópico. Neste estudo, embora não foi constatada diferença estatística significativa para os volumes do VE, parede e lúmen, verificou-se que o grupo controle apresentou um volume de VE 0,9% maior do que o grupo MPTP. O volume do lúmen apresentou-se 11,7% maior no grupo controle do que no grupo MPTP e o volume da parede foi 0,8% maior no grupo MPTP do que no grupo controle. Apesar de o grupo MPTP ter apresentado um volume maior de parede quando comparado ao grupo controle, o seu volume de VE foi menor. Isso nos leva a crer que houve um processo de espessamento da parede neste grupo, mesmo que muito pequeno, que pode ser devido a uma hipertrofia ou hiperplasia de um ou de vários tipos celulares da parede do VE. Como o volume de VE foi estimado somando-se o VL e o VP, este fenômeno implicou na redução do espaço luminal, ou seja, na redução de VL o que refletiu em um volume menor de VE no grupo MPTP (Figura 12).

6.3.2 Densidade de volume e volume total das fibras musculares cardíacas (FMC) e do interstício cardíaco (IC)

Verificamos que a densidade de volume da FMC foi 1,7% maior no grupo controle. Para IC, a densidade de volume foi 2,4% maior para o grupo MPTP. O volume total de FMC foi 2,3% maior no grupo controle e o volume de IC foi 5,3% maior no grupo MPTP. Apesar destes parâmetros não apresentarem diferenças estatísticas significativa, sugere-se que no grupo MPTP o espaço ocupado antes por fibras musculares foi substituído por outros tipos celulares do IC. Neste estudo estimamos o volume total do IC e não individualizando os seus tipos celulares. Segundo Espira e Czubyrt (2009) a matriz extracelular está longe de ser apenas um suporte estrutural do coração, atualmente é reconhecida por ter um papel importante no desenvolvimento, na morfologia e na sinalização celular do coração. É uma rede que está ao redor e serve como suporte aos constituintes celulares do miocárdio incluindo os miócitos, fibroblastos e células endoteliais e células musculares lisas. O fibroblasto intersticial tem sido reconhecido como o tipo celular responsável por produzir e modificar a matriz extracelular do miocárdio. É fato que outras atividades dos fibroblastos podem afetar significativamente o desenvolvimento, a função e a patologia cardíaca (BAUDINO et al., 2006; PORTER; TURNER, 2009).

O coração está sujeito a uma grande variedade de demanda fisiológica o que pode resultar em um dramático efeito na estrutura e função cardíaca indicando que a interação célula-matriz está alterada o que contribui para fibroses patológicas e insuficiência cardíaca (ESPIRA; CZUBRYT, 2009). Uma das causas mais comuns de insuficiência e remodelamento cardíaco é o infarto do miocárdio. Uma seqüência de eventos ocorre resultando em hipertrofia e perda de miócitos, fibrose reativa e reparadora do interstício cardíaco, dilatação e alteração da forma ventricular. Estas alterações são progressivas e resultam em disfunção sistólica e diastólica (REMME, 2003). A perda da musculatura ventricular durante o infarto do miocárdio e a subsequente alteração da arquitetura envolvendo tanto o miocárdio infartado como o não infartado contribuem para a evolução da insuficiência cardíaca. A dilatação ventricular pode ser um mecanismo compensatório para manter o volume de ejeção depois da perda de tecido contrátil (VAN DEN BORNE et al., 2010).

6.3.3 Número total de núcleos de cardiomiócitos e número total de cardiomiócitos

Em nosso trabalho, o número total de núcleos de cardiomiócitos foi 14,8% menor no grupo MPTP do que no grupo controle e esta diferença foi de 19% para o número total de cardiomiócitos. A redução no número total de cardiomiócitos sem, contudo alterar o volume ventricular nos indica que há uma reação ou adaptação do tecido cardíaco à ação do agente agressor, o MPTP. Este mecanismo nos sugere que a reposição da perda dos cardiomiócitos ocorre pela proliferação de células do interstício cardíaco, indicando um processo de fibrose. A injúria provocada pelo MPTP, semelhante à injúria pós-isquêmica, inicia uma resposta inflamatória a qual envolve a degradação da matriz extracelular, inibição da proliferação tissular e liberação dos mediadores inflamatórios. Em seguida, inicia-se a fase da reparação em que há o aumento da síntese da matriz, proliferação de fibroblastos e liberação de promotores da fibrose (FRANTZ et al., 2009). Segundo Nadal-Ginard et al. (2003), a morte e a regeneração de cardiomiócitos são os maiores determinantes da homeostasia cardíaca e de alterações na anatomia e função ventricular em estados fisiológicos e patológicos. A perda de cardiomiócitos acompanhada pela diminuição da função do ventrículo esquerdo parece ser um importante componente da remodelação ventricular em diversos tipos de problemas cardíacos (KAJSTURA et al., 1995; OLIVETTI et al., 1997). Em ratos que desenvolveram espontaneamente hipertensão e apresentaram insuficiência cardíaca entre os 18 e 35 meses de idade nasceram com um número menor de cardiomiócitos ventriculares quando comparados aos ratos normotensivos. A hipertensão é um fator de risco para alterações patológicas cardíacas, incluindo a perda de cardiomiócitos e o aumento da fibrose (VAN DER LAARSE et al., 1987; DIEZ et al., 1998). Tem sido reportado que a sobrecarga de pressão e volume está associada com a ativação da formação de novos cardiomiócitos e a concomitante morte de cardiomiócitos pela apoptose e necrose, evidenciando que existe um ciclo celular dinâmico (NADAL-GINARD et al., 2003).

Brüel et al. (2002a) ao aplicar o hormônio de crescimento em ratos jovens e senis, constatou que o número de núcleos de cardiomiócitos aumentou no grupo jovem, mas não no grupo senil. Em ratos adultos, verificou um aumento de 25% no

número de núcleos de cardiomiócitos. (BRÜEL; OXLUND; NYENGAARD, 2002b). A proliferação de núcleos de cardiomiócitos e o acúmulo de tecido conjuntivo têm sido o maior determinante da remodelação ventricular em corações hipertróficos no processo de envelhecimento (OLIVETTI et al., 1994). Águila et al. (1998), no entanto, observou que no envelhecimento ocorre um perda de miócitos e uma hipertrofia das células remanescentes.

6.3.4 MPTP como modelo para o estudo morfoquantitativo do miocárdio

É fato que o MPTP causa desnervação simpática no coração de camundongos, como reportado nos trabalhos de Takatsu et al. (2000); Ren et al. (2004) e Amino et al. (2008). Que existe uma redução de 67% da expressão de receptores β -adrenérgicos na membrana do miocárdio e uma diminuição na resposta dos cardiomiócitos a norepinefrina, reportando que há uma disfunção cardíaca substancial que provavelmente se deve a uma redução à resposta adrenérgica (REN et al., 2004). Estudos da toxicidade do MPTP em camundongos sugerem a vulnerabilidade seletiva pela população de células monoaminas. Estas células apresentam transportadores que permitem a entrada do MPP⁺ no interior da célula. Assim, por meio desses transportadores, o MPP⁺ poderia ter acesso aos nervos simpáticos pós-ganglionares e destruí-los (TAKATSU et al., 2000). A ação tóxica do MPTP no coração parece não ser dependente da conversão do MPTP em MPP⁺ em camundongos. A ação direta de pequenas doses da droga exaure a norepinefrina cardíaca e não é prevenido por inibidores da enzima MAO-B como ocorre em células catecolaminérgicas no sistema nervoso central (FULLER et al., 1988).

