



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LORENA DE JAGER

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO PRÉVIO SOBRE AS
CONCENTRAÇÕES DE NITRITO PLASMÁTICO E
TISSULAR, E PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E
AUTONÔMICOS EM RATOS COM PARKINSONISMO
INDUZIDO POR 6-OHDA**

LORENA DE JAGER

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO PRÉVIO SOBRE AS
CONCENTRAÇÕES DE NITRITO PLASMÁTICO E
TISSULAR, E PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E
AUTONÔMICOS EM RATOS COM PARKINSONISMO
INDUZIDO POR 6-OHDA**

Dissertação apresentada no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia (Instituição Associada Universidade Estadual de Londrina), como requisito à obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Marli Cardoso Martins-Pinge

Londrina
2018

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

de Jager, Lorena .

EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO PRÉVIO SOBRE AS CONCENTRAÇÕES DE NITRITO PLASMÁTICO E TISSULAR, E PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E AUTONÔMICOS EM RATOS COM PARKINSONISMO INDUZIDO POR 6-OHDA / Lorena de Jager. - Londrina, 2018.
56 f.

Orientador: Marli Cardoso Martins Pingé.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas - Multicêntrico) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, , 2018.
Inclui bibliografia.

1. Doença de Parkinson - Tese. 2. L-NAME - Tese. 3. Natação - Tese. 4. Pressão arterial - Tese. I. Cardoso Martins Pingé, Marli. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. . III. Título.

LORENA DE JAGER

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO PRÉVIO SOBRE AS
CONCENTRAÇÕES DE NITRITO PLASMÁTICO E TISSULAR, E
PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E AUTONÔMICOS EM
RATOS COM PARKINSONISMO INDUZIDO POR 6-OHDA**

Dissertação apresentada no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia (Instituição Associada Universidade Estadual de Londrina), como requisito à obtenção do título de mestre.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Eduardo José de Almeida Araújo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

Londrina, 07 de março de 2018.

DEDICATÓRIA

*À minha família...
Dedico este trabalho ao meu pai, mãe, irmãos e irmão,
Pessoas as quais sempre pude contar e que sempre estiveram comigo!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Profa Dra Marli Cardoso Martins Pinge, pela oportunidade, incentivo e apoio durante todos esses anos, além de todo o ensinamento compartilhado.

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

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

Ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação Ciências Fisiológicas.

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

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

Aos colegas do laboratório, pela amizade, colaborações e auxílio durante a realização deste trabalho.

Ao professor Carlos Cesar Crestani e as técnicas Elisabete e Valéria da UNESPAraraquara, pela colaboração nas dosagens de dopamina.

Aos técnicos e demais servidores do departamento e da UEL

Ao apoio financeiro: Capes.

“O sucesso é uma viagem, não um ponto de destino.”

Ben Sweetland

DE JAGER, Lorena. **Efeitos do exercício físico prévio sobre as concentrações de nitrito plasmático e tissular, e parâmetros cardiovasculares e autonômicos em ratos com parkinsonismo induzido por 6-OHDA.** 2018. 56 f. Dissertação (Mestrado Ciências Fisiológicas.) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2018.

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma condição neurodegenerativa caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra pars compacta (SNPc). Além dos sinais motores, há disfunções cardiovasculares, como hipotensão arterial postural, hipotensão arterial pós-prandial e labilidade da pressão arterial. Estudos mostram que o exercício físico diminui o risco de desenