AMANDA LOPEZ MOREIRA

Efeitos do ácido 3-nitropropiónico (3-NP) na inervação extrínseca do coração de camundongos – modelo experimental para a doença de Huntington

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez

São Paulo
2017

AMANDA LOPEZ MOREIRA

Efeitos do ácido 3-nitropropiónico (3-NP) na inervação extrínseca do coração de camundongos – modelo experimental para a doença de Huntington

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências. Versão corrigida, a versão original se encontra disponível na FMUSP

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Francisco Javier Hernandez Blazquez

São Paulo
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Moreira, Amanda Lopez

Efeitos do ácido 3-nitropropiónico (3-NP) na inervação extrínseca do coração de camundongos – modelo experimental para a doença de Huntington / Amanda Lopez Moreira. -- São Paulo, 2017.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientador: Francisco Javier Hernandez Blazquez.

Descritores: 1.Doença de Huntington 2.Gânglio estrelado 3.Ácido 3-nitropropiónico 4.Estereologia 5.Camundongos endogâmicos C57BL

USP/FM/DBD-161/17

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Moreira, Amanda Lopez

Título: Efeitos do ácido 3-nitropropiónico (3-NP) na inervação extrínseca do coração de camundongos – modelo experimental para a doença de Huntington

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação ao meu marido Roberto Novoa Santos que sempre acreditou em mim e me apoiou incondicionalmente durante essa jornada. E aos meus pais Solange Lopez Moreira e José Paulo Moreira que sempre incentivaram meus estudos e despertaram em mim a vontade de aprender sempre mais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Professor Dr. Francisco J. H. Blazquez pela orientação, marcada por competência, seriedade, paciência e generosidade.

À CAPES, agradeço pelo período de bolsa concedida, que me possibilitou dedicação exclusiva à pesquisa.

À coordenação e os secretários do Programa de Fisiopatologia Experimental por todo o apoio durante o mestrado.

Aos amigos do Laboratório de Estereologia Estocástica e Anatomia Química (LSSCA), que sempre me apoiaram e incentivaram com amor e paciência em todos os momentos, em especial à Aliny A. B. Lobo Ladd que foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho, não tenho palavras para demonstrar a gratidão por todo o aprendizado e ajuda. Ao Fernando por todos os ensinamentos e confiança. À Lays dos Anjos Neto e Aparecida Joana Moreto que foram essenciais para mim em todos os sentidos, desde o auxílio com as dúvidas técnicas até os momentos de descontração, a amizade e o apoio de vocês me fizeram superar qualquer dificuldade.

Ao meu marido, amigo e companheiro Roberto Novoa Santos que sempre me apoiou e incentivou em todos os sentidos, mostrando que juntos podemos superar qualquer obstáculo, agradeço pela paciência e compreensão.

À minha mãe Solange Lopez Moreira, pelo amor incondicional, o apoio, confiança, paciência e o carinho de sempre.

Ao meu pai (*in memoriam*) José Paulo Moreira, que apesar de não ter feito parte disso diretamente, indiretamente foi meu grande motivador e foi extremamente importante para que eu conseguisse chegar até aqui.

Aos meus sogros Roberta N. Santos e Wanderlei de P. Santos, que me acolheram como verdadeiros pais, agradeço pela amizade, generosidade, confiança e apoio.

Ao meu irmão Maurício Moreira e cunhada Grazielle G. Moreira por toda a ajuda, generosidade e apoio que me deram durante essa jornada.

Minha profunda gratidão aos animais, que involuntariamente, doaram suas vidas para a realização desse estudo.

Meus respeitosos agradecimentos pela disponibilidade e contribuição da banca examinadora.

RESUMO

Moreira AL. **Efeitos do ácido 3-nitropropiónico (3-NP) na inervação extrínseca do coração de camundongos – modelo experimental para a doença de Huntington** Dissertação (Mestrado). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

A doença de Huntington (DH) é um distúrbio neurodegenerativo hereditário e autossômico dominante e tem como características alterações motoras e mentais progressivas. Recentemente, além das alterações verificadas no sistema nervoso central, também têm sido descritas alterações em órgãos periféricos, tais como osteoporose, atrofia muscular, problemas intestinais, alterações cardíacas e, sobretudo, alterações no sistema nervoso autônomo. São evidentes as alterações autonômicas do coração nos portadores da DH, as quais, são, sobretudo, um risco potencial, tornando os pacientes suscetíveis a problemas cardiovasculares. No entanto, os mecanismos pelos quais a doença afeta os componentes autonômicos do coração não são totalmente conhecidos, por isso a importância de se estudar os componentes da inervação cardíaca, sobretudo o gânglio estrelado (GE). A DH pode ser induzida através do ácido 3-nitropropiónico (3-NP), pois essa substância produz efeitos neurotóxicos inibindo a succinato desidrogenase. Esta pesquisa objetiva analisar, por meio da indução através do 3-NP, os efeitos da DH no GE, identificando possíveis alterações morfoquantitativas dos neurônios ganglionares, com uso de técnicas baseadas em delineamento estereológico 3D e de bioimagem associadas à teste comportamental e perfil hemodinâmico, a fim de contribuir para o entendimento de como a doença age na inervação do coração. Para isso foram utilizados 14 camundongos C57BL-6 machos que foram alocados em dois grupos: Grupo Controle com 7 animais induzidos com solução salina (0,9%); Grupo 3NP com 7 animais induzidos com doses subagudas de 60 mg.kg⁻¹dia⁻¹ de 3-NP. Foram realizados o teste comportamental, a avaliação cardíaca e a análise estereológica. Os principais achados dessa pesquisa foram: (I) diminuição da atividade exploratória dos animais; (II) prejuízo da função sistólica; (III) aumento de 76% no volume ganglionar; (IV) aumento de 70% no volume médio dos neurônios, concluindo-se que o 3-NP produz efeitos na função cardíaca, ocasionando hipertrofia do gânglio.

Descritores: doença de Huntington; gânglio estrelado; ácido 3-nitropropiónico; estereologia; camundongos endogâmicos C57BL

ABSTRACT

Moreira AL. **Effects of 3-nitropropionic acid (3-NP) on the extrinsic innervation of the mice heart - experimental model for Huntington's disease** (dissertation). São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Huntington's disease (HD) is a hereditary and autosomal dominant neurodegenerative disorder and is characterized by progressive motor and mental changes. Recently, in addition to changes in the central nervous system, alterations in peripheral organs such as osteoporosis, muscular atrophy, intestinal problems, cardiac alterations and, above all, changes in the autonomic nervous system have also been described. Autonomic heart alterations in DH patients are evident, which are a potential risk, making patients susceptible to cardiovascular problems. However, the mechanisms by which the disease affects the autonomic components of the heart are not fully understood, therefore, the importance of studying the components of cardiac innervation, especially the stellate ganglion (SG). HD can be induced through 3-nitropropionic acid (3-NP), as this substance produces neurotoxic effects inhibiting succinate dehydrogenase. The aim of this research was to analyze the effects of HD on the SG by means of 3-NP induction, identifying possible morpho-quantitative changes in ganglion neurons, using techniques based on 3D stereological and bioimaging techniques associated with behavioral and hemodynamic profile, In order to contribute to the understanding of how the disease acts in the heart innervation. For this, 14 male C57BL-6 mice were used, which were allocated in two groups: Control Group with 7 animals induced with saline solution (0.9%); Group 3NP with 7 animals induced with subacute doses of 60 mg.kg-1day-1 of 3-NP. Behavioral test, cardiac evaluation and stereological analysis were performed. The main findings of this research were: (I) decrease in the exploratory activity of the animals; (II) impairment of systolic function; (III) 76% increase in ganglion volume; (IV) increase of 70% in the mean volume of the neurons, concluding that 3-NP produces effects on cardiac function, causing hypertrophy of the ganglion.

Descriptors: Huntington's disease; stellate Ganglion; 3-nitropropionic acid; stereology; mice, inbred C57BL

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Arena circular de polietileno onde se realiza o teste de campo aberto.....	30
Figura 2 - Imagem representativa do exame ecocardiográfico, onde se observa um camundongo do grupo controle em decúbito dorsal (A) submetido ao exame com um transdutor linear (*) e a representação bidimensional (seta branca) e o modo-M do exame (seta cinza) (B). Escala de barra em A: 2cm.....	33
Figura 3 - Fotografia mostrando um camundongo do grupo controle dentro de um contentor para ser acoplado ao sistema de registro de pressão caudal (A), e dois camundongos já acoplados ao sistema de pressão caudal (B) com as cabeças de seta brancas indicando o “tail-cuff”	35
Figura 4 - Camundongo do grupo controle já canalizado para administração de atropina e propranolol (cabeça de seta preta) e com os eletrodos implantados para o monitoramento do eletrocardiograma (cabeça de seta branca)	37
Figura 5 - Gânglio estrelado esquerdo do grupo controle.....	38
Figura 6 - Fotomicrografia do gânglio estrelado esquerdo demonstrando a aplicação do Princípio de Cavalieri para a estimativa do volume ganglionar através do sistema teste de pontos. Toluidina.....	39
Figura 7 - Tempo de permanência dos animais do grupo Controle e 3NP na área central e na área tigmotóxica. As diferenças não foram significativas central ($p=0,446$) e tigmotóxica ($p=0,861$). As barras verticais representam as médias dos grupos e as barras horizontais, logo acima, o erro padrão da média.....	44
Figura 8 - Distância total percorrida pelos animais do grupo Controle e 3NP. As diferenças foram significativas ($*p=0,031$). As barras verticais representam as médias dos grupos e as barras horizontais, logo acima, o erro padrão da média.....	44
Figura 9 - Velocidade média mantida pelos animais do grupo Controle e 3NP. As diferenças não foram significativas ($p=0,337$). As barras verticais representam as médias dos grupos e as barras horizontais, logo acima, o erro padrão da média.....	45
Figura 10 - Tempo parado dos animais do grupo Controle e 3NP. As diferenças foram significativas ($*p=0,014$). As barras verticais representam as médias dos grupos e as barras horizontais, logo acima, o erro padrão da média.....	45
Figura 11 - Vista superior da arena circular de polietileno (onde se realizou o teste de campo aberto) subdividida em duas regiões (A): central (círculo azul) e tigmotóxica ou externa (círculo amarelo). Os traços vermelhos (B, C) representam os trajetos realizados por um animal do grupo 3NP (B) e por um animal do grupo Controle (C).....	46

Figura 12 - Movimentos orofaciais dos animais do grupo Controle e 3NP. As diferenças foram significativas (* $p=0,001$). As barras verticais representam as médias dos grupos e as barras horizontais, logo acima, o erro padrão da média.....47

Figura 13 - Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Média (PAM), Pressão Arterial Diastólica (PAD) dos grupos controle e 3NP. As diferenças não foram significativas ($p=0,409$); ($p=0,413$); ($p=0,588$) para os parâmetros PAS, PAM e PAD, respectivamente. As barras verticais representam as médias dos grupos e as barras horizontais logo acima o erro padrão da média.....49

Figura 14 - Frequência Cardíaca do grupo controle e 3NP. As diferenças entre os grupos foram significativas (* $p=0,006$). As barras verticais representam as médias dos grupos e as barras horizontais logo acima o erro padrão da média.....50

Figura 15 - Neuromodulação da Frequência cardíaca nos grupos Controle e 3NP. As diferenças foram significativas para o tônus vagal (* $p=0,048$), para efeito vagal observou-se efeito de "border line" ($p=0,056$) e não foram significativas para o efeito simpático ($p=0,321$) e tônus simpático ($p=0,969$). As barras verticais representam as médias dos grupos e as barras horizontais logo acima o erro padrão da média.....51

Sumário

1. Introdução	15
2. Objetivos.....	18
2.1 Teste comportamental	18
2.1.1 Teste de campo aberto (atividade locomotora espontânea).	18
2.1.2 Quantificação de Movimentos Orofaciais (MOFs)	18
2.2 Avaliação cardíaca (Perfil hemodinâmico).....	18
2.3 Macro e microestrutura do gânglio estrelado (GE) – Estudo estereológico	18
2.3.1 Comprimento e largura.....	18
2.3.2 Volume do gânglio estrelado (V_{GE});	18
2.2.3 Número total de neurônios do gânglio estrelado (N_{GE});.....	18
2.3.4 Volume médio dos neurônios do gânglio estrelado ($\bar{V}^N_{GE}$);.....	18
2.3.5 Densidade de volume dos neurônios do gânglio estrelado (Vv_{GE});.....	18
2.3.6 Volume total ocupado pelos neurônios no gânglio estrelado (V_{totGE}).....	18
3. Revisão de Literatura	20
3.1 Sistema nervoso autônomo em roedores	20
3.2 Aspectos moleculares da Doença de Huntington (DH)	21
3.3 DH periférica: origem dentro e fora do sistema nervoso	22
3.4 Modelo químico para o estudo da DH.....	24
4. Materiais e métodos.....	29
4.1 Materiais	29
4.2 Métodos.....	29
4.2.1 Protocolo de indução (modelo neurotóxico para DH)	29
4.2.2 Teste comportamental.....	29
4.2.2.1 Teste de campo aberto (Atividade exploratória espontânea)	29
4.2.2.2 Quantificação de Movimentos Orofaciais (MOFs).....	30
4.2.3 Avaliação Cardíaca.....	31
4.2.3.1 Avaliação Morfofuncional do Coração (ecodopplercardiografia)	31
4.2.3.2 Avaliação do perfil Hemodinâmico (Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Média (PAM), Pressão Arterial Diastólica (PAD) e Frequência Cardíaca (FC)	34
4.2.3.3 Neuromodulação autonômica cardíaca (Participação do sistema nervoso autônomo na modulação da frequência cardíaca)	36
4.2.4 Eutanásia.....	37

4.2.5 Estudo histológico.....	37
4.2.6 Microestrutura do gânglio estrelado (GE) - (Estudo estereológico).....	38
4.2.6.1 Volume do gânglio estrelado (V_{GE}).....	38
4.2.6.1.1 Coeficiente de Erro da estimativa de volume do GE.....	39
4.2.6.2 Número total de neurônios do gânglio estrelado (N_{GE})	40
4.2.6.3 Volume médio dos neurônios do gânglio estrelado ($\bar{V}^N_{GE}$)	40
5. Resultados.....	43
5.1 Teste Comportamental.....	43
5.1.1 Teste de campo aberto (Atividade locomotora espontânea).....	43
5.1.2 Quantificação de Movimentos Orofaciais (MOFs)	47
5.2 Avaliação Cardíaca.....	48
5.2.1 Avaliação Morfofuncional do Coração (ecodopplercardiografia).....	48
5.2.2 Avaliação do perfil Hemodinâmico (Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Média (PAM), Pressão Arterial Diastólica (PAD) e Frequência Cardíaca (FC).....	49
5.2.3 Neuromodulação autonômica cardíaca (Participação do sistema nervoso autônomo na modulação da frequência cardíaca).....	50
5.3 Macro e Microestrutura do GE.....	52
6 Discussão	54
6.1 Considerações Gerais.....	54
6.2 Avaliação comportamental	55
6.2.1 Teste de campo aberto (Atividade exploratória espontânea).....	55
6.2.2 Quantificação dos Movimentos Orofaciais (MOFs).....	55
6.3 Avaliação cardíaca	56
6.3.1 Avaliação morfofuncional do coração (ecodopplercardiograma).....	56
6.3.2 Avaliação do perfil hemodinâmico (Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Média (PAM), Pressão Arterial Diastólica e Frequência Cardíaca (FC).....	56
Camundongos em condições saudáveis, de mesma idade e sexo, podem apresentar uma FC basal ou de repouso variável, de acordo com dados descritos na literatura, podendo variar entre 675 bpm (Ishii et al., 1996), 550 bpm (Li et al., 1999) e 515 bpm (Senador et al., 2009).56	
6.3.3 Neuromodulação autonômica cardíaca (Participação do sistema nervoso autônomo no controle da frequência cardíaca basal)	57
6.4 Estrutura do GE	60
6.4.1 Forma e localização	60
Em relação aos parâmetros macromorfométricos, não se observou alterações na largura e comprimento.	60
6.4.2 Parâmetros estereológicos	60

7. Conclusões	63
8. Outras Considerações	64
9 Referências.....	65
ANEXOS	78

Introdução

1 Introdução

A doença de Huntington (DH) é um distúrbio neurodegenerativo, progressivo, hereditário e fatal associado à degeneração seletiva dos neurônios GABAérgicos do estriado. A doença é caracterizada por sintomas motores, tais como movimentos coreiformes involuntários, distonias, rigidez, e também distúrbios cognitivos, alterações de humor e de comportamento. Esses sintomas geralmente ocorrem antes de a doença ser diagnosticada clinicamente (Thu et al., 2010; Cayazac et al., 2011; Ligot et al., 2011).

A administração sistêmica do ácido 3-nitropropiónico (3-NP) tem sido amplamente utilizada como modelo neuroquímico para a indução da DH em animais, pois resulta em degeneração estriatal, mimetizando aspectos neuropatológicos da doença (Gould e Gustine, 1982; Beal et al., 1993; Vis et al., 1999; Mirandola et al., 2010).

A ação farmacológica do 3-NP é a inibição, irreversível, da enzima succinato desidrogenase (SDH), que participa do complexo II-III da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, resultando em uma desordem neurodegenerativa, mitocondrial e metabólica (Beal et al., 1993; Brouillet et al., 1998; Vis et al., 1999; Gabrielson, Hogue e Bohr, 2001).

Em decorrência de seus sintomas motores, cognitivos e emocionais, as pesquisas sobre a DH, normalmente, são focadas no encéfalo, visto que tais sintomas se associam a neurodegeneração sobretudo dos gânglios basais e córtex cerebral. Porém, além desses sintomas clássicos da doença, é comum encontrar nos pacientes alterações periféricas (como perda de peso e osteoporose), e alterações autonômicas que podem se tornar agravantes do quadro clínico dos portadores da DH (Van der Burg, Björkqvist e Brundin, 2009).

Neste contexto, uma alteração autonômica potencialmente agravante, pois é uma das principais causas de morte dos pacientes, é a disfunção autonômica do coração que leva a insuficiência cardíaca. No entanto, os mecanismos de alteração do coração na DH são ainda pouco conhecidos, embora se saiba que, clinicamente, a doença afeta a inervação e a musculatura do coração tanto em humanos como em modelos animais. Alguns estudos demonstram a presença de deficiência cardíaca simpática, trombose arterial, fibrose, síncope e arritmias associada à disfunção parassimpática (Gabrielson, Hogue e Bohr, 2001; Mihnm et al., 2007; Bär et al., 2008).

Ainda há discussões a respeito da origem periférica da DH, sobretudo alterações na inervação cardíaca, como precedente das alterações encefálicas. No entanto, não há,

ainda, na literatura médica, dados suficientes que elucidem as origens das alterações cardíacas na DH (Andrich et al., 2002; Sassone et al., 2009; Van der Burg, Björkqvist e Brundin, 2009).

O gânglio estrelado (GE) é um dos gânglios do tronco simpático, os quais têm como função conduzir impulsos nervosos às vísceras torácicas e abdominais. O gânglio tem importante papel na inervação cardíaca extrínseca, já que seus neurônios pós-ganglionares fornecem a principal inervação simpática do coração e desempenham um papel significativo na regulação da atividade cardíaca: frequência cardíaca e força de contração (Mo, Wallis e Watson 1994; Wallis, Watson e Mo, 1996; Krout, Mettenleiter e Loewy, 2003; Maslyukov, 2005; Ruiz-Velasco et al., 2005).

Assim, a análise do GE, com uso de técnicas baseadas em delineamento estereológico 3D e de bioimagem associadas ao teste comportamental e perfil hemodinâmico, pode contribuir com o entendimento de como a doença atua na inervação cardíaca extrínseca por meio da ação do gânglio, e como isso pode influenciar na modulação da frequência cardíaca. Sendo assim, neste estudo experimental, testamos a hipótese de que a DH (induzida pela ação do 3-NP) promove alterações estruturais no GE, ocasionando assim (i) diminuição do número total de neurônios; (ii) atrofia ganglionar; (iii) atrofia neuronal.

Objetivos

2 Objetivos

Analisar os efeitos da ação do 3-NP na estrutura do gânglio estrelado, para isso os seguintes parâmetros foram avaliados:

2.1 Teste comportamental

2.1.1 Teste de campo aberto (atividade locomotora espontânea).

2.1.2 Quantificação de Movimentos Orofaciais (MOFs)

2.2 Avaliação cardíaca (Perfil hemodinâmico)

2.2.1 Avaliação morfofuncional do coração (ecodopplercardiograma)

2.2.2 Avaliação do perfil hemodinâmico (Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Média (PAM), Pressão Arterial Diastólica (PAD) e Frequência Cardíaca (FC)

2.2.3 Neuromodulação autonômica cardíaca (participação do sistema nervoso autônomo na modulação da frequência cardíaca)

2.3 Macro e microestrutura do gânglio estrelado (GE) – Estudo estereológico

2.3.1 Comprimento e largura.

2.3.2 Volume do gânglio estrelado (V_{GE});

2.2.3 Número total de neurônios do gânglio estrelado (N_{GE});

2.3.4 Volume médio dos neurônios do gânglio estrelado ($\bar{V}^N_{GE}$);

2.3.5 Densidade de volume dos neurônios do gânglio estrelado (Vv_{GE});

2.3.6 Volume total ocupado pelos neurônios no gânglio estrelado (V_{totGE}).

Revisão de Literatura

3 Revisão de Literatura

3.1 Sistema nervoso autônomo em roedores

Segundo Song et al. (2009), o sistema nervoso autônomo (SNA) é uma parte essencial do sistema de regulação envolvido na manutenção da estabilidade do sistema circulatório, sendo a função vagal cardíaca um importante mecanismo de homeostasia do batimento cardíaco e da pressão arterial em mamíferos.

Ribeiro et al. (2002) citam que os neurônios do SNA estão situados nos gânglios e podem ser divididos sistematicamente em pré-vertebrais, paravertebrais, intramurais e para-viscerais. Em humanos, a cadeia simpática dispõe-se verticalmente, passando pelos colos das costelas na região cósto-vertebral e é facilmente identificada abaixo da pleura parietal (Li et al., 1999).

Nos mamíferos, o SNA possui uma estrutura comum, sendo compreendido pelos neurônios eferentes que inervam toda a musculatura lisa do corpo e glândulas e, pelos neurônios aferentes que recebem e transmitem reflexos e sensações dos órgãos viscerais (Gabella, 2004).

A inervação autônoma do coração compreende dois contingentes do SNA: extrínseco e intrínseco. O SNA extrínseco consiste em cadeias de gânglios ao longo da medula espinal, portanto, são gânglios paravertebrais, sendo um deles o gânglio estrelado (GE). O SNA intrínseco consiste em gânglios e fibras nervosas que estão localizados no próprio coração (Ardell, 1994; Sherlag; Po, 2006; Hou et al., 2007; Zhou et al., 2007; Hasan; Lin et al., 2009; Smith, 2009).

Os componentes e a estrutura do sistema nervoso cardíaco extrínseco são descritos, predominantemente em roedores, dentre eles as cobaias (Leger et al., 1999; Calupca et al., 2000), os ratos (Hanamatsu et al., 2002; Maslyukov; Timmermans, 2004; Ruiz-Veslasco et al., 2005; Maslyukov et al., 2006; Firat et al., 2008; Cavalcanti et al., 2009; Hasan; Lujan et al., 2009; Smith, 2009) e os camundongos (Maslyukov; Timmermans, 2004; Maslyukov et al., 2006).

Os neurônios dos gânglios simpáticos de mamíferos são geralmente uninucleados. Entretanto, em gânglios de médios e grandes roedores, como cobaias e capivaras, tem sido descrito maior ocorrência de neurônios binucleados (Forsman et al., 1989; Sasahara et al., 2003; Ribeiro, Davis, Gabella, 2004).

3.2 Aspectos moleculares da Doença de Huntington (DH)

A doença de Huntington (DH) é um distúrbio neurodegenerativo hereditário e autossômico dominante, causado por uma mutação no gene conhecido atualmente como gene da DH, que está localizado no braço curto do cromossomo 4. Esse gene transcreve uma proteína mutante expandida, a huntingtina mutante (htt-m), que apresenta repetições poliglutamínicas (CAG citosina-adenosina-guanina), sendo que o número de repetições está diretamente relacionado com a gravidade e idade de surgimento dos sintomas (Huntington's disease collaborative research group, 1993; Harper, 1996).

A DH é caracterizada classicamente por estas seguintes alterações: disfunção motora progressiva, prejuízos comportamentais e cognitivos, além de distúrbios psiquiátricos (Lerch et al., 2007; André et al. 2010; Giampa et al., 2010; Thu et al., 2010; Delmaire et al., 2012). As alterações ocorrem em função da neurodegeneração severa e progressiva que ocorre no estriado e no neocórtex, respectivamente. Essa degeneração caracteriza os movimentos involuntários, as alterações cognitivas e os sintomas comportamentais, como as alterações de humor (Thu et al., 2010; Ligot et al., 2011), e, de acordo com André et al. (2010), essa disfunção do córtex e do estriado ocorre bem antes de a doença ser diagnosticada clinicamente.

A huntingtina (htt) é uma proteína expressa em vários tecidos periféricos, além do cérebro. Ela é geralmente encontrada, em maior parte, no citoplasma, em neurônios, e está associada às vesículas. Aparentemente, as principais funções da htt estão relacionadas com a comunicação celular, endocitose, transporte intracelular e transmissão sináptica (Gusella e MacDonald, 1998; Pardo et al., 2012). A huntingtina mutante (htt-m) desencadeia disfunção neuronal na DH, afetando principalmente o corpo estriado e, com o avanço da doença, afeta também o córtex cerebral resultando nos sintomas motores, cognitivos e psiquiátricos. Ainda não está totalmente esclarecido como a htt-m contribui para essas disfunções, mas sabe-se que ela afeta a neurotransmissão, o metabolismo mitocondrial e celular e a sinalização celular (Pardo et al., 2012; Weiss et al., 2012).

O diagnóstico da doença é realizado com base no quadro clínico associado ao histórico familiar do paciente; a confirmação do quadro diagnóstico é realizada com exame genético através da técnica de PCR, por meio da qual é possível contar o número de expansões CAG na porção do gene que carrega a doença (Barsottini, 2007).

Até o momento não há cura para a doença de Huntington, contudo alguns sintomas podem ser controlados com o uso de medicamentos, por exemplo, sintomas

comportamentais como depressão, ansiedade, transtorno obsessivo compulsivo e transtornos psicóticos em geral são tratados com antidepressivos, inibidores seletivos da recaptação de serotonina e antipsicóticos tradicionais; os sintomas motores são geralmente tratados com bloqueadores dopaminérgicos; no entanto os problemas cognitivos têm uma resposta insatisfatória ao tratamento com medicação.

Portanto os esforços existentes atualmente estão voltados para a melhoria da qualidade de vida dos portadores da doença visando a melhores tratamentos preventivos e protetores para minimizar os sintomas progressivos da DH (Barsottini, 2007).

3.3 DH periférica: origem dentro e fora do sistema nervoso

Além dos sintomas clássicos da doença já descritos anteriormente, estão sendo descritas recentemente alterações em órgãos periféricos e não apenas no sistema nervoso central, tais como perda de peso, osteoporose, atrofia muscular, problemas intestinais, alterações cardíacas e, sobretudo, alterações no sistema nervoso autônomo (Sassone et al., 2009; Van der Burg, Björkqvist e Brundin, 2009).

Sugere-se que essas anormalidades decorram diretamente da expressão local da htt-m, podendo ocorrer independentemente das alterações neurológicas e até mesmo precedê-las. Assim, as manifestações dos sintomas periféricos podem se tornar possíveis biomarcadores para o diagnóstico precoce da doença (Van der Burg, Björkqvist e Brundin, 2009).

Várias alterações periféricas estão sendo descritas nos pacientes portadores da DH, sobretudo em órgãos vitais como o coração (Andrich et al., 2002; Mihm et al., 2007), o que contribui para o entendimento dos mecanismos de ação da htt-m e também demonstra que os mecanismos moleculares que levam a huntingtina mutante a causar disfunções celulares estão divididos entre o sistema nervoso central e os tecidos periféricos (Sassone et al., 2009).

Andrich et al. (2002) demonstraram em seu estudo que 44% dos pacientes portadores da DH apresentaram disfunção autonômica e que ambos os sistemas nervosos, simpático e parassimpático, são afetados. Os autores também puderam concluir que existe uma alteração na modulação vagal cardíaca nesses pacientes, indicando um predomínio da modulação simpática.

Em outro estudo, Bär et al. (2008) também descreveram alterações nos troncos simpático e parassimpático do sistema nervoso autônomo, os quais podem ser afetados devido à disfunção cardíaca autônoma, pois eles encontraram uma redução na modulação

cardiovagal, o que pode deixar os pacientes suscetíveis a problemas cardiovasculares como arritmias e síncope cardíaca.

Portanto são evidentes as alterações autonômicas do coração nos portadores da DH, no entanto os mecanismos pelos quais a doença afeta o coração não são totalmente esclarecidos, por isso a importância de se estudarem os componentes da inervação cardíaca, sobretudo o gânglio estrelado.

Esse gânglio é um importante centro de inervação simpática extrínseca para o coração. Os neurônios pós-ganglionares decorrentes do gânglio estrelado fornecem a principal inervação simpática do coração e desempenham um papel significativo na regulação da atividade cardíaca, regulando a frequência cardíaca e a força de contração (Mo, Wallis e Watson 1994; Wallis, Watson e Mo, 1996; Krout, Mettenleiter e Loewy, 2003; Maslyukov, 2005; Ruiz-Velasco et al., 2005). Em geral, a estimulação simpática aumenta a atividade global do coração. Isso ocorre por meio do aumento tanto da frequência quanto da força de contração cardíaca. A estimulação parassimpática produz principalmente os efeitos opostos (Mo, Wallis e Watson 1994; Guyton & Hall, 2002).

Estudos mostram assimetria lateral funcional, anatômica e morfológica nos gânglios simpáticos (Cinca et al., 1985; Nozdrachev et al., 2002; Abrahão et al., 2009; Loesch et al., 2010). Além disso, vários estudos têm discutido a respeito da inervação simpática do coração (Schwartz, Snebold e Brown, 1976; Cinca et al., 1985; Nozdrachev et al., 2002; Abdi e Yang, 2005; Vaseghi et al., 2012; Zhou et al., 2013), sendo que vários deles apontam para um efeito pró-arritmico na estimulação do gânglio estrelado esquerdo (Vaseghi et al., 2012; Schwartz, Snebold e Brown, 1976; Schwartz, Stone e Brown, 1976; Schwartz e Stone 1980; Cinca et al., 1985). Dessa forma, baseados nesses dados, outros autores analisam o efeito do bloqueio ou da desnervação do gânglio estrelado esquerdo, procedimento que vem sendo amplamente utilizado na prevenção de morte súbita cardíaca em pacientes com doenças cardiovasculares (Cinca et al., 1985; Cao et al., 2000; Docimo et al., 2008), pois essas patologias têm sido associadas a uma hiperinervação simpática. Assim, o bloqueio do GE esquerdo reduz essa hipernervação e diminui a incidência de arritmia ventricular, diminuindo as taxas de morbidade e mortalidade desses pacientes (Docimo et al., 2008; Wood, Docimo e Elkowitz, 2010; Vaseghi et al., 2012; Winter et al., 2012). Por esse motivo os gânglios estrelados esquerdos foram escolhidos para serem estudados.

3.4 Modelo químico para o estudo da DH

O ácido 3-nitropropiónico (3-NP) é uma toxina natural encontrada em plantas e fungos do gênero *Astragalus (Indigofera)* (Hong et al., 1990; Castillo et al., 1994; Gabrielson, Hogue e Bohr, 2001). Muitos estudos têm relatado a administração do 3-NP em ratos, camundongos e primatas não-humanos como modelo experimental para a doença de Huntington, pois essa substância produz efeitos neurotóxicos inibindo, irreversivelmente, a succinato desidrogenase (SDH) (Palfi et al., 1996; Brouillet et al., 1998; Vis et al., 1999).

O 3-NP é um inibidor irreversível do ciclo do ácido cítrico de Krebs e do complexo II da cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria e, quando aplicado em ratos, tem demonstrado produzir lesões seletivas no estriado devido à excitotoxicidade indireta (Beal et al., 1993; Vis et al., 1999; Bizat et al., 2003). Em pacientes portadores da DH, estudos bioquímicos do núcleo caudado e putamen demonstraram uma redução parcial da atividade do complexo II-III e sugerem que essa diminuição parcial pode ser suficiente para induzir a degeneração seletiva do estriado (Brouillet et al., 1998). A administração crônica do 3-NP em animais promove movimentos involuntários, distonia e alterações comportamentais associados à degeneração do estriado, características remissivas à DH (Palfi et al., 1996; Bizat et al., 2003).

Brouillet et al. (1998) em seu estudo demonstraram que, após uma semana de indução crônica ao 3-NP, os animais apresentaram graves sintomas neurológicos, tais como falta de coordenação, anormalidades da marcha, e, nos animais mais afetados, paralisia dos membros posteriores, e demonstram também que a inibição crônica da SDH, que é o principal componente do complexo II-III, pode produzir uma perda seletiva significativa no estriado, sugerindo, assim, que esse defeito no complexo II-III na DH pode ser suficiente para produzir morte neuronal seletiva no estriado que caracteriza a fase inicial da DH. Palfi et al. (1996) também puderam concluir em seu estudo que o tratamento prolongado com 3-NP resultou na patologia semelhante da DH, com achados de lesões bilaterais seletivas do caudado-putamen, poupando o córtex cerebral, movimentos espontâneos anormais, síndrome fronto-estriatais de comprometimento cognitivo e degeneração estriatal progressiva.

No modelo de indução do 3-NP a toxicidade varia de acordo com a espécie, linhagem do animal, idade, sexo e o protocolo utilizado na indução. Por exemplo, os camundongos apresentam maior resistência à aplicação do 3-NP, sendo necessária a administração de doses maiores para obter efeitos semelhantes aos da doença (Beal et al.,

1993; Gabrielson, Hogue e Bohr, 2001). Nos modelos de indução aguda em camundongos Swiss a dose única de 120-180 mg.kg⁻¹ (i.p.) e em ratos Sprague-Dawley uma dose de 20-30 mg.kg⁻¹ (i.p.) resultam em degeneração estriatal cerca de seis a doze horas após a injeção (Alexi et al., 1998; Brouillet et al., 1998; Bizat et al., 2003). No caso de indução subaguda, aplicam-se injeções diárias de 3-NP de 15 -70 mg.kg⁻¹ (i.p.) (dependendo da espécie animal) durante cinco a dez dias, promovendo a degeneração aproximadamente a partir do quarto dia de indução. Os modelos crônicos consistem em uma aplicação contínua da substância com a utilização de mini bombas osmóticas subcutâneas que liberam no organismo do animal uma dose diária de 10 mg.kg⁻¹ (i.p.) no decorrer de um mês (Brouillet et al., 1998; Hickey e Morton, 2000; Fernagut et al., 2002; Brouillet et al., 2005).

3.5 Sintomas cardíacos da Doença de Huntington em pacientes humanos e em modelos animais da doença

Disfunções do sistema nervoso autônomo podem ser confirmadas em cerca de 44% dos pacientes, em um estágio relativamente inicial da DH, em que tanto o sistema simpático e parassimpático são afetados (Andrich et al., 2002). Os principais sintomas clínicos da disfunção do sistema nervoso autônomo incluem distúrbios cardíacos e respiratórios; prejuízos na fase faríngea e esofágica da ingestão; distúrbios na micção e hiperhidrose dos pés e mãos (Den Heijer et al., 1988).

Em um estudo Aziz et al. (2010), aplicaram um questionário aos pacientes que relataram, principalmente, problemas gastrointestinais, cardiovasculares e sexuais masculinos, podendo ocorrer, inclusive, em fase pré-sintomática da doença.

Desequilíbrios no controle autonômico, relacionado ao coração, são particularmente importantes, pois podem constituir um risco potencial e iminente de morte súbita nos pacientes, e maior propensão ao desenvolvimento de arritmias cardíacas e doenças coronarianas (Cerati e Schwartz, 1991; Schwartz et al., 1992), o que contribui com o agravamento da doença e prejudica a qualidade de vida, podendo constituir um importante complicador da doença.

Consequentemente, ainda que a bronco-pneumonia seja reconhecida como a principal causa de morte na DH (Chiu e Alexander, 1982), múltiplos estudos epidemiológicos apontam que a insuficiência cardíaca constitui a segunda causa de morte entre os pacientes portadores da DH, prevalecendo como causa-mortis em mais de 30%

dos pacientes, comparados com menos 2% em pacientes não portadores de mesma idade na população geral (Conneally, 1984; Lanska et al., 1988, Sorensen e Fenger., 1992).

A suscetibilidade às disfunções cardíacas na DH, embora pouco estudada e conhecida, pode estar relacionada a dois fatores principais: primeiro a alterações do sistema nervoso autônomo (SNA) do coração, com desequilíbrio da neuromodulação simpatovagal da frequência cardíaca observada em pacientes, podendo afetar ambas as alças simpática e parassimpática da inervação cardíaca (Sharma et al., 1999; Andrich et al., 2002; Bar et al., 2008), inclusive tais alterações do SNA do coração surgirem em pacientes assintomáticos (Kobal et al., 2004; Aziz et al., 2010). E segundo, às disfunções metabólicas (estresse oxidativo) e energéticas (disfunção mitocondrial) que afetam diretamente os cardiomiócitos. Sabe-se, por exemplo, que em modelos transgênicos a huntingtina mutante afeta o cardiomiócito, alterando a função e morfologia de suas mitocôndrias, levando à queda na produção de ATPs e diminuição na taxa de respiração mitocondrial (Mihm et al., 2007; Patinsson et al., 2008; Oliveira, 2010).

Tornam-se, portanto, fundamentais os estudos dos fenômenos cardiovasculares em modelos animais que mimetizem os efeitos cardíacos da DH, na tentativa de se esclarecer os mecanismos pelos quais a DH afeta o coração. Havendo a necessidade de mais estudos morfofuncionais integrativos.

A htt-m parece interferir na função cardíaca por alterar a função mitocondrial e causar estresse oxidativo. Mihm et al. (2007) descrevem que a expressão da proteína mutante causa um rápido desenvolvimento de severas disfunções sistólicas e diastólicas, alterando também o débito cardíaco, que sofreu uma redução de 50% em 12 semanas; essas alterações no débito cardíaco foram causadas pelo decréscimo progressivo no volume de batidas (determinado pelo fluxo aórtico por batida), visto que não houve alteração na frequência cardíaca. A velocidade do fluxo transmitral foi também alterada, havendo decréscimo significativo no enchimento ventricular passivo (onda E) e aumento no atrial (onda A) (Mihm et al., 2006).

Na linhagem de camundongos BAC-HD, Schroeder et al. (2011), identificaram, em animais de meia idade: aumento da pressão sistólica (108 mm/Hg) quando comparado com os controles (86.1 mm/Hg), aumento da frequência cardíaca e pressão sanguínea e ampliação das respostas baroreflexas, o que levou à hipertrofia cardíaca. Tais alterações são indicativas de suscetibilidade a futuros eventos cardiovasculares prejudiciais (Schroeder et al., 2011).

Não se pode excluir, no entanto, que os efeitos observados na inervação cardíaca em humanos e camundongos possam estar relacionados com a diminuição da inervação inibitória dos centros autonômicos corticais e bulbares, sendo que tais observações, no desbalanceamento autonômico, são congruentes com os sintomas motores, manifestações psiquiátricas e o declínio cognitivo, podendo ocorrer muito cedo na doença (Sharma et al 1999; Kobal et al., 2004; Aziz et al., 2010; Kobal et al., 2010).

Estes resultados são relevantes, pois podem estar associados com o aumento em potencial do risco de síncope e arritmias cardíacas. Um balanço autonômico alterado (como indicado por uma atenuação da modulação vagal), associado a disfunções ventriculares, contribuem ou são pelo menos parcialmente responsáveis por elevados riscos cardiovasculares e morte súbita, relacionada aos problemas cardíacos, mesmo em condições aparentemente saudáveis (Cerati e Schwartz , 1991; Schwartz et al., 1992; Andrich et al., 2002).

Entretanto, é necessário ratificar que estudos morfofuncionais, em modelos animais como este que estamos apresentando, são necessários para se delinear o papel da disfunção dos componentes periféricos do sistema nervoso autônomo, na patogênese dos sintomas descritos, contribuindo com a explicação de como a DH age na estrutura e função, tanto do coração quanto de sua inervação autonômica.

Materiais e Métodos

4 Materiais e métodos

4.1 Materiais

Esta pesquisa foi conduzida utilizando-se 14 camundongos C57BL-6 machos com dois meses de idade, pesando em média 25g ($\pm 2DP$) e 14 gânglios estrelados esquerdos (GE). Os animais foram obtidos junto ao Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), sob o nº 3148/2013 (Anexo II), e também da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM/USP) sob o nº 014/14 (Anexo I).

Os animais supracitados foram alocados em dois grupos:

Grupo controle constituído por 07 animais que receberam injeções apenas com solução salina (controle “sham”);

Grupo 3NP constituído por 07 animais que receberam injeções com o 3-NP.

4.2 Métodos

4.2.1 Protocolo de indução (modelo neurotóxico para DH)

Os animais do grupo 3NP foram induzidos com doses subagudas de 60 mg.kg⁻¹dia⁻¹ de ácido 3-Nitropropiónico (3-NP) (SIGMA®) na concentração de 3,0mg/ml, através de duas injeções diárias de 30mg.kg⁻¹ por via intraperitoneal (IP), durante 4 dias (AnexoIII). Os animais do Grupo Controle foram induzidos com solução salina (0,9%) na mesma periodicidade e pela mesma via do grupo 3NP (Hickey e Morton, 2000; Gabrielson, Hogue e Bohr, 2001; Fernagut et al., 2002;).

4.2.2 Teste comportamental

4.2.2.1 Teste de campo aberto (Atividade exploratória espontânea)

O teste comportamental foi realizado nos animais dos dois grupos (3NP e Controle) 48 horas após a aplicação da última dose do ácido 3-nitropropiónico e da solução salina. Essa avaliação foi utilizada para confirmar a indução da doença de Huntington pelo 3-NP através da análise da atividade locomotora, usando o teste de campo aberto. Na DH, a alteração da locomoção caracteriza-se por um aumento do tempo

parado do animal e pela diminuição da atividade locomotora, confirmando que a indução ocorreu de acordo com o esperado.

Nesse teste, os animais foram filmados no tempo de 5 minutos em uma área circular de 40 centímetros de diâmetro e 20 centímetros de altura (Figura 1). Os parâmetros analisados pelo teste foram: velocidade média, locomoção média e tempo de imobilidade, sendo registrados pelo sistema Ethovision® versão 2.3 (Noldus Information Technology, Wageningen, Holanda; Rosenstock et al., 2009; Menalled et al., 2009).

FONTE: <http://www.sciencelabor.com.br/produtos/detalhes/452/open-field---campo-aberto-de-acrilico-para-camundongo.html>

Figura 1: Arena circular de polietileno onde se realiza o teste de campo aberto

4.2.2.2 Quantificação de Movimentos Orofaciais (MOFs)

Imediatamente após o teste de avaliação da atividade locomotora espontânea, os animais foram colocados individualmente em caixas de observação (16cm x 30cm x 19 cm) em que foi quantificada a frequência dos movimentos orofaciais continuamente por 10 minutos, por intermédio de um contador manual. Foram considerados movimentos orofaciais a abertura mandibular no plano vertical. Espelhos foram colocados sob, e atrás das caixas para otimizar a observação (Andreassen, 1995; Rosenstock et al., 2004).

4.2.3 Avaliação Cardíaca

4.2.3.1 Avaliação Morfofuncional do Coração (ecodopplercardiografia)

Para a realização do exame ecodopplercardiográfico, 24h depois do teste comportamental, os animais dos grupos Controle e 3NP foram sedados com anestesia inalatória (Halotano 5%), a região torácica foi devidamente tricotomizada e estes foram mantidos em decúbito dorsal para a realização do exame no aparelho SEQUOIA 512 (ACUSON, Mountain View, CA, EUA), com transdutor linear multifrequencial (10-14MHz), que permite imagens bidimensionais e modo-M simultâneas, além da análise de fluxo por efeito Doppler espectral e registro eletrocardiográfico, pela colocação de três eletrodos para a derivação DII (Figura 2A). A profundidade da imagem trabalhada foi de 2cm (Salemi et al., 2004; Lang et al., 2005; Salemi et al., 2005).

Com a finalidade de acessarmos possíveis alterações morfofuncionais no desempenho do miocárdio durante o ciclo cardíaco, o ecodopplercardiograma foi realizado avaliando-se os seguintes parâmetros:

Morfologia:

- diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (VdVE);
- diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DsVE);
- espessura do septo interventricular na diástole (SIVd);
- espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole (PW);
- volume diastólico máximo do ventrículo esquerdo (VdFVE);
- volume sistólico final do ventrículo esquerdo (VsFVE);

Função Sistólica:

- fração de ejeção do VE (FE%);
- fração de encurtamento do VE (FS%).

Para a análise destes parâmetros morfológicos e da função sistólica, foram utilizadas as janelas longitudinal, transversal e apical (cinco câmaras). As medidas lineares foram realizadas na imagem obtida pelo modo-M (Figura 2B), guiado pelo modo bidimensional, conforme Schiller et al. (1979), com as seguintes medidas: SIVd; VdVE; DsVE e PW; massa ventricular esquerda obtida a partir da fórmula: $1,047 \times [(SIVd + VdVE + PW)^3 - VdVE^3] \times 0,8 + 0,6$ onde: 1,047 representa a densidade do miocárdio, validada em ratos (Fard et al., 2000) e os índices 0,8 e 0,6, fatores de correção (Watson et al., 2004).

Os índices FE (%), FS (%) e VEC (circ/seg), foram calculados utilizando-se as fórmulas à seguir:

$FE = (VdVE) - (DsVE) / (VdVE) \times 100\%$, onde: VdVE= Volume Diastólico Final; VSF= Volume Sistólico Final, adquiridos pela imagem bi-dimensional paraesternal longitudinal;

$$FS\% = (VdVE - DsVE / VdVE) \times 100 \%$$

Todas as medidas seguiram as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia (Lang et al., 2005).

Figura 2: Imagem representativa do exame ecocardiográfico, onde se observa um camundongo do grupo controle em decúbito dorsal (A) submetido ao exame com um transdutor linear (*) e a representação bidimensional (seta branca) e o modo-M do exame (seta cinza) (B). Escala de barra em A: 2cm.

4.2.3.2 Avaliação do perfil Hemodinâmico (Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Média (PAM), Pressão Arterial Diastólica (PAD) e Frequência Cardíaca (FC))

O perfil hemodinâmico foi estabelecido pela avaliação da frequência cardíaca e da pressão sanguínea por método indireto não invasivo, utilizando um sistema computadorizado com um amplificador de pulso (modelo 29 IITC, Inc) ou plestismógrafo (Figura 3). A adaptação dos animais neste sistema de pressão caudal “tail cuff” foi necessária para minimizar o stress associado com aplicação do método visando diminuir o desvio padrão da média. A adaptação consistiu em simular a mensuração da frequência cardíaca e a pressão sanguínea colocando-se os animais em contentores cilíndricos de 2,5 cm de diâmetro e 10 cm de comprimento (Figura 3A) duas vezes intervalados de 24h antes da mensuração real. A adaptação seguida da medida propriamente dita teve início 24h após os exames de ecodopplercardiografia (vide item 4.2.3.1). Para melhor detecção do pulso caudal (Figura 3B), os animais foram mantidos em caixa termostaticamente controlada, com temperatura média entre 33° e 34°C por 5 minutos antes da mensuração ser iniciada, todas as mensurações foram realizadas em horário fixo (Johns et al., 1996; De Angelis et al., 2004; Bacurau et al., 2009).

Figura 3: Fotografia mostrando um camundongo do grupo controle dentro de um contentor para ser acoplado ao sistema de registro de pressão caudal (A), e dois camundongos já acoplados ao sistema de pressão caudal (B) com as cabeças de seta brancas indicando o “tail-cuff”. Escala de barra: em A 1cm, e em B 3cm.

4.2.3.3 Neuromodulação autonômica cardíaca (Participação do sistema nervoso autônomo na modulação da frequência cardíaca)

A fim de se avaliar a participação dos sistemas simpático e parassimpático na manutenção da frequência cardíaca basal, um duplo bloqueio farmacológico foi conduzido no grupo controle e 3NP. Para o registro, os animais tiveram suas veias jugulares externas canalizadas para a injeção das drogas e três eletrodos foram implantados subcutaneamente nas regiões axilares direita e esquerda e também no dorso (Figura 4) após serem anestesiados com uma mistura de cetamina (4,5 mg/Kg/ IP) e xilazina (0,2 mg/Kg/ IP).

Terminado todo o processo, os animais repousaram por 24h, recebendo aplicações de xilocaína. Estes eletrodos foram utilizados para monitoramento do eletrocardiograma. Para o estudo do tônus vagal, tônus simpático e frequência intrínseca, injeções intravenosas dos bloqueadores dos receptores beta-adrenérgicos cardíacos β_1 (propranolol) e do antagonista colinérgico muscarínico (atropina) foram aplicados. As drogas foram injetadas sequencialmente e alternando-se a ordem da injeção em dois dias consecutivos, sempre no mesmo horário (Negrão et al., 1992; De Angelis et al., 2004; Souza et al., 2007; Mostarda et al., 2009).

A frequência cardíaca intrínseca (FCI) foi considerada como a frequência obtida após o duplo bloqueio autonômico cardíaco, como o duplo bloqueio foi feito em dois dias consecutivos, fizemos uma média entre o primeiro e o segundo dia da frequência cardíaca para definirmos a FCI a ser utilizada. O efeito vagal foi calculado como a diferença entre a frequência máxima após a injeção de atropina e a frequência de repouso. O efeito simpático foi a diferença entre a frequência de repouso e a frequência mínima depois da injeção de propranolol. O tônus vagal é a diferença entre a frequência cardíaca intrínseca e a frequência após a injeção de propranolol e o tônus simpático é a diferença entre a frequência após a injeção de atropina e a frequência intrínseca (Negrão et al., 1992; De Angelis et al., 2004; Mostarda et al., 2009).

Figura 4: Camundongo do grupo controle já canalizado para administração de atropina e propranolol (cabeça de seta preta) e com os eletrodos implantados para o monitoramento do eletrocardiograma (cabeça de seta branca). Escala de barra 0,5 cm.

4.2.4 Eutanásia

Após os testes comportamentais, hemodinâmicos e da neuromodulação autonômica cardíaca, os animais foram pesados e eutanasiados com uma sobredose intramuscular de cetamina (60-80mg/kg) e cloridrato de xilazina (8-15mg/kg).

4.2.5 Estudo histológico

Após a confirmação da morte clínica, por meio de uma incisão mediana e ventral desde o manúbrio até o processo xifóide e secção das junções costo-condrais, foi realizada a exposição da cavidade torácica com fácil acesso ao coração. Uma cânula bulbada foi introduzida no ventrículo esquerdo e foi perfundida uma solução de lavagem (PBS, nitrito de sódio e heparina), seguido da solução fixadora: formaldeído (4%) em PBS (pH 7,4; 0,1 M).

Então, os gânglios estrelados esquerdos (Figura 5) foram dissecados e removidos dos animais, em seguida foram pesados e medidos nos seus dois eixos (comprimento e

largura). Após essa mensuração, os mesmos foram imersos na mesma solução fixadora por, pelo menos, 72 horas.

Os gânglios estrelados esquerdos foram, então, crioprottegidos com solução de sacarose (15%) por cerca de 24 horas e isotropizados pelo método do i-sector (Nyengaard e Gundersen, 1992), embebidos em solução de Ágar (10%) e; depois foram colocados em meio de emblocagem Tissue Tek e congelados em nitrogênio líquido, em seguida foram seccionados exaustivamente com 30 μm de espessura no criostato, e as secções foram coradas com Toluidina e diferenciadas com álcool 50%, desidratadas em séries crescentes de alcoóis e montadas em lâminas, com DPX e sob lamínula para análise estereológica.

Figura 5: Gânglio estrelado esquerdo do grupo controle. Escala de Barra 1000 μm

4.2.6 Microestrutura do gânglio estrelado (GE) - (Estudo estereológico)

4.2.6.1 Volume do gânglio estrelado (V_{GE})

Para a estimativa do volume do gânglio estrelado foi utilizado o princípio de Cavalieri (Mayhew e Olsen, 1991; Cavalcanti et al., 2009; Howard e Reed, 2010): o gânglio foi seccionado completamente em criostato com 30 μm de espessura. Depois um sistema teste quadrático foi aplicado em uma amostra dos cortes histológicos (Figura 6) e a seguinte fórmula foi utilizada para o cálculo dos volumes:

$V_{GE} := \sum p \times (a/p) \times t \times k$, onde:

$\sum p$ é o somatório de pontos do sistema teste que tocam a estrutura desejada;

(a/p) é a área associada a cada ponto do sistema teste;

t é a espessura de cada secção do gânglio estrelado;

k é a distância entre os cortes utilizados.

Figura 6: Fotomicrografia do gânglio estrelado esquerdo demonstrando a aplicação do Princípio de Cavalieri para a estimativa do volume ganglionar através do sistema teste de pontos. Toluidina. Escala de barra 75µm.

4.2.6.1.1 Coeficiente de Erro da estimativa de volume do GE

➤ Variância “noise” da contagem de pontos:

$$\text{Var} [\text{noise}] := c. (b/\sqrt{a}).(\sqrt{n. \Sigma P})$$

Onde c é uma constante ($c = 0,0724$)

$b/\sqrt{a}$ expressa a forma ou complexidade dos perfis analisados

n é o número de secções utilizadas

ΣP é o número total de pontos utilizados para estimar a área das secções

- Variação devido à amostragem sistematicamente aleatória (Var (surs)):

$$\text{Var (surs)} := (3(A - \text{Var (noise)}) - 4B+C)/240$$

- Variação total e precisão (Var[total]):

$$\text{Var[total]} := (\text{Var (noise)} + \text{Var (surs)})/(\sum P)^2$$

$$\text{CE} := \text{Var[total]}$$

4.2.6.2 Número total de neurônios do gânglio estrelado (N_{GE})

O número total de neurônios foi estimado utilizando o método do Fractionator óptico (Gundersen et al., 1988, Gundersen, 2002) multiplicando o número total de partículas amostradas pelo inverso das frações de amostragem, como mostra a seguinte fórmula:

$$N := \sum Q^- \cdot \frac{1}{ssf} \cdot \frac{1}{asf} \cdot \frac{1}{hsf}$$

Onde:

ssf é a fração das secções amostradas;

asf é a fração de área de cada secção usada para a quantificação;

hsf é a fração da espessura da secção efetivamente utilizada para contagem;

Q⁻ é o número de neurônios amostrados pelo disector óptico.

4.2.6.3 Volume médio dos neurônios do gânglio estrelado ($\bar{v}_{N_{GE}}$)

O volume neuronal foi estimado pelo método do rotator planar. Este método permite estimar o volume médio e a distribuição volumétrica das partículas, independentemente da sua forma, distribuição ou orientação (Vedel-Jensen; Gundersen, 1993). A seguinte fórmula foi utilizada para a estimativa do volume neuronal:

$$\bar{v}_N := \pi \cdot t \cdot \sum_i l_i^2$$

Onde: l_i^2 é uma distância medida a partir de um ponto fixo da célula ou fora dela, até uma borda arbitrariamente escolhida na mesma; **t** é a espessura de corte.

4.2.7 Análise Estatística Inferencial

A análise estatística dos dados foi conduzida pelo software Minitab® 17. Foi utilizado para detectar diferenças entre os grupos: controle e 3NP o “2-sample T-test”. As diferenças entre grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. No capítulo de resultados, as variáveis estão apresentadas como média (CV); onde CV refere-se ao coeficiente de variação observado, sendo este o quociente entre o desvio padrão e a média. Nos gráficos em barra representamos as médias dos grupos (barras verticais largas) e o erro padrão da média ($\pm$ EPM) (barras horizontais).

Resultados

5 Resultados

5.1 Teste Comportamental

5.1.1 Teste de campo aberto (Atividade locomotora espontânea)

O tempo de permanência na área central foi de: 106,5s (0,35) no grupo Controle e 91,9s (0,36) no grupo 3NP. O tempo de permanência na área tigmotóxica para o grupo Controle foi de 193,5s (0,19) e para o grupo 3NP foi de 189,9s (0,21) (Figura 7). As diferenças entre estes parâmetros não foram significativas nem para tempo de permanência na área central ($p=0,446$) e nem o tempo de permanência na área tigmotóxica ($p=0,861$).

A distância total percorrida foi de 174,1 cm (0,32) no grupo Controle e de 111,7 cm (0,12) no grupo 3NP, detectando-se diferenças significativas ($p= 0,031$) entre os grupos (Figura 8 e 11).

A velocidade média para o grupo Controle foi de 4,07 cm/s (0,19) e no grupo 3NP foi de 3,62 cm/s (0,24) (Figura 9). As diferenças não foram significativas ($p=0,377$).

O tempo parado foi de 13,27s (0,15) no grupo controle e de 17,92s (0,16) no grupo 3NP (Figura 10). As diferenças foram significativas entre os grupos ($p=0,014$) (Tabela 1).

Tabela 1: Teste de campo aberto (atividade locomotora espontânea) dos camundongos controle e induzidos com 3-NP. Os valores de cada parâmetro são expressos pela média do grupo, seguida do seu coeficiente de variação (CV) - São Paulo- 2015.

Teste Comportamental	Grupos	
	Controle	3-NP
Permanência na área central (s) ^{NS1}	106,5 (0,35)	91,9 (0,36)
Permanência na área tigmotóxica (s) ^{NS2}	193,5 (0,19)	189,9 (0,21)
Distância total percorrida (cm)*	174,1 (0,32)	111,7 (0,12)
Velocidade média (cm/s) ^{NS3}	4,07 (0,19)	3,62 (0,24)
Tempo parado (s)**	13,27 (0,15)	17,92 (0,16)

* $p=0,031$; ** $p=0,014$; NS= não significativo ^{NS1} $p=0,446$; ^{NS2} $p=0,861$; ^{NS3} $p=0,377$.

Figura 7: Tempo de permanência dos animais do grupo Controle e 3NP na área central e na área tigmotática. As diferenças não foram significativas central ($p=0,446$) e tigmotática ($p=0,861$). As barras verticais representam as médias dos grupos e as barras horizontais, logo acima, o erro padrão da média.

Figura 8: Distância total percorrida pelos animais do grupo Controle e 3NP. As diferenças foram significativas (* $p=0,031$). As barras verticais representam as médias dos grupos e as barras horizontais, logo acima, o erro padrão da média.

Figura 9: Velocidade média mantida pelos animais do grupo Controle e 3NP. As diferenças não foram significativas ($p=0,337$). As barras verticais representam as médias dos grupos e as barras horizontais, logo acima, o erro padrão da média.

Figura 10: Tempo parado dos animais do grupo Controle e 3NP. As diferenças foram significativas (* $p=0,014$). As barras verticais representam as médias dos grupos e as barras horizontais, logo acima, o erro padrão da média.

Figura 11: Vista superior da arena circular de polietileno (onde se realizou o teste de campo aberto) subdividida em duas regiões (A): central (círculo azul) e tigmotática ou externa (círculo amarelo). Os traços vermelhos (B, C) representam os trajetos realizados por um animal do grupo 3NP (B) e por um animal do grupo Controle (C). Escala de barra 15 cm.

5.1.2 Quantificação de Movimentos Orofaciais (MOFs)

A frequência dos movimentos orofaciais no grupo Controle foi de 3 (0,29) e no grupo 3NP foram 20 (0,29), as diferenças foram significativas ($p=0,001$) (Figura 12).

Figura 12: Movimentos orofaciais dos animais do grupo Controle e 3NP. As diferenças foram significativas ($*p=0,001$). As barras verticais representam as médias dos grupos e as barras horizontais, logo acima, o erro padrão da média.

5.2 Avaliação Cardíaca

5.2.1 Avaliação Morfofuncional do Coração (ecodopplercardiografia)

Os resultados do exame de ecodopplercardiografia estão sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros do exame de ecodopplercardiografia. Os valores de cada parâmetro são expressos pela média do grupo, seguida do seu coeficiente de variação (CV) - São Paulo – 2017.

Parâmetro	Grupo Controle	Grupo 3NP
Espessura do septo interventricular na diástole (SIVd)(mm) ^{NS1}	0,440 (0,12)	0,481 (0,15)
Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (VdVE)(mm) ^{NS2}	3,380 (0,16)	3,281 (0,09)
Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DsVE)(mm) ^{NS3}	2,100 (0,20)	2,300 (0,29)
Espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo (PW)(mm)*	0,500 (0,14)	0,581 (0,15)
Aorta na diástole(mm) ^{NS4}	1,280 (0,06)	1,272 (0,13)
Atrio esquerdo na diástole(mm)	1,340 (0,10)	1,327 (0,12)
Massa (g) ^{NS5}	0,600 (0,00)	0,618 (0,06)
Volume diastólico máximo do ventrículo esquerdo (VdFVE)(ml) ^{NS6}	0,125 (0,40)	0,100 (0,00)
Volume sistólico máximo do ventrículo esquerdo (VsFVE)(ml) ^{NS7}	0,040 (0,00)	0,043 (0,22)
Fração de encurtamento (%)**	37,80 (0,12)	28,39 (0,23)
Fração de ejeção (%)***	74,42 (0,07)	59,78 (0,15)

*p= 0,048; **p= 0,020; ***p= 0,022. NS= Não Significante. ^{NS1}p=0,238; ^{NS2}p=0,722; ^{NS3}p=0,492; ^{NS4}p=0,912; ^{NS5}p=0,873; ^{NS6}p=0,441; ^{NS7}p=0,724.

5.2.2 Avaliação do perfil Hemodinâmico (Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Média (PAM), Pressão Arterial Diastólica (PAD) e Frequência Cardíaca (FC))

Após avaliação do perfil hemodinâmico a pressão arterial sistólica (PAS) foi de 105,7 mm/Hg (0,03) no grupo controle e de 109,6 mm/Hg (0,08) no grupo 3NP. A pressão arterial média (PAM) foi de 92 mm/Hg (0,03) no grupo controle e de 95 mm/Hg (0,07) no grupo 3NP. A Pressão Arterial Diastólica (PAD) foi no grupo controle de 85,10 mm/Hg (0,04) e no grupo 3NP foi de 87,38 mm/Hg (0,07). As diferenças não foram significativas para PAS ($p=0,409$), PAM ($p=0,413$), PAD ($p=0,588$) (Figura 13). Os valores da Frequência Cardíaca (FC) no grupo Controle foi de 496,20 bpm (0,91) e no grupo 3NP foi de 542,18 bpm (0,03). A diferença foi significativa ($p=0,006$) (Figura 14).

Figura 13: Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Média (PAM), Pressão Arterial Diastólica (PAD) dos grupos controle e 3NP. As diferenças não foram significativas ($p=0,409$); ($p=0,413$); ($p=0,588$) para os parâmetros PAS, PAM e PAD, respectivamente. As barras verticais representam as médias dos grupos e as barras horizontais logo acima o erro padrão da média.

Figura 14: Frequência Cardíaca do grupo controle e 3NP. As diferenças entre os grupos foram significativas (* $p=0,006$). As barras verticais representam as médias dos grupos e as barras horizontais logo acima o erro padrão da média.

5.2.3 Neuromodulação autonômica cardíaca (Participação do sistema nervoso autônomo na modulação da frequência cardíaca)

Os resultados para os parâmetros referentes à neuromodulação da frequência cardíaca foram: Efeito vagal controle= 74,1 bpm (0,36) e 3NP = 42,5 bpm (0,65); Frequência cardíaca intrínseca controle= 460,4 bpm (0,08) e 3NP= 484,9 bpm (0,14); Efeito simpático controle= 118,2 bpm (0,36) e 3NP = 93,3 bpm (0,50); Tônus vagal controle= 67,44 bpm (0,28) e 3NP= 40,2 bpm (0,57); Tônus simpático controle= 163,0 bpm (0,24) e 3NP= 162,0 bpm (0,42) (Figura 15). As diferenças entre os grupos foram significativas para o Tônus vagal ($p=0,048$). As diferenças não foram significativas para Frequência cardíaca intrínseca $p=0,353$, Efeito simpático $p=0,321$, e Tônus simpático ($p=0,969$) (Figura 15). Para o efeito vagal observamos diferenças significativas do tipo efeito de borda ($p=0,056$).

Figura 15: Neuromodulação da Frequência cardíaca nos grupos Controle e 3NP. As diferenças foram significativas para o tônus vagal (* $p=0,048$), para efeito vagal observou-se efeito de "border line" ($p=0,056$) e não foram significativas para o efeito simpático ($p=0,321$) e tônus simpático ($p=0,969$). As barras verticais representam as médias dos grupos e as barras horizontais logo acima o erro padrão da média.

Tabela 3: Parâmetros hemodinâmicos e de neuromodulação do coração de camundongos controle e induzidos com 3-NP. Os valores de cada parâmetro são expressos pela média do grupo, seguida do seu coeficiente de variação (CV) - São Paulo- 2016.

Perfil Hemodinâmico	Grupos	
	Controle	3-NP
Pressão Arterial Sistólica(mm/Hg) ^{NS1}	105,7 (0,03)	109,6 (0,08)
Pressão Arterial Média (mm/Hg) ^{NS2}	92 (0,03)	95 (0,07)
Pressão Arterial Diastólica (mm/Hg) ^{NS3}	85,1 (0,04)	87,3 (0,07)
Frequência Cardíaca (bpm)*	496 (0,09)	542 (0,03)
Neuromodulação Autônômica Cardíaca	Grupos	
	Controle	3-NP
Efeito Vagal (bpm) ^{EB}	74,1 (0,36)	42,5 (0,65)
Frequência Cardíaca Intrínseca (bpm) ^{NS4}	460,4 (0,08)	484,9(0,14)
Efeito Simpático (bpm) ^{NS5}	118,2 (0,36)	93,3 (0,50)
Tônus Vagal (bpm)**	67,44 (0,28)	40,2 (0,57)
Tônus Simpático (bpm) ^{NS6}	163 (0,24)	162 (0,42)

* $p=0,006$; ** $p=0,048$. NS= não significativo ^{NS1} $p=0,409$; ^{NS2} $p=0,413$; ^{NS3} $p=0,588$; ^{NS4} $p=0,353$; ^{NS5} $p=0,321$; ^{NS6} $p=0,969$. EB=efeito de borda ^{EB} $p=0,056$.

5.3 Macro e Microestrutura do GE

Os resultados estão sumarizados na Tabela 4, a seguir:

Tabela 4: Parâmetros macromorfométricos e estereológicos do GE de camundongos controle e induzidos com 3-NP. Os valores de cada parâmetro são expressos pela média do grupo, seguida do seu coeficiente de variação (CV) - São Paulo – 2017.

Parâmetros Macromorfométricos	Grupos	
	Controle	3-NP
Comprimento (μm) ^{NS1}	2.379 (0,27)	2.785 (0,22)
Largura (μm) ^{NS2}	995 (0,38)	757,1 (0,10)
Parâmetros Estereológicos	Grupos	
	Controle	3-NP
Volume do GEe (mm^3)*	0,13 (0,27)	0,17 (0,20)
Volume neuronal (μm^3)**	1.928 (0,23)	2.729 (0,20)
Número total de neurônios ^{NS3}	14.993 (0,27)	15.455 (0,40)
Densidade de volume dos neurônios no GEe ^{NS4}	0,24 (0,11)	0,26 (0,08)
Volume total ocupado pelos neurônios no GEe***	0,031 (0,27)	0,043 (0,23)
Volume total não neuronal ^{NS5}	0,09 (0,27)	0,12 (0,20)

*p=0,049; **p= 0,013; ***p=0,027. NS= não significativo ^{NS1}p=0,346; ^{NS2}p=0,240; ^{NS3}p=0,874; ^{NS4}p=0,230; ^{NS5}p=0,068.

Discussão

6 Discussão

Além das alterações comportamentais e hemodinâmicas que caracterizaram o modelo de indução, identificamos as seguintes alterações no gânglio estrelado relacionados à aplicação do 3-NP nos camundongos: (i) aumento de 76% no volume ganglionar; (ii) aumento de 70% no volume médio dos neurônios; (iii) aumento de 72% no volume total ocupado por neurônios.

6.1 Considerações Gerais

Na Doença de Huntington é conhecida a produção de agregados proteicos (intranucleares e citoplasmáticos), a partir de clivagem da huntingtina mutante, não apenas em neurônios, mas também em outros tipos celulares (Sathasivam et al., 1999; Sassone et al., 2009; Van der Burg et al., 2009) como cardiomiócitos por exemplo (Mihm et al., 2007). A huntingtina, portanto, dentre outros processos ainda não totalmente esclarecidos, inibe o componente II da mitocôndria, causando estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (Sathasivam et al., 1999; Pattison et al., 2008; Sassone et al., 2009; Van der Burg et al., 2009).

Esta disfunção mitocondrial da DH pode ser reproduzida quimicamente através da aplicação sistêmica do Ácido 3-nitropropiónico (3NP), modelo mundialmente usado para mimetizar os efeitos causados pelo estresse oxidativo, causando degeneração seletiva no cérebro em diferentes roedores (Gould e Gustine, 1982; Beal, 2007; Brouillet et al., 1998; Brouillet et al., 2005), e primatas (Brouillet et al., 1999; Palfi et al., 1996; Palfi et al., 2000).

Mas, além de induzir alterações neurológicas, por causar a morte de neurônios de regiões muito específicas do cérebro (corpo estriado), afeta também o coração. Gabrielson et al., (2001) descrevem alterações morfológicas e diminuição na produção de ATP e nas taxas de respiração mitocondrial, seletivamente apenas no coração e no cérebro, possivelmente em função das exigências energéticas desses dois órgãos, que são afetados consideravelmente por um declínio energético em função dos prejuízos mitocondriais causados pelo 3-NP (Gabrielson et al., 2001). No entanto, há necessidade de estudos *in vivo*, que integrem os efeitos morfofisiológicos do 3-NP na musculatura e inervação cardíaca na presença de efeitos neurológicos.

6.2 Avaliação comportamental

6.2.1 Teste de campo aberto (Atividade exploratória espontânea)

Os animais induzidos apresentaram atividade exploratória reduzida que refletiu-se em menor área percorrida pelo animal e no aumento do tempo de imobilidade acessados pelo teste de campo aberto. Essas alterações, são esperadas em modelos de roedores induzidos com 3NP (Brouillet et al., 1998; Guyot et al., 1998; Rosenstock et al., 2004) e ocorrem em função da interação do stress oxidativo, disfunção mitocondrial e apoptose que ocorrem no estriado, resultando em alterações neuroquímicas e comportamentais complexas (Beal et al., 1993; Browne et al., 1999; Beal, 2007).

Similarmente observa-se alterações do movimento em pacientes com DH, caracterizados pela presença de bradicinesia durante o curso da doença (Thompson et al., 1988). As alterações neurológicas na DH são classicamente reconhecidas como sintomas primários na doença, sendo outras alterações periféricas secundárias as alterações neurológicas (Harper, 1996).

Embora admita-se que alterações periféricas da DH (como problemas cardíacos, alterações nos músculos esqueléticos e alterações ósseas) possam acontecer precocemente no curso da doença e mesmo preceder as alterações neurológicas (Sassone et al 2010; Van der burg et al., 2009), a análise das alterações na deambulação dos animais constituem um importante controle deste modelo neurotóxico de indução da DH (Guyot et al 1998; Rosenstock et al., 2004).

6.2.2 Quantificação dos Movimentos Ofaciais (MOFs)

Concomitantemente ao surgimento das deficiências na deambulação, houve aumento de 566% na frequência dos movimentos orofaciais (MOFs) nestes animais induzidos. Sendo que a quantificação de MOFs em roedores é amplamente utilizada como modelo animal para a discinesia facial em humanos (Waddington , 1990; Silva et al., 2002), que é também uma das primeiras alterações motoras progressivas presentes nos pacientes portadores de DH, e que o 3NP induz em modelos animais (Andreassen , 1995; Brouillet et al., 1999; Rosenstock et al., 2004).

A ação desta droga, por um mecanismo de excitotoxicidade e estresse oxidativo no corpo estriado causa morte de subpopulações neuronais relacionadas com o controle motor facial, quantificado em roedores pela abertura e fechamento da boca (Andreassen,

1995). O aumento na frequência dos MOFs detectado nestes camundongos está de acordo com a literatura, que reporta esse aumento de maneira dose dependente em roedores (Andreassen, 1995; Rosenstock et al., 2004).

6.3 Avaliação cardíaca

6.3.1 Avaliação morfofuncional do coração (ecodopplercardiograma)

O uso desta importante ferramenta diagnóstica não invasiva, fornece uma matriz de indicadores de performance da função sistólica e diastólica clinicamente relevantes (Salemi et al., 2004; Salemi et al., 2005; Ghanem et al., 2006; Mihm et al., 2007), sendo essenciais para avaliações *in vivo* de pequenos animais como o camundongo, possibilitado, pela alta resolução dos novos sistemas ecocardiográficos, que permitem avaliações funcionais e estruturais que não eram possíveis anos atrás (Salemi et al., 2004; Salemi et al., 2005; Tsujita et al., 2005; Ghanem et al., 2006).

Imagens obtidas pela ecodopplercardiografia transtorácica permitiram-nos acessar a função cardíaca na sístole e na diástole (Peng et al., 2009; Lang et al., 2005) e detectarmos que o 3NP diminuiu tanto a fração de encurtamento (fração de encurtamento do modo M do ventrículo esquerdo representa a mudança percentual do diâmetro do eixo menor do ventrículo esquerdo que ocorre na sístole) quanto a fração de ejeção (fração do volume de sangue recebido durante a diástole que é ejetada durante a sístole). Podemos sugerir, portanto, que houve prejuízo na função sistólica, sem no entanto afetar a função diastólica.

Similarmente aos efeitos do 3NP, a huntingtina (proteína mutante expressa na Doença de Huntington) parece ser responsável por alterações cardíacas similares, sugerindo-se que a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo sejam o ponto chave na função miocárdica, podendo contribuir com os prejuízos na função sistólica e diastólica na DH (Mihm et al., 2007).

6.3.2 Avaliação do perfil hemodinâmico (Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Média (PAM), Pressão Arterial Diastólica e Frequência Cardíaca (FC).

Camundongos em condições saudáveis, de mesma idade e sexo, podem apresentar uma FC basal ou de repouso variável, de acordo com dados descritos na

literatura, podendo variar entre 675 bpm (Ishii et al., 1996), 550 bpm (Li et al., 1999) e 515 bpm (Senador et al., 2009).

Essas variações podem ser influenciadas por múltiplos fatores, sobretudo por diferentes condições experimentais: efeito da cirurgia de implantação das cânulas, efeito de isolamento do animal (Negrão et al., 1992; Just et al., 2000), podendo variar no mesmo indivíduo de 350 a 750 ao longo do dia (Johanson e Thoren, 1997); por isso a importância da padronização do procedimento experimental e de um horário fixo para as mensurações, fatores estes controlados em nosso estudo.

Com as mensurações indiretas (pletismografia), observamos um aumento de 9,27% na frequência cardíaca, no entanto, a pressão arterial não se alterou. A medida direta revelou consistentemente um aumento de 9,97% na FC de repouso. O aumento de FC pode ocorrer em função de múltiplos fatores: em função de um aumento da atividade simpática (Bacurau et al., 2009; Mostarda et al., 2009), em função da diminuição da atividade parassimpática (De la Fuente et al., 2009), ou alterações reflexas (Mostarda et al., 2011), decorrendo de adaptações autonômicas para a manutenção da atividade cardíaca (Brum et al., 2002).

O efeito hipotensor do 3NP, descrito anteriormente em estudos *in vitro* (Castillo et al., 1993; Castillo et al., 1994; Lopez et al., 1998) também poderia gerar aumento de FC, como adaptação para que o débito cardíaco fosse mantido, o que curiosamente não foi observado pelos autores. No presente estudo, porém não detectamos alterações pressóricas, mas a FC subiu, possivelmente, como resposta adaptativa à diminuição do tônus vagal.

6.3.3 Neuromodulação autonômica cardíaca (Participação do sistema nervoso autônomo no controle da frequência cardíaca basal)

A FC e a PA são controladas por mecanismos diferentes, mas moduladas de forma antagônica pelo sistema nervoso autônomo; portanto, a avaliação da FC e PA, e da resposta a diferentes estímulos, são importantes indicadores da atividade simpática e parassimpática no coração (Negrão et al., 1992; De Angelis et al., 2004; Bacurau et al., 2009; Mostarda et al., 2011).

O equilíbrio do balanço simpato-vagal, na modulação da FC e PA, tem fundamental importância na manutenção da homeostase da função cardíaca, uma vez que constituem a regulação neural integrativa do coração (Cheryl et al., 1999); portanto,

mensurações dos níveis de participação das alças de inervação autonômica (simpática e parassimpática) na FC e na PA constituem fator de extrema importância na avaliação das respostas deste sistema associadas às adaptações ou distúrbios cardíacos (Negrão et al., 1992; De Angelis et al., 2004; De la Fuente et al., 2004).

Sendo assim, a avaliação das respostas obtidas nestes parâmetros hemodinâmicos, pela inibição do sistema nervoso autônomo, através do duplo bloqueio farmacológico dos receptores β -adrenérgicos e muscarínicos (método utilizado no presente estudo), com a utilização de drogas β -bloqueadoras (propranolol) e anticolinérgicas (atropina) constituem um importante, e amplamente utilizado método de detecção de alterações autonômicas em condições normais ou patológicas, em ratos (Negrão et al. 1992; Brum et al., 2002), e camundongos (Just et al., 2000; De Angelis et al., 2004).