Diversos estudos, conduzidos em pacientes humanos, também se referem a uma alteração da inervação simpática do coração do ponto de vista funcional e anatômico (GOLDSTEIN et al., 2000; LI et al., 2002; AMINO et al., 2005; GOLDSTEIN et al., 2005, ORIMO et al., 2008; GHEBREMEDHIN et al., 2009). No entanto, ao nosso conhecimento, na literatura não há trabalhos que investigaram morfoquantitativamente o miocárdio. Este trabalho investigou o miocárdio a partir de um modelo químico que mimetizou a fase pré-motora ou não motora da DP (TAKATSU et al., 2000), portanto, os resultados obtidos refletem este estágio da

doença. Não sabemos, no entanto, se em pacientes humanos portadores da doença de Parkinson, principalmente na fase pré-motora, em que são observados os primeiros sinais de comprometimento cardíaco (PROBST et al., 2008; POEWE; MAHLKNECHT, 2009), existe de fato alguma alteração morfoquantitativa do miocárdio ou se estas se tornam mais severas e críticas com a evolução da doença. Portanto, estudos que avaliem o miocárdio de pacientes humanos sob o enfoque quantitativo tridimensional seriam de grande contribuição para a investigação da cardiomiopatia secundária a DP. Estes resultados aliados ao reconhecimento das manifestações pré-motoras permitiriam um diagnóstico precoce da DP e promoveriam ajustes terapêuticos para a melhoria na qualidade de vida desses indivíduos.

JUSTIFICATIVA

7 JUSTIFICATIVA PARA AS MUDANÇAS DOS OBJETIVOS INICIAIS DO PROJETO

No período de julho de 2008 a maio de 2009 a doutoranda (Tais Harumi de Castro Sasahara) realizou doutorado sandwich financiado pela Capes no Brain Repair Centre na Universidade de Cambridge (UK).

Neste, a doutoranda trabalhou com camundongos transgênicos que são o modelo genético da Doença de Parkinson, uma vez que expressam a proteína alfa-sinucleína humana truncada 1-120. Nestes animais, a aluna estudou a inervação simpática extrínseca e intrínseca, bem como a detecção da proteína alfa-sinucleína. Para tanto, a doutoranda aprendeu técnicas de imunohistoquímica e de western blot.

No tocante à inervação extrínseca foram quantificados os neurônios positivos para a tirosina hidroxilase e alfa-sinucleína do gânglio estrelado. Na inervação intrínseca, um estudo qualitativo foi realizado para investigar os neurônios intrínsecos cardíacos positivos para tirosina hidroxilase (TH) e alfa-sinucleína.

A distribuição das fibras cardíacas positivas para tirosina hidroxilase também foi avaliada, bem como a extração de proteína total dos ventrículos e átrios para aplicação da técnica de western blot.

Estes dados obtidos nos animais transgênicos de Cambridge não foram incluídos nesta tese, pois, por questões éticas, estes resultados pertencem ao grupo de pesquisa do Brain Repair Centre.

Durante este período de estágio, a doutoranda pôde conhecer a rotina de um centro de pesquisa voltado para a investigação e estudo da neurociência, em especial as doenças neurodegenerativas.

Tendo em vista esta interrupção para o estágio sandwich, após a volta da aluna ao Brasil em Maio de 2009, a aluna tinha apenas 12 meses para finalizar sua tese de doutorado nos país. Desta forma, a aluna concentrou suas atividades nos efeitos da neurotoxina MPTP na estrutura do miocárdio de camundongos, constituindo este um do modelo químico importante para a doença de Parkinson. Ao focar o estudo neste novo rationale, a aluna obteve resultados morfológicos inéditos que merecem ser publicados rapidamente, os quais adicionam ao nosso entendimento sobre a morfopatogênese da forma cardíaca da doença de Parkinson.

CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

De acordo com os métodos empregados (indução com MPTP e delinamento estereológico estocástico) e resultados obtidos pode-se concluir que:

- ❖ O MPTP induziu uma modificação importante da arquitetura do miocárdio quanto a:
 - Redução no número de cardiomiócitos.
- ❖ Outros parâmetros do VE que não foram no entanto alterados com a aplicação do MPTP:
 - Parede ventricular.
 - Lúmen ventricular.
 - Fibra muscular cardíaca.
 - Interstício cardíaco.
 - Número total de núcleos de cardiomiócitos.

REFERÊNCIAS

ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear population from microtomic sections. **Anatomical Record**. v. 94, p. 239, 1946.

ÁGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; APFEL, M.I.R. Estereologia do Miocárdio de Ratos Jovens e Idosos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 70, n. 2, p. 105-109, 1998.

ALAM, M.; SCHMIDT, W.J. Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. **Behavioural Brain Research**. v. 136, p. 317-324, 2002.

AMINO, T.; SATOSHI, O.; YOSHINORI, I.; ATSUSHI, T.; TOSHIKI, U.; HIDEHIRO, M. Profound cardiac sympathetic denervation occurs in Parkinson disease. **Brain Pathology**. v. 15, p. 29-34, 2005.

AMINO, T.; UCHIHARA, T.; TSUNEKAWA, H.; TAKAHATA, K.; SHIMAZU, S.; MIZUSAWA, H.; ORIMO, S. Myocardial nerve fibers are preserved in MPTP-treated mice, despite cardiac sympathetic dysfunction. **Neuroscience Research**, v. 60, p. 314-318, 2008.

BAUDINO TA, CARVER W, GILES W, BORG TK. Cardiac fibroblasts: Friend or foe? **American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, p. H1015–H1026, 2006.

BEZARD, E.; DOVERO, S.; BIOULAC, B.; GROSS, C. Effects of different schedules of MPTP administration on dopaminergic neurodegeneration in mice. **Experimental Neurology**, v. 148, p. 288–292, 1997.

BEAL, M. F. Experimental models of Parkinson's disease. **Nature Reviews-Neuroscience**, v. 2, p. 325-332, 2001.

BETARBET, R.; SHERER, T.B.; MACKENZIE, G.; GARCIA-OSUNA, M.; PANOV, A.V.; GREENAMYRE, J.T. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. **Nature Neuroscience**. v. 3, n. 12, p. 1301-6, 2000.

BRAAK, H.; BOHL, J .R.; MÜLLER, C. M.; RÜB, U.; DE VOS, R .A .I.; DEL TREDICI, K. Stanley Fahn Lecture 2005: The Staging Procedure for the Inclusion Body Pathology Associated with Sporadic Parkinson's Disease Reconsidered. **Movement Disorders**, v. 21, n. 12, p. 2042–2051, 2006.

BRÜEL, A.; CHRISTOFFERSEN, T. E. H.; NYENGAARD, J. R. Growth hormone increases the proliferation of existing cardiac myocytes and the total number of cardiac myocytes in the rat heart. **Cardiovascular Research**, v. 76, p. 400-408, 2007.

BRÜEL, A.; NYENGAARD, J. R. Design-based stereological estimation of the total number of cardiac myocytes in histological sections. **Basic Research in Cardiology**. v. 100, p. 311-319, 2005.

BRÜEL, A.; OXLUND, H.; NYENGAARD, J. R. Growth hormone increases the total number of cardiac myocyte nuclei in young rats but not in old rats. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 123, p. 1353–1362, 2002a.

BRÜEL, A.; OXLUND, H.; NYENGAARD J. R. Growth hormone increases the total number of myocyte nuclei in the left ventricle of adult rats. **Growth Hormone and IGF Research**, v. 12, n. 2, p. 106-15, 2002b.

CABELLO, C. R.; THUNE, J. J.; PAKKENBERG, H.; PAKKENBERG, B. Ageing of substantia nigra in humans: cell loss may be compensated by hypertrophy. **Neuropathology and Applied Neurobiology**. v. 28, p. 283-291, 2002.

CAVALCANTI, R. A.; DA PUREZA, D. Y.; DE MELO, M. P.; DE SOUZA, R R.; BERGAMASCHI, C. T.; DO AMARAL, S. L.; TANG, H.; LOESCH, A.; RIBEIRO A. A. Low-intensity treadmill exercise-related changes in the rat stellate ganglion neurons. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, n. 6, p. 1334-42, 2009.

CICCHETTI, F.; DROUIN-OUELLET, J.; GROSS, R. E. Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30 n. 9, 2009.

DE MEYER, G. R. Y.; MARTINET, W. Autophagy in the cardiovascular system. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1793, n. 9, p. 1485–1495, 2009.

DIEZ, J.; FORTUNO, M. A.; RAVASSA, S. Apoptosis in hypertensive heart disease. **Current Opinion in Cardiology**, v. 13, p. 317–325, 1998.

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

ESPIRA, L.; CZUBRYT, M. P. Emerging concepts in cardiac matrix biology. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 87, p. 996-1008, 2009.

FRANKLIN, K.; PAXINOS, G. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. San Diego , Academic Press: 1997.

FRANTZ, S.; BAUERSACHS, J.; ERTL, G. Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation, **Cardiovascular Research**, v. 81, p. 474-481, 2009.

FUKUMITSU, N.; SUZUKI, M.; FUKUDA, T.; KIYONO, Y.; KAJIYAMA, S.; SAJI, H. Reduced 125I-meta-iodobenzylguanidine uptake and norepinephrine transporter density in the hearts of mice with MPTP-induced parkinsonism. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 33, n. 1, p. 37-42, 2006.

GHEBREMEDHIN, E.; TREDICI, K.L.; LANGSTON, J.W.; BRAAK, H. Diminished tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the cardiac conduction system and myocardium in Parkinson's disease: an anatomical study. **Acta Neuropathologica**, v. 118, p. 777-784, 2009.

GLYNN, D.; BORTNICK, R. A.; MORTON, J. Complexin II is essential for normal neurological function in mice. **Human Molecular Genetics**, v. 12, n. 19, 2003.

GOLDSTEIN, D.; ELDADAH, B.A.; HOLMES, C.; PECHNIK, S.; MOAK, J.; SALEEM, A.; SHARABI, Y. Neurocirculatory abnormalities in Parkinson Disease with orthostatic hypotension independence from levodopa treatment. **Hypertension**, v. 46, p. 1333-1339, 2005.

GOLDSTEIN, D.; HOLMES, C.; LI, S. T.; BRUCE, S.; METMAN, L. V. Cardiac Sympathetic denervation in Parkinson disease. **Annals of Internal Medicine**, v. 133, p. 338-347, 2000.

GRAVES, M. J.; DOMMETT, D. M. F. Comparison of cardiac stroke volume measurement determined using stereological analysis of breath-hold cine MRI and phase contrast velocity mapping. **The British Journal of Radiology**, v. 73, p. 825-832, 2000.

GUNDERSEN, H. J.; BENDTSEN, T. F.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MOLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGAARD, J.R.; PAKKENBERG, B.; SORENSEN, F.B.; VESTERBY, A. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 96, p. 379–94, 1988.

GUNDERSEN, H. J.; JENSEN, E. B. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. **Journal of Microscopy**, v. 147, n. 3, p.229–63, 1987.

GUNDERSEN, H. J. G. The smooth fractionator. **Journal of Microscopy**, v. 207, p. 191-210, 2002.

GUNDERSEN, H. J. G.; JENSEN, E. B. V.; KIEU, K.; JENSEN, J. The efficiency of systematic sampling in stereology—reconsidered. **Journal of Microscopy**, v. 193, p. 199–211, 1999.

HAENSCH, C. A.; LERCH, H.; JÖRG, J. A.; ISENMANN, S. Cardiac denervation occurs independent of orthostatic hypotension and impaired heart rate variability in Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 15, p. 134-137, 2009.