Respostas como taquicardias moderadas (efeito simpático) e bradicardias mais acentuadas (efeito parassimpático) à aplicação da atropina e propranolol respectivamente em relação à FC basal dos animais do grupo controle, demonstram um efeito simpático maior do que o efeito vagal. Essa é uma característica consensual na literatura e reflete uma predominância simpática da inervação autonômica no camundongo (simpatotônico) (Just et al., 2000; De Angelis et al., 2004).

Com a aplicação do método de duplo bloqueio farmacológico para avaliarmos a modulação da FC, foi possível detectar que a indução por 3NP (60 mg.kg^{-1} por dia durante 4 dias) provocou alterações no balanço simpato-vagal, causando uma redução de 67,7% no tônus vagal, indicando alterações intrínsecas no marca-passo cardíaco. Observamos também um efeito de borda no efeito vagal; sugere-se que com um n maior de animais talvez fosse possível detectarmos alterações estatisticamente significativas, com resposta bradicárdica acentuada à aplicação dos bloqueadores β -adrenérgicos. Ambas as alterações sugerem prejuízo na função vagal (Cerati e Schwartz, 1991; Negrão et al., 1992; Schwartz et al., 1992).

Lopez et al. (1998), identificaram alterações no marca-passo cardíaco de ratos, em função da aplicação do 3NP. Estudando *in vitro* átrios isolados em solução orgânica, observou-se que a adição de 3NP (10^{-4} mol/L) por 15 minutos causou bradicardia e diminuição dos níveis de ATP, comparados com os controles. Estes autores encontraram também em mitocôndrias cardíacas isoladas redução no consumo de O_2 .

Outros estudos *in vitro* demonstraram evidências de que o 3NP afeta a fisiologia cardíaca de espécies animais distintas, possuindo efeitos vasodilatadores em anéis aórticos de cobaia e depressores diretos no coração (Castillo et al., 1993), bradicardia e redução da força de contração em átrios de cobaia (Castillo et al., 1994), hipotensão e bradicardia em cães (Hong et al., 1990). Estes autores sugerem que a bradicardia se dê por influência do 3NP nos receptores adrenérgicos, o que explicaria sua ação cardiodepressora.

Experimentos *in vivo* de Gabrielson et al, (2001), com diferentes linhagens de camundongos demonstraram resultados moleculares semelhantes, com redução dos níveis de ATP e de respiração mitocondrial, sugerindo que os efeitos cardiotóxicos do 3NP estejam de fato associados às disfunções mitocondriais; contudo, estes autores não realizaram, concomitantemente, estudos hemodinâmicos e morfofuncionais.

Os efeitos do 3NP, especialmente no componente parassimpático é um risco em potencial, pois a hipoatividade vagal constitui fator de risco para a morte súbita, sendo que a estimulação do componente parassimpático, de modulação de frequência cardíaca, desempenha papel cardioprotetor importante na medida em que previne a arritmogenese (Eckberg et al., 1971; Wolf et al., 1978; Billman et al., 1982), sendo sua preservação benéfica também na manutenção da variabilidade da PA com proteção a lesões de órgãos alvo (Su e Miao, 2001; Berni et al., 2004). Sendo que o aumento nos índices da atividade parassimpática constitui fator importante de combate a morte súbita relacionada à problemas cardíacos (Cole et al., 1999).

O 3NP parece afetar, basicamente, o componente intrínseco da inervação autonômica do coração. No entanto, não se pode excluir a possibilidade de alterações reflexas (barorreceptores), visto que o tônus vagal cardíaco é modulado reflexamente pelos pressorreceptores (Daly 1995; Jordan 1995). Nem excluir que algum outro componente da via colinérgica seja afetado pelo 3NP, uma vez que alterações em qualquer componente dessa via pode alterar a função vagal (Bibevski e Dunlap, 1999).

Do ponto de vista clínico, uma característica potencialmente perigosa dos problemas cardíacos relacionados à doença de Huntington, são as alterações na inervação autonômica do coração, observada nos portadores da DH. Os pacientes comumente apresentam desregulação do SNA cardíaco, afetando os ramos simpático (Kobal et al., 2004) e parassimpático (Sharma et al., 1999; Andrich et al., 2002; Bär et al.,

2008), alterações que podem inclusive manifestar-se em estágios pré-sintomáticos da doença (Kobal et al., 2004; Aziz et al., 2010).

6.4 Estrutura do GE

6.4.1 Forma e localização

O 3-NP não causou alterações na forma e localização, todos os gânglios estrelados esquerdos eram de forma irregular e envolvidos por uma cápsula de tecido conjuntivo, que produziu septos de tecido conjuntivo no interior do gânglio, dividindo-os em várias unidades ganglionares. Este padrão geral está em linha com estudos qualitativos anteriores com foco no gânglio simpático de vários grandes mamíferos, como cães (Ribeiro et al., 2002; Gagliardo et al., 2005), coelhos (Sasahara et al., 2003) capivaras e cavalos (Ribeiro; Davis; Gabella, 2004; Loesch et al., 2010). Quanto à sua localização e posicionamento, não apresentou alterações relevantes durante o desenvolvimento pós-natal, estando em concordância com as descrições feitas em outros roedores e mamíferos (Gabella, 2004; Cavalcanti et al., 2009). Em relação aos parâmetros macromorfológicos, não se observou alterações na largura e comprimento.

6.4.2 Parâmetros estereológicos

A hipertrofia do gânglio é amplamente conhecida como um mecanismo adaptativo em muitos gânglios autonômicos para mamíferos de médio e grande porte (Miolan; Niel, 1996; Gagliardo et al., 2005; Fioretto et al., 2007; Toscano et al., 2009; Ladd et al., 2012), e devido ao acréscimo de estruturas intraganglionares, porém não neuronais (Ribeiro; Davis; Gabella, 2004; Ribeiro, 2006; Abrahão et al., 2009; Melo et al., 2009), ao aumento no número neuronal (Melo et al., 2009) e/ou do volume neuronal (Ladd et al., 2012).

Dentre as estruturas intraganglionares não neuronais, torna-se mais evidenciado, o tecido conjuntivo e o tecido vascular, representados principalmente por fibras colágenas e capilares sanguíneos, respectivamente, como observado em outros roedores silvestres (Ribeiro; Davis; Gabella, 2004; Ribeiro, 2006; Abrahão et al., 2009; Melo et al., 2009). Esta variação no volume total dos tecidos vasculares e dos tecidos conjuntivos pode ocorrer devido a uma possível sobrecarga funcional provocada pelo 3-NP uma vez que este causa stress oxidativo nas células, e este stress oxidativo pode ser o responsável pela hipertrofia observada nos neurônios, como resposta adaptativa.

O volume do tecido não neuronal em GEs de animais induzidos com 3-NP apresentou um efeito de borda ($p=0,06$), que não é estatisticamente significativo, mas pode ter significado funcional, uma vez que houve um aumento de 75% no volume de tecido não neuronal, o que pode representar uma reação adaptativa ao stress oxidativo desencadeado pelo 3-NP.

Neste estudo, verificou-se qualitativamente a distribuição dos neurônios demonstrando neurônios densamente distribuídos e separados por espaços ocupados principalmente por neurópilo (neuritos e células gliais), vasos sanguíneos e tecido conjuntivo (Abrahão et al., 2009; Melo et al., 2009; Toscano et al., 2009).

Conclusões

7 Conclusões

A partir dos métodos empregados e resultados obtidos, podemos concluir que:

- 1) O 3-NP pode ser considerado um modelo para se estudar os efeitos da DH na estrutura e função cardíaca, sendo que estas alterações induzidas pelo 3-NP assemelham-se às alterações cardíacas na DH humana.
- 2) Os efeitos cardíacos citados ocorrem concomitantemente ao surgimento de sintomas motores da indução (associados à degeneração seletiva do corpo estriado).
- 3) Os neurônios autonômicos pós-ganglionares sofrem hipertrofia.

8 Outras Considerações

Esta dissertação integra uma das linhas de investigação científica do Laboratório de Estereologia Estocástica e Anatomia Química (LSSCA), na qual foram conduzidas análises sobre as alterações causadas pelo 3-NP na estrutura e função do miocárdio do ventrículo esquerdo de camundongos.

Essa dissertação contou com o apoio do Prof. Dr. Fernando Vagner Lobo Ladd (Departamento de Morfologia do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (DMOR/UFRN)).

9 Referências

- Abdi, S.; Yang, Z. A novel technique for experimental stellate ganglion block in rats. **Anesth Analg**, v.101(2) p. 561-5, 2005.
- Abrahão, L. M. B.; Nyengaard, J. R.; Sasahara, T. H. C.; Gomes, S. P.; Oliveira, F. da R.; Ladd, F. V. L.; Ladd, A. A. B. L.; Melo, M. P. de ; Machado, M. R. F.; Melo, S. R.; Ribeiro, A. A. C. M. Asymmetric post-natal development of superior cervical ganglion of paca (Agouti paca). **Int. J. Devl Neuroscience**, v.27, p. 37-45, 2009.
- Alexi, T.; Hughes, P.E.; Knusel, B.; Tobin, A.J. Metabolic compromise with systemic 3-nitropropionic acid produces striatal apoptosis in Sprague-Dawley rats but not in BALB/c ByJ mice. **Exp. Neurol.**, v. 153, p. 74-93, 1998.
- André, V.M.; Cepeda. C.; Levine, M.S. Dopamine and Glutamate in Huntington's Disease: A Balancing Act. **CNS Neuroscience & Therapeutics** , v.16, p.163-178, 2010.
- Andreassen, O.A.; The mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid induces vacuous chewing movements in rats. Implications for the tardive dyskinesia. **J Psychopharmacol.**, v. 119, p. 474-476, 1995.
- Andrews, T.J. Autonomic nervous system as a model of neuronal aging: the role of target tissues and neurotrophic factors. **Microscopic Research and Technique**, v. 35, p. 2-19, 1996.
- Andrich, J.; Schmitz, T.; Saft, C.; Postert, T.; Kraus, P.; Epplen, J. T.; Przuntek, H.; Agelink, M. W. Autonomic nervous system function in Huntington's disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v.72, p. 726-731, 2002.
- Armour, J.A. Synaptic transmission in the chronically decentralized middle cervical and stellate ganglia of the dog. **Canadian Journal Physiology Pharmacology**, v. 61, p. 1149-1155, 1983.
- Ardell, J. L., Structure and function of mammalian intrinsic cardiac neurons. In: Armour, JA, Ardell JL, editors. Neurocardiology. 2nd edition. New York: Oxford University Press. p. 95-114, 1994.
- Armstrong, A; Ryu, Y. K.; Chieco, D.; Kuruvilla, R. Frizzled is required for neurogenesis and target innervation during sympathetic nervous system development. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, p. 2371-2381, 2011.
- Aziz, N.A.; Anguelova, G.V.J.; Marinusa, J.G.; Van, D.; Roos, R.A.C. Autonomic symptoms in patients and pre-manifest mutation carriers of Huntington's disease. **European Journal of Neurology**, v.17, p. 1068-1074, 2002.
- Bär, K. J.; Boettger, M. K.; Andrich, J.; Epplen, J. T.; Fischer, F.; Cordes, J.; Koschke, M.; Agelink, M. W. Cardiovagal modulation upon postural change is altered in Huntington's disease. **European Journal of Neurology**, v.15, p. 869-871, 2008.

- Bacurau, A.V.N.; Jardim, M.A.; Ferreira, J.C.B.; Bechara, L.R.G.; Bueno, C.R.J.; Alba-Loureiro, T.C.; Negrão, C.E.; Casarini, D.E.; Curi, R.; Ramires, P.R.; Moriscot, A.S.; Brum, P.C. Sympathetic hyperactivity differentially affects skeletal muscle mass in developing heart failure: role of exercise training. **J Appl Physiol.**, v. 106, p. 1631-1640, 2009.
- Barsottini, O.G.P. Doença de Huntington. O que é preciso saber? **Einstein: Educ Contin Saúde**, v.5, p. 83-88, 2007.
- Beal, M. F.; Brouillet, E.; Jenkins, B.G.; Ferrante, R.J.; Kowall, N.W.; Miller, J.M.; Storey, E.; Srivastava, R.; Rosen, B.R.; Hyman, B.T. Neurochemical and Histologic Characterization of Striatal Excitotoxic Lesions Produced by the Mitochondrial Toxin 3-Nitropropionic Acid. **The Journal of Neuroscience**, v. 13(10), p. 4181-4192, 1993.
- Beal, M.F. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? **Ann Neurol.**, v. 31, p. 119-130, 2007.
- Bergman, E.; Ulfhake, B. Loss of primary sensory neurons in the very old rat: neuron number estimates using the dissector method and confocal optical sectioning. **Journal of Comparative Neurology**, v. 396, p. 211-222, 1998.
- Berni, V.; Fiorino, P.; Irigoyen, M. C.; Lacchini, S. Endorgan damage and cardiac dysfunction in sinoaortic denervation induced ap lability in rats. **Journal of Hypertension**, v. I, p. 22-27, 2004.
- Bibevski, S.; Dunlap, M.E. Ganglionic mechanisms contribute to diminished vagal control in heart failure. **Circulation**, v. 99, p. 2958-2963, 1999.
- Billman, G.E.; Schwartz PJ, Stone HL. Baroreceptor reflex control of heart rate: a predictor of sudden cardiac death. **Circulation.**, v. 66(4), p. 874-80, 1982.
- Bizat, N.; Hermel, J.; Humbert, S.; Jacquard, C.;Créminon, C.;Escartin, C.; Saudou, F.; Krajewski, S.;Hantraye, P.;Brouillet, E. In Vivo Calpain/Caspase Cross-talk during 3-Nitropropionic Acid-induced Striatal Degeneration. **The journal of biological chemistry**, v. 278 (44), p. 43245-43253, 2003.
- Brouillet, E.; Guyot, M.;Mittoux, V.;Altairac, S.; Condé F.; Palfi, S.; Hantraye, P. Partial Inhibition of Brain Succinate Dehydrogenase by 3-Nitropropionic Acid Is Sufficient to Initiate Striatal Degeneration in Rat. **Journal of Neurochemistry**, v. 70 (2) p. 794-805, 1998.
- Brouillet, E.; Condé, F.; Beal, M.F.; Hantraye, P. Replicating Huntigton's disease phenotype in experimental animals. **Prog Neurobiol.**, v. 59, p. 427-468, 1999.
- Brouillet, E.; Jacquard, C.; Bizat, N.; Blum, D. 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 95 p. 1521-1540, 2005.