HAOBAM, R.; SINDHU, K. M.; CHANDRA, G.; MOHANAKUMAR, K. P. Swim-test as a function of motor impairment in MPTP model of Parkinson's disease: A comparative study in two mouse strains. **Behavioural Brain Research**, v. 163, p. 159–167, 2005.

IDE, T.; TSUTSUI, H.; KINUGAWA, S.; UTSUMI, H.; KANG, D.; HATTORI, N.; UCHIDA, K.; ARIMURA, K.; EGASHIRA, K.; TAKESHITA, A. Mitochondrial Electron Transport Complex I Is a Potential Source of Oxygen Free Radicals in the Failing Myocardium. **Circulation Research**, v. 85, p. 357-363, 1999.

JACKSON-LEWIS, V.; PRZEDBORSKI, S. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Nature Protocols**, v. 2, n. 1, p. 141-151, 2007.

JAVITCH, J. A.; D'AMATO, R. J.; STRITTMATTER, S. M.; SNYDER, S. H. Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity, **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 82, n. 7, p. 2173-2177, 1985.

KAJSTURA, J.; ZHANG, X.; LIU, Y.; SZOKE, E.; CHENG, W.; OLIVETTI, G.; HINTZE, T. H.; ANVERSA, P. The cellular basis of pacing-induced dilated cardiomyopathy. Myocyte cell loss and myocyte cellular reactive hypertrophy. **Circulation**, v. 92, p. 2306–2317, 1995.

LEEUEWENBURGH, B. P. J.; HELBING, W. A.; WENINK, A. C. G.; STEENDIJK, P.; DEJONG, R.; DREEF, E. J.; GITTENBERGER-DE GROOT, A. C. G.; BAAN, J.; VAN DER LAARSE, A. Chronic right ventricular pressure overload results in a hyperplastic rather than a hypertrophic myocardial response. **Journal of Anatomy**, v. 212, p. 286-294, 2008.

LI, S. T.; DENDI, R.; HOLMES, C.; GOLDSTEIN, D. Progressive loss of cardiac sympathetic innervation in Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, v. 52, p. 220-223, 2002.

LUCHTMAN, D. W.; SHAO, D.; SONG, C. Behavior, neurotransmitters and inflammation in three regimens of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Physiology and Behavior**, n. 98, v. 1-2, p. 130-138, 2009.

MA, S. Y.; RÖYTTÄ, M.; RINNE, J. O.; COLLAN, Y.; RINNE, U. K. Correlation between neuromorphometry in the substantia nigra and clinical features in Parkinson's disease using disector counts. **Journal of Neurological Sciences**, v. 151, p. 83-87, 1997.

MAYER, R. A.; KINDT, M. V.; HEIKKILA, R. E. Prevention of the nigrostriatal toxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by inhibitors of 3,4-dihydroxyphenylethylamine transport. **Journal Neurochemistry**, v. 47, n. 4, p. 1073-1079, 1986.

METZ, G. A.; TSE, A.; BALLERMANN, M.; SMITH, L. K.; FOUAD, K. The unilateral 6-OHDA rat model of Parkinson's disease revisited: an electromyographic and behavioural analysis. **European Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 3, p. 735-744, 2005.

MÜHLFELD, C.; NYENGAARD, J. R.; MAYHEW, T. A review of state-of-the-art stereology for better quantitative 3D morphology in cardiac research. **Cardiovascular Pathology**, v. 19, n. 2, p. 65-82, 2010.

MUTHANE, U.; RAMSAY, K. A.; JIANG, H.; JACKSON-LEWIS, V.; DONALDSON, D.; FERNANDO, S.; FERREIRA, M.; PRZEDBORSKI, S. Differences in nigral neuron number and sensitivity to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57/bl and CD-1 mice. **Experimental Neurology**, v. 126, n. 2, p. 195-204, 1994.

NADAL-GINARD, B.; KAJSTURA, J.; LERI, A.; ANVERSA, P. Myocyte Death, Growth, and Regeneration in Cardiac Hypertrophy and Failure, **Circulation Research**, v. 92, p. 139-150, 2003.

NYENGAARD, J. R.; GUNDERSEN, H. The isector: a simple and direct method for generating isotropic, uniform, random sections from small specimens. **Journal of Microscopy**, v. 165, p. 427-431, 1992.

OLIVETTI, G.; ABBI, R.; QUAINI, F.; KAJSTURA, J.; CHENG, W.; NITAHARA, J. A.; QUAINI, E.; DI LORETO, C.; BELTRAMI, C. A.; KRAJEWSKI, S.; REED, J. C.; ANVERSA, P. Apoptosis in the failing human heart. **New England Journal of Medicine**, v. 336, p. 1131–1141, 1997.

OLIVETTI, G.; MELISSARI, M.; BALBI, T.; QUAINI, F.; SONNENBLICK, E. H.; ANVERSA, P. Myocyte nuclear and possible cellular hyperplasia contribute to ventricular remodeling in the hypertrophic senescent heart in humans **Journal of American College of Cardiology**, v. 24, p. 140-149, 1994.

ORIMO, S.; AMINO, T.; ITOH, Y.; TAKAHASHI, A.; KOJO, T.; UCHIHARA, T.; TSUCHIYA, K.; MORI, F.; WAKABAYASHI, K.; TAKAHASHI, H. Cardiac sympathetic denervation precedes neuronal loss in the sympathetic ganglia in Lewy body disease. **Acta Neuropathologica (Berl)**, v. 109, n. 6, p. 583-588, 2002.

PEDERSEN, K. M.; MARNER, L.; PAKKENBERG, H.; PAKKENBERG, B. No global loss of neocortical neurons in Parkinson's disease: a quantitative stereological study. **Movement Disorders**, v. 20, n. 2, p. 164-171, 2005.

POEWE, W.; MAHLKNECHT, P. The clinical progression of Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 15S, p. S28–S32, 2009.

PORTER, K. E.; TURNER, N. A. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 123, p. 255–278, 2009.

PROBST, A.; BLOCH, A.; TOLNAY, M. New insights into the pathology of Parkinson's disease: does the peripheral autonomic system become central? **European Journal of Neurology**, v. 15, n. 1, p. 1-4, 2008.

PRZEDBORSKI, S.; JACKSON-LEWIS, V.; NAINI, A. B.; JAKOWEC, M.; PETZINGER, G.; MILLER, R.; AKRAM, M. The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. **Journal of Neurochemistry**, v. 76, n. 5, p. 1265-1274, 2001.

REMME, W. J. Pharmacological Modulation of Cardiovascular Remodeling: A Guide to Heart Failure Therapy. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 17, p. 349–360, 2003.

REN, J.; PORTER, J. E.; WOLD, L. E.; ABERLE, N. S.; MURAKIKRISHNAN, D.; HASELTON, J. R. Depressed contractile function and adrenergic responsiveness of cardiac myocytes in an experimental model of Parkinson disease, the MPTP-treated mouse. **Neurobiology of Aging**, v. 25, p. 131-138, 2004.

SCHAPIRA, A. H. V. Progress in neuroprotection in Parkinson's disease. **European journal of Neurology**, v. 15, n. 1, p. 5-13, 2008.

SHIMOJI, M.; ZHANG, L.; MANDIR, A. S.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M.; Absence of inclusion body formation in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Molecular Brain Research**, v. 134, p. 103-108, 2005.

SINGLETON, A.; GWINN-HARDY, K.; SHARABI, Y.; LI, S. T.; HOLMES, C.; DENDI, R.; HARDY, J.; SINGLETON, A.; CRAWLEY, A.; GOLDSTEIN, D. S. Association between cardiac denervation and parkinsonism caused by a-synuclein gene triplication. **Brain**, v. 127, p. 768-772, 2004.