- Browne, S.E.; Ferrante, R.J.; Beal, M.F. Oxidative stress in Huntington's disease. **Brain Pathol.**, v. 9, p. 147-163, 1999.
- Brugnaro, M; De Souza, R. R; Ribeiro, A. A. C. M. Extrinsic Cardiac Nerve Segments in the Domestic Dog (*Canis Familiaris* – Linnaeus, 1758). Comparative Study in Young and Adult Dogs. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 32, p. 117-232, 2003.
- Brum, P.C., Kosek, J., Patterson, A., Bernstein, D., Kobilka, B. Abnormal cardiac function associated with sympathetic nervous system hyperactivity in mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 283(5), p. 1838-45, 2002.
- Cabello, C.R.; Thune, J.J.; Pakkenberg, H.; Pakkenberg, B. Ageing of substantia nigra in humans: cell loss may be compensated by hypertrophy. **Neuropathology Applied Neurobiology**, v. 28, p. 283-291, 2002.
- Calupca, M. A.; Vizzard, M. A.; Parsons, R. L. Origin of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP)- Immunoreactive Fibers Innervating Guinea Pig Parasympathetic Cardiac Ganglia. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 426, p. 26-39, 2000.
- Cao, J.M.; Chen, L.S.; KenKnight, B.H.; Ohara, T.; Lee, M.H.; Tsai, J.; Lai, W.W.; Karagueuzian, H.S.; Wolf, P.L.; Fishbein, M.C.; Chen, P.S. Nerve sprouting and sudden cardiac death. **Circ Res.**, v. 86(7), p. 816-21, 2000.
- Castillo, C.; Valencia, I.; Reyes, G.; Hong, E. 3-Nitropropionic acid, obtained from astragalus species, has vasodilator and antihypertensive properties. **Drug Dev Res.**, v. 28, p. 183-188, 1993.
- Castillo, C.; Reyes, G.; Rosas-lezama, M.A.; Valencia, I.; Hong, E. Analysis of the cardiodepressor action of 3-nitropropionic acid. **Proc. West. Pharmacol. Soc.** v. 37, p. 41-42, 1994.
- 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. **J Neurosci Res.** v. 87(6), p. 1334-42, 2009.
- Cayzac, S.; Delcasso, S.; Paz, V.; Jeantet, Y.; Cho, Y.H. Changes in striatal procedural memory coding correlate with learning deficits in a mouse model of Huntington disease. **PNAS**, v. 108, p. 9280-9285, 2011.
- Cerati, D.; Schwartz, P.J. Single cardiac vagal fiber activity, acute myocardial ischemia, and risk for sudden death. **Circ Res.**, v.69(5), p. 1389-1401, 1991.
- Cheryl, C.H.Y.; Kuo, B.J. Assessment of cardiac sympathetic regulation by respiratory-related arterial pressure variability in the rat. **J Physiol.**, v. 515 (3), p. 887-889, 1999.
- Chiu, E.; Alexander, E.H. Causes of death in Huntigton's disease. **Med J Aust.**, v.1 (4), p. 153, 1982.

- Cinca, J.; Evangelista, A.; Montoyo, J.; Barutell, C.; Figueras, J.; Valle, V.; Rius, J.; Soler-Soler, J. Electrophysiologic effects of unilateral right and left stellate ganglion block on the human heart. **Am Heart J**, v. 109 (1) p. 46-54, 1985.
- Cole, C.R., Blackstone, E.H., Pashkow, F.J., Snader, C.E., Lauer, M.S. Heart-rate recovery immediately after exercise as a predictor of mortality. **N Engl J Med**, v. 341(18), p. 1351-7, 1999.
- Conneally, P.M. Huntington diseases: genetics and epidemiology. **Am J Hum Genet**, v.36, p. 506-526, 1984.
- Daly, M.B. Aspects of the integration of the respiratory and cardiovascular systems in: cardiovascular regulation, Ed. Jordan D.; Marshall, L. Londres: Physiological Society / **Portland Press**, p. 15-25, 1995.
- De Angelis, K.; Wich, R.B.; Jesus, W.R.A.; Moreira, E.D.; Morris, M.; Krieger, E.M.; Irigoyen, M.C. Exercise training changes autonomic cardiovascular balance in mice. **J Appl Physiol**, v. 96, p. 2174-2178, 2004.
- De La Fuente, R. N.; Soares, P.P.S.; Godinho, R.; Paulini, F.J.; Irigoyen, M.C. Enhancement of vagalmediated heart rate responsiveness by cholinergic stimulation in rats. **Journal of Hypertension**, v.22, p. 16, 2004.
- Delmaire, C.; Dumas, E.M.; Sharman, M.A.; Bogaard, S.J.A.V.; Valabregue, R.; Jauffret, C.; Justo, D.; Reilmann, R.; Stout, J.C.; Craufurd, D.; Tabrizi, S.J.; Roos, R.A.C.; Durr, A.; Lehericy, S. The Structural Correlates of Functional Deficits in Early Huntington's Disease. **Human Brain Mapping**, v. 24, p. 512-520, 2012.
- Den Heijer, J.C.; Bollen, W.L.E.M.; Reulen, J.P.H. Autonomic nervous function in Huntington's Disease. **Arch Neurol**, v.45, p. 309-312, 1988.
- Docimo, S. Jr; Piccolo, C., Van Arsdale, D.; Elkowitz, D.E. Pathology-dependent histological changes of the left stellate Ganglia: a cadaveric study. **Clin Med Pathol**, v. 1, p. 105-13, 2008.
- Eckberg, D.L., Drabinsky, M., Braunwald, E. Defective cardiac parasympathetic control in patients with heart disease. **N Engl J Med**. v. 285(16), p. 877-83, 1971.
- Fard, A.; Wang, C.Y.; Takuma, S.; Skopicki, H.A.; Pinsky, D.J.; Di Tulio, M.R.; Homma, S. Noninvasive assessment and necropsy validation of changes in left ventricular mass in ascending aortic banded mice. **J Am Soc Echocardiogr**, v. 13, p. 582-587, 2000.
- Fernagut, P.O.; Diguët, E.; Stefanova, N.; Biran, M.; Wenning, G. K.; Canioni, P.; Bioulac, B.; Tison, F. Subacute systemic 3-nitropropionic acid intoxication induces a distinct motor disorder in adult c57bl/6 mice: behavioural and histopathological characterization. **Neuroscience**, v. 114 (4), p. 1005-1017, 2002.

Fioretto, E.T; De Abreu, R.N; Castro, M.F; Guidi, W.L; Ribeiro, A.A. Macro and Microstructure of the Superior Cervical Ganglion in dogs, cats and horses during maturation. **Cells, Tissues, Organs**, v. 186, n. 2, p. 129-140, 2007.

Gabella, G. Autonomic Nervous System. **The rat nervous system** (Third edition), p. 77-119, Elsevier, 2004.

Gabrielson, K.L.; Hogue, B.A.; Bohr, V.A. Mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid induces cardiac and neurotoxicity differentially in mice. **Am. J. Pathol.**, 159, 1507-1520, 2001.

Gagliardo, K.M.; Balieiro, J.C.C.; De-Souza, R.R.; Ribeiro, A.A.C.M. Postnatal-related changes in the size and total number of neurons in the caudal mesenteric ganglion of dogs: total number of neurons can be predicted from body weight and ganglion volume. **The Anatomical Record, Parte A**: 286A. p. 917-929, 2005.

Ghanem, A., Röhl, W., Hashemi, T., Dewald, O., Djoufack, P.C., Fink, K.B., Schrickel, J., Lewalter, T., Lüderitz, B., Tiemann, K. Echocardiographic assessment of left ventricular mass in neonatal and adult mice: accuracy of different echocardiographic methods. **Echocardiography**, v. 23(10), p. 900-7, 2006.

Giampa, C.; Laurenti, D.; Anzilotti, S.; Bernardi, G.; Menniti, F.S.; Fusco, F.R. Inhibition of the Striatal Specific Phosphodiesterase PDE10A Ameliorates Striatal and Cortical Pathology in R6/2 Mouse Model of Huntington's Disease. **Plos one**, v.5, 2010.

Gould, D.H.; Gustine, D.L. Basal ganglia degeneration, myelin alterations and enzyme inhibition induced in mice by the plant toxin 3-nitropropionic acid. **Neuropathol Appl Neurobiol.**, v. 8, p. 377-393, 1982.

Gundersen, H.J.G., Bagger, P., Bendtsen, T.F. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**. v. 96, p. 857-881, 1988.

Gundersen, H. J. G.; Jensen, E. B. V.; Kiêu, K.; Nielsen, J. The efficiency of systematic sampling in stereology — reconsidered. **Journal of Microscopy**, 193: 199–211, 1999.

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

Gusella, J.F.; Macdonald, M.E. Huntingtin: a single bait hooks many species. **Neurobiology**. v. 8, p. 425-430, 1998.

Guyot, M.C.; Hantraye, P.; Dolan, R., Palfi, S., Mazière, M., Brouillet E. Quantifiable bradykinesia, gait abnormalities and Huntington's disease-like striatal lesions in rats chronically treated with 3-nitropropionic acid. **Neuroscience**, v. 79(1), p. 45-56, 1997.

Guyton, A.C.; Hall, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 10ª Edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2002.

Hasan, W.; Smith, P. G. Modulation of rat parasympathetic cardiac ganglion phenotype and NGF synthesis by andrenergic nerves. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 145, p. 17-26, 2009.

Hanamatsu, N.; Yamashiro, M.; Sumitomo, M.; Furuya, H. Effectiveness of cervical sympathetic ganglia block on regeneration of the trigeminal nerve following transection in rats. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v. 27, n.3, p. 268-276, 2002.

Harper, P.S. **Huntington's Disease** (2nd edn), WB Saunders, London, 1996.

Hickey, M.A.; Morton, A.J.; Mice transgenic for the huntington's disease mutation are resistant to chronic 3-nitropropionic acid-induced striatal toxicity. **Journal of Neurochemistry** vol. 75 (5), 2000.

Hong, E.; Castillo, C., Rivero, I.; Somanathan, R. Vasodilator and antihypertensive actions of 3-nitropropionic acid. **Proc. West. Pharmacol. Soc.** V. 33 p. 209-211, 1990.

Howard, C.V.; Reed, M.G. **Unbiased Stereology. Three-dimensional Measurement in Microscopy**, QTP Publications, Liverpool, 2010.

Hou, Y.; Shcerlag, B. J.; Lin, J.; Zhang, Y.; Lu, Z.; Truong, K.; Petterson, E.; Lazzara, R.; Jackman, W. M.; PO,S. P. Ganglionated Plexi Modulate Extrinsic Cardiac Autonomic Nerve Input. **Journal of the American College of Cardiology**, v.50, n.1, 2007.

Huntington's disease collaborative research group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. **Cell** 72, 971-983, 1993.

Ishii, K., Kuwahara, M., Tsubone, H., Sugano, S. Autonomic nervous function in mice and voles (*Microtus arvalis*): investigation by power spectral analysis of heart rate variability. **Lab Anim.** V. 30(4), p. 359-64, 1996.

Johansson, C., Thorén, P. The effects of triiodothyronine (T3) on heart rate, temperature and ECG measured with telemetry in freely moving mice. **Acta Physiol Scand.**, v. 160(2), p. 133-8, 1997.

Johns, C.; Gavras, I.; Handy, D.E.; Salomao, A.; Gavras, H. Models of experimental hypertension in mice. **Hypertension**, v. 28 (6): 1064-1069, 1996.

Jordan, D. Central nervous regulation. In: Cardiovascular regulation, Ed. D. Jordan e J. Marshall. Londres: Physiological, Society / **Portland Press**, p. 03-16, 1995.

Just, A., Faulhaber J., Ehmke H. Autonomic cardiovascular control in conscious mice. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v. 279(6), p. 2214-21, 2000.

- Kobal, J.; Meglic, B.; Mesec, A.A.; Peterlin, B. Early sympathetic hyperactivity in Huntington's disease. **Eur J Neurol.**, v. 11, p. 842-848, 2004.
- Kobal, J.; Melik, Z.; Cankar, K.; Bajrovic, F.F.; Meglic, B.; Peterlin, B.; Zaletel, M. Autonomic dysfunction in presymptomatic and early symptomatic Huntington's Disease. **Acta Neurol Scand.**, v. 121, p. 392-399, 2010.
- Krout, K. E.; Mettenleiter, T.C.; Loewy, A.D. Single Cns Neurons Link Both Central Motor And Cardiosympathetic Systems: A Double-Virus Tracing Study. **Neuroscience**, v. 118, p. 853-866, 2003.
- Ladd, A.A.; Ladd, F.V.; Da Silva, A.A.; Oliveira, M.F., De Souza, R.R.; Coppi, A.A. SCG postnatal remodelling – hypertrophy and neuron number stability – in Spix's Yellow-toothed Cavies (Galea spixii). **International Journal of Developmental Neuroscience**, 2012.
- Lang, R.M.; Bierig, M.; Devereux, R.B.; Flachskampf, F.A.; Foster, E.; Pellikka, P.A.; Picard, M.H.; Roman, M.J.; Seward, J.; Shanewise, J.S.; Solomon, S.D.; Spencer, K.T.; Sutton, M.S.; Stewart, W.J. Chamber Quantification Writing Group; American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee; European Association of Echocardiography. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. **J Am Soc Echocardiogr.**, v. 18(12), p. 1440-1463, 2005.
- Lanska, D.J.; Lavine, M.J.; Schoenberg, B.S. Huntington's disease mortality in the United States. **Neurology**, v.38 (5), p. 769-772, 1988.
- Leger, J; Croll, R.P; Smith, F.M. Regional distribution and extrinsic innervation of neurons in the guinea-pig atria. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 407, p. 303-317, 1999.
- Lerch, J.P.; Carroll, J.B.; Spring, S.; Bertram, L.N.; Schwab, C.; Hayden, M.R.; Henkelman, R.M. Automated deformation analysis in the YAC128 Huntington disease mouse model. **Elsevier Inc**, 2007.
- Lujan, H. L.; Palani, G.; Chen, Y.; Peduzzi, J. D.; DiCarlo, S. E. Targeted ablation of cardiac sympathetic neurons reduces resting, reflex and exercise-induced sympathetic activation in conscious rats. **American Journal of Physiology**. Heart and Circulatory Physiology, v. 296, p. 1305-1311, 2009.
- Li, P.; Sur, S.H.; Mistlberger, R.E.; Morris, M. Circadian blood pressure and heart rate rhythms in mice. **Am J Physiol.**, v. 276(2 Pt 2), p. R500-4, 1999.
- Ligot, N.; Krystkowiak, P.; Simonin, C.; Goldman, S.; Peigneux, P.; Naemen, J.V.; Monclus, M.; Lacroix, S.F.; Devos, D.; Dujardin, K.; Delmaire, C.; Bardinet, E.; Delval, A.; Delliaux, M.; Defebvre, L.; Yelnik, J.; Blond, S.; Destée, A.; Tiège, X. External globus pallidus

- stimulation modulates brain connectivity in Huntington's disease. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v.31, p.41–46, 2011.
- Loesch, A.; Mayhew, T.M.; Tang, H.; Ladd, F.V.; Ladd, A.A.; de Melo, M.P.; da Silva, A.A.; Coppi, A.A. Stereological and allometric studies on neurons and axo-dendritic synapses in the superior cervical ganglia of rats, capybaras and horses. **Cell Tissue Res.**, v. 341(2) p. 223-37, 2010.
- Lopez, P.S.; Castillo, C.H.; Pastelín, G.H.; Hernández, M.R.; Suárez, M.J.; Sánchez, M.L.; Escalante, B.A. Characterization of 3-nitropropionic acid-induced bradycardia in isolated atria. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v. 148(1), p. 1-6, 1998.
- Mayhew, T.M.; Oslen, D.R. Magnetic resonance imaging (MRI) and model-free estimates of brain volume determined using the Cavalieri principle. **J Anat.**, v. 178, p. 133-44, 1991.
- Masliukov, P. M.; Timmermans, J. P. Immunocytochemical properties of stellate ganglion neurons during early postnatal development. **Histochemistry and Cell Biology**. v. 122, p. 201-209, 2004
- Maslyukov, P.M. Preganglionic Inputs to the Stellate Ganglion of the Cat During Postnatal Ontogenesis. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, v.35, 2005.
- Maslyukov, P. M; SHILKIN, V. V; TIMMERMAN, J. P. Immunocytochemical characteristics of neurons in the stellate ganglion of the sympathetic trunk in mice during postnatal ontogenesis. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, v. 36, n. 8, 2006.
- Melo, S. R.; Nyengaard, J. R.; Oliveira, F. R.; Ladd, F.; Abrahao, L. M. B.; Machado, M. R. F.; Sasahara, T. H. C.; De Melo, M. P.; Ribeiro, A. A. C. M. The developing left superior cervical ganglion of pacas (*Agouti paca*). **The Anatomical Record**, v. 292, p. 132-142, 2009.
- Mihm, M.J.; Amann, D.M.; Schanbacher, B.L.; Altschuld, R. A.; Bauer, J.A.; Hoyt, K.R. Cardiac dysfunction in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. **Neurobiol Dis.**, v. 25(2), p. 297–308, 2007.
- Miolan, J.; Niel, J. The mammalian sympathetic prevertebral ganglia: integrative properties and role in the nervous control of digestive tract motility. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 58, p. 125–138, 1996.
- Mo. N.; Wallis, D.I.; Watson, A. Properties of putative cardiac and non-cardiac neurons in the rat stellate ganglion. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 47, p. 7-22, 1994.
- Mostarda, C.; Rodrigues, B.; Vane, M., Moreira, E.D.; Rosa, K.T., Moraes-Silva, I.C.; Lacchini, S.; Casarini, D.E.; De Angelis, K.; Irigoyen, M.C. Autonomic impairment after myocardial infarction: role in cardiac remodelling and mortality. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v. 37(4), p. 447-52, 2010.

- Mostarda, C.; Moraes-Silva, I.C.; Moreira, E.D.; Medeiros, A., Piratello, A.C.; Consolim-Colombo, F.M., Caldini, E.G., Brum, P.C., Krieger, E.M., Irigoyen, M.C. Baroreflex sensitivity impairment is associated with cardiac diastolic dysfunction in rats. **J Card Fail.**, v. 17(6), p. 519-25, 2011.
- Negrão, C.E.; Moreira, E.D.; Brum, P.C.; Denadai, M.L.; Krieger, E.M. Vagal and sympathetic control of heart rate during exercise by sedentary and exercise-trained rats. **Braz J Med Biol Res.**, v. 25(10), p. 1045-52, 1992.
- Nyengaard, J.R.; Gundersen, H. The isector: a simple and direct method for generating isotropic, uniform random sections from small specimens. **J Microsc.**, v.165, p. 427-431, 1992.
- Nozdrachev, A.D.; Jiménez, B.; Morales, M.A.; Fateev, M.M. Neuronal organization and cell interactions of the cat stellate ganglion. **Auton Neurosci.**, v. 10;95(1-2) p. 43-56, 2002.
- Oliveira, J.M. Nature and cause of mitochondrial dysfunction in Huntington's Disease: focusing on Huntington and the striatum. **J Neurochem.**, v. 114(1), p.01-12, 2010.
- Palfi, S.; Ferrante, R.J. ; Brouillet, E.; Beal, M.F.; Doian, R.; Guyot, M.C.; Peschanski, M.; Hantraye, P. Chronic 3-Nitropropionic Acid Treatment in Baboons Replicates the Cognitive and Motor Deficits of Huntington's Disease. **The Journal of Neuroscience**, v. 16(9), p. 3019-3025, 1996.
- Palfi, S.; Leventhal, L.; Goetz CG, Hantraye T, Roitberg BZ, Sramek J, Emborg M, Kordower JH. Delayed onset of progressive dystonia following subacute 3-nitropropionic acid treatment in Cebus apella monkeys. **Mov Disord.**, v. 15(3), p. 524-30, 2000.
- Pardo, A.D.; Maglione, V.; Alpaugh, M.; Horkey, M.; Atwal, R.S.; Sassone, J.; Ciammola, A.; Steffan, J.S.; Fouad, K.; Truant, R.; Sipione, S. Ganglioside GM1 induces phosphorylation of mutant huntingtin and restores normal motor behavior in Huntington disease mice. **Neuroscience**. v. 109, p. 3528-3533, 2012.
- Pattison, J.S.; Sanbe, A.; Maloyan, A.; Osinska, H.; Klevitsky, R.; Robbins, J. Cardiomyocyte expression of a polyglutamine preamyloid oligomer causes heart failure. **Circulation**, v. 27, p. 2743-2751, 2008.
- Peng, Y.; Popovic, Z.B.; Sopko, N.; Drinko, J.; Zhang, Z.; Thomas, J.D.; Penn, M.S. Speckle tracking echocardiography in the assessment of mouse models of cardiac dysfunction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v. 297(2), p. H811-20, 2009.
- Ribeiro, A. A. C. M; Elias, C. F; Liberti, E. A; De Lima Guidi, W; De Souza, R. R. Structure and Ultrastructure of the Celiac-Mesenteric Ganglion Complex in the Domestic Dog (*Canis Familiaris*). **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 31, p. 344-349, 2002.

- Ribeiro, A. A. C. M.; Davis, C.; Gabella, G. Estimate of size and total number of neurons in superior cervical ganglion of rat, capybara and horse. **Anatomy and Embryology**, v.208, n. 208, p. 367-380, 2004.
- Ribeiro, A. A. C. M. Size and number of binucleate and mononucleate superior cervical ganglion neurons in Young capybaras. **Anatomy and Embryology**, v. 211, p. 607-617, 2006.
- Rosenstock, T.R.P.; Carvalho, A.C.; Jurkiewicz, A.; Frussa-filho, R.; Smaili, S.S. Mitochondrial calcium, oxidative stress and apoptosis in a neurodegenerative disease model induced by 3-nitropropionic acid. **Journal of Neurochemistry**, v. 88, p. 1220-1228, 2004.
- Ruiz-Velasco, V.; Puhl, H. L.; Fuller, B. C.; Sumner, A. D. Modulation of Ca²⁺ Channels by Opioid Receptor-Like 1 Receptors Natively Expressed in Rat Stellate Ganglion Neurons Innervating Cardiac Muscle. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 314, p. 987-994, 2005.
- Salemi, V.M.; Bilate, A.M.; Ramires, F.J.; Picard, M.H.; Gregio, D.M.; Kalil, J.; Neto, E.C.; Mady, C. Reference values from M-mode and Doppler echocardiography for normal Syrian hamsters. **Eur J Echocardiogr.**, v. 6(1), p. 41-46, 2005.
- Salemi, V.M.; Pires, M.D.; Cestari, I.N.; Cestari, I.A.; Picard, M.H.; Leirner, A.A.; Mady, C. Echocardiographic assessment of global ventricular function using the myocardial performance index in rats with hypertrophy. **Artif Organs.**, v. 28(4), p. 332-337, 2004.
- Sasahara, T.H. DE C.; De Souza, R.R.; Machado, M.R.F.; Da Silva, R.A.; Guidi, W.L.; Ribeiro, A.A.C.M. Macro and microstructural organization of the rabbit's celiac-mesenteric ganglion complex (*Oryctolagus cuniculus*). **Annals of Anatomy**, v. 185, p. 441-448, 2003.
- Sassone, J.; Colciago, C.; Cislighi, G.; Silani, V.; Ciammola, A. Huntington's disease: The current state of research with peripheral tissues. **Experimental Neurology**, v. 219, p. 385-397, 2009.
- Sathasivam, K.; Hobbs, C.; Turmaine, M.; Mangiarini, L.; Mahal, A.; Bertaux, F.; Wanker, E.E.; Doherty, P.; Davies, St.W.; Bates, G.P. Formation of polyglutamine inclusions in non-CNS tissue. **Hum Mol Genet.**, v. 8(5), p. 813-822, 1999.
- Schroeder, A.M.; Loh, D.H.; Jordan, M.C.; Roos, K.P.; Colwell, C.S. Baroreceptor reflex dysfunction in the BACHD mouse model of Huntington's Disease. **Plos Curr.**, v. 4(3), p. 1266, 2011.
- Schiller, N.B.; Acquatella, H.; Ports, T.A.; Drew, D.; Goerke, J.; Ringertz, H.; Silverman, N.H.; Brundage, B.; Botvinick EH, Boswell R, Carlsson E, Parmley WW. Left ventricular volume from paired biplane two-dimensional echocardiography. **Circulation.**, v. 60(3), p. 547-55, 1979.

- Schwartz, P.J.; Snedbold, N.G.; Brown, A.M. Effects of unilateral cardiac sympathetic denervation on the ventricular fibrillation threshold. **Am J Cardiol.**, v. 37(7), p. 1034-40, 1976.
- Schwartz, P.J.; Stone, H.L.; Brown, A.M. Effects of unilateral stellate ganglion blockade on the arrhythmias associated with coronary occlusion. **Am Heart J.**, v. 92(5), p. 589-99, 1976.
- Schwartz, P.J.; Brown, A.M. Left stellectomy in the prevention of ventricular fibrillation caused by acute myocardial ischemia in conscious dogs with anterior myocardial infarction. **Circulation.**, v. 62(6), p. 1256-65, 1980.
- Schwartz, P.J.; Rovere, M.T.L.; Vanoli, E. Autonomic nervous system and sudden cardiac death. **Circulation**, v. 85(1), p. 177-199, 1992.
- Senador, D.; Kanakamedala, K.; Irigoyen, M.C., Morris, M.; Elased, K.M. Cardiovascular and autonomic phenotype of db/db diabetic mice. **Exp Physiol.**, v. 94(6), p. 648-58, 2009.
- Sharma, K.R.; Romano, J.G.; Ram Ayyar, D. Sympathetic skin response and heart rate variability in patients with Huntington's Disease. **Arch Neurol**, v. 56, p. 1248-1252, 1999.
- Silva, R.H.; Abílio, V.C.; Torres-Leite, D.; Bergamo, M., Chinen, C.C.; Claro, F.T.; Carvalho R.C.; Frussa-Filho, R. Concomitant development of oral dyskinesia and memory deficits in reserpine-treated male and female mice. **Behav Brain Res.**, v. 14;132(2), p. 171-7, 2002.
- Song, J.G.; Hwang, G. S.; Lee, E. H.; Leem, J. G.; Lee, C., Park, P. H.; Shin, J. W. Effects of bilateral stellate ganglion block on autonomic cardiovascular regulation. **Circulation Journal: official journal of the Japanese Circulation Society**, v. 73, n. 10, p. 1909 – 1913, 2009.
- Sorensen, S.A.; Fenger, K. Causes of death in patients with Huntington's disease and in unaffected first degree relatives. **J Med Genet.**, v. 29, p. 911-914, 1992.
- Souza, S.B.C.; Flues, K.; Paulini, J.; Mostarda, C.; Rodrigues, B.; Souza, L.E.; Irigoyen, M.C.; De Angelis, K. Role of Exercise Training in Cardiovascular Autonomic Dysfunction and Mortality in Diabetic Ovariectomized Rats, **Hypertension.**, v. 50, p. 786-791, 2007.
- Su, D.F.; Miao, C.Y. Blood pressure variability and organ damage. **Clin Exper Pharmacol Physiol.**, v. 28, p. 709-715, 2001.
- Thompson, P.D.; Berardelli, A.; Rothwell, J.C.; Day, B.L., Dick, J.P., Benecke, R., Marsden, C.D. The coexistence of bradykinesia and chorea in Huntington's disease and its implications for theories of basal ganglia control of movement. **Brain.** v. 111(Pt 2), p. 223-44, 1988.

- Thu, D.C.V.; Oorschot, D.E.; Tippet, L.J.; Nana, A.L.; Hogg, V.M.; Synek, B.J.; Carter, R.T.; Waldvogel, H.J.; Faull, R.L.M. Cell loss in the motor and cingulate cortex correlates with symptomatology in Huntington's disease. **Brain**, v.133, p. 1094–1110, 2010.
- Toscano, C. P.; De Melo, M. P.; Matera, J. M.; Loesh, A.; Ribeiro, A. A. C. M. The developing and restructuring superior cervical ganglion of guinea pigs (*Cavia porcellus* var. albina). **International Journal of Developmental Neurosci**, v. 27, p. 329-336, 2009.
- Tsujita, T.M.D.; Takahiro, K.M.D.; Mark, A.S. Evaluation of left ventricular function in cardiomyopathic mice by tissue Doppler and color M-Mode Doppler echocardiography. *Echocardiography*, v.22 (3), p. 245-253, 2005.
- Van der Burg, J.M.M.; Björkqvist, M.; Brundin, P. Beyond the brain: widespread pathology in Huntington's disease. **Lancet Neurol**, v.8, p. 765-74, 2009.
- Vaseghi, M.; Zhou, W.; Shi, J.; Ajijola, O.A.; Hadaya, J.; Shivkumar, K.; Mahajan, A. Sympathetic innervation of the anterior left ventricular wall by the right and left stellate ganglia. **Heart Rhythm**, v. 9(8), p. 1303-9, 2012.
- Vedel Jensen, E.B.; Gundersen, H.J.G. The rotator. **Journal of Microscopy**, V.170, p. 35-44, 1993.
- Vis, J. C.; Verbeek, M. M.; Waal, R. M. W.; Donkelaar, H. J.; Kremer, H. P. H. 3-Nitropropionic acid induces a spectrum of Huntington's disease-like neuropathology in rat striatum. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 225, p. 513–521, 1999.
- Waddington, J.L. Spontaneous orofacial movements induced in rodents by very long-term neuroleptic drug administration: phenomenology, pathophysiology and putative relationship to tardive dyskinesia. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 101(4), p. 431-47, 1990.
- Wallis, D.; Watson, A.H.D.; Mo, N. Cardiac Neurones of Autonomic Ganglia. **Microscopy research and technique**, v.35, p.69-79, 1996.
- Watson, L.E.; Seth, M.; Denyer, R.; Dostal, D.E. Baseline echocardiographic values for adult male rats. **J Am Soc Echocardiogr**, v. 17, p. 161-167, 2004.
- Weiis, A.; Träger, U.; Wild, E.J.; Grueninger, S.; Farmer, R.; Landles, C.; Scahill, R.L.; Lahiri, N.; Haider, S.; Macdonald, D.; Frost, C.; Bates, G.P.; Bilbe, G.; Kuhn, R.; Andre, R.; Tabrizi, S.J. Mutant huntingtin fragmentation in immune cells tracks Huntington's disease progression. **The Journal of Clinical Investigation**, v.122(10), p. 3731-3736, 2012.
- Winter, J.; Tanko, A.S.; Brack, K.E.; Coote, J.H.; Ng, G.A. Differential cardiac responses to unilateral sympathetic nerve stimulation in the isolated innervated rabbit heart. **Auton Neurosci**, v. 166(1-2), p. 4-14, 2012.

Wood, A.; Docimo, S.; Elkowitz, D.E. Cardiovascular disease and its association with histological changes of the left stellate ganglion. **Clin Med Insights Pathol.**, v. 3, p. 19-24, 2010.

Zhou, W.; Yamakawa, K.; Benharash, P.; Ajijola, O.; Ennis, D.; Hadaya, J.; Vaseghi, M.; Shivkumar, K Mahajan A. Effect of stellate ganglia stimulation on global and regional left ventricular function as assessed by speckle tracking echocardiography. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 15, p. 304(6):H840-7, 2013.

ANEXOS

ANEXO I- Carta de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP)

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 03/04/2014, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 014/14 intitulado: “Efeitos do ácido 3-nitropropiónico (3-NP) na inervação extrínseca do coração de camundongos” que utilizará 26 animais da espécie camundongo, apresentado pelo Departamento de Patologia.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Antonio Augusto Coppi

Pesquisador (a) Executante: Amanda Lopez Moreira

CEP-FMUSP, 03 de Abril de 2014.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO II- Carta de aprovação na Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Efeitos do ácido 3-nitropropiónico (3-NP) na inervação extrínseca do coração de camundongos”, protocolado sob o nº 3148/2013, utilizando 30 (trinta) camundongos, sob a responsabilidade Prof. Dr. Antonio Augusto Coppi Maciel Ribeiro, foi aprovado em reunião de 13/11/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research “Effects of 3-nitropropionic acid (3-NP) on the extrinsic innervation in the heart of mice”, protocol number 3148/2013, utilizing 30 (thirty) mice, under the responsibility Prof. Dr. Antonio Augusto Coppi Maciel Ribeiro, was approved in the meeting of day 11/13/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 18 de novembro de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária “Armando de Salles Oliveira”
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: ceuavet@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

ANEXO III - Representação esquemática da duração total em dias dos experimentos entre o momento de indução e a coleta