SMEYNE, R. J.; JACKSON-LEWIS, V. The MPTP model of Parkinson's disease. **Molecular Brain research**, v. 134, p. 57-66, 2005.

SONSALLA, P. K.; HEIKKILA, R. E. The influence of dose and dosing interval on MPTP- induced dopaminergic neurotoxicity in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 129, p. 339-345, 1986.

SPILLANTINI, M. G.; CROWTHER, R. A.; JAKES, R.; HASEGAWA, M.; GOEDERT, M. Alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 95, p. 6469-6473, 1998.

SUNDSTRÖM, E.; STRÖMBERG, I.; TSUTSUMI, T.; OLSON, L.; JONSSON, G. Studies on the effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydroxypyridine (MPTP) on central catecholamine neurons in C57 BL/6 mice: comparison with three other strains of mice. **Brain Research**, v. 405, p. 26-38, 1987.

TAKATSU, H.; NISHIDA, H.; MATSUO, H.; WATANABE, S.; NAGASHIMA, K.; WADA, H.; NODA, T.; NISHIGAKI, K.; FUJIWARA, H. Cardiac sympathetic denervation from the early stage of /Parkinson's disease: clinical and experimental studies with radiolabeled MIBG. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 41, p. 71-77, 2000.

TANG, Y.; NYENGAARD, J. R.; ANDERSEN, J. B.; BAANDRUP, U.; GUNDERSEN, H. J. The application of stereological methods for estimating structural parameters in the human heart. **Anatomical Record (Hoboken)**, v. 292, n. 10, p. 1630-1647, 2009.

TOFARIS, G. K.; REITBÖCK, P. G.; HUMBY, T.; LAMBOURNE, S. L.; O'CONNELL, M.; GHETTI, B.; GOSSAGE, H.; EMSON, P. C.; WILKINSON, L. W.; GOEDERT, M.; SPILLANTINI, M. G. Pathological changes in dopaminergic nerve cells of the substantia nigra and olfactory bulb in mice transgenic for truncated human α -synuclein(1–120): implications for lewy body disorders. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 15, p. 3942–3950, 2006.

TURGUT, M. Asymmetry of sympathetic activity in a rat model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine: haemodynamic, electrocardiographic and biochemical changes. **Research in Experimental Medicine**, v. 198, p. 281-292, 1998.

UVERSKY, V. N. Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. **Cell and Tissue Research**, v. 318, p. 225–241, 2004.

VAN DEN BORNE, S.W.M; DIEZ, J; BLANKESTEIJN, W.M; VERJANS, J; HOFSTRA, L; NARULA, J. Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts. **Nature Reviews Cardiology**, v. 7, p. 30–37, 2010.

VAN DER LAARSE, A.; BLOYS VAN TRESLONG, C. H.; VLIEGEN, H. W.; RICCIARDI, L. Relation between ventricular DNA content and number of myocytes and non myocytes in hearts of normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Cardiovascular Research**, v. 21, p. 223–229, 1987.

VAN VRÉ, E. A.; VAN BEUSEKOM; H. M.; VRINTS, C. J.; BOSMANS, J. M.; BULT, H.; VAN DER GIESSEN, W. J. Stereology: a simplified and more time-efficient method than planimetry for the quantitative analysis of vascular structures in different models of intimal thickening. **Cardiovascular Pathology**, v. 16, p. 43– 50, 2007.

VEDEL JENSEN, E. B.; GUNDERSEN, H. J. G. The rotator. **Journal of Microscopy**, v. 170, p. 35-44, 1993.

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

WULFSOHN, D.; NYENGAARD, J. R.; TANG, Y. Postnatal growth of cardiomyocytes in the left ventricle of the rat. **The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, v. 277, n. 1, p. 236-47, 2004.

YAN, X.; CARBAYO, J. J. P.; WEIBEL, E. R.; HSIA, C. C. W. Variation of lung volume after fixation when measured by immersion or Cavalieri method. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 284, p. L242–L245, 2003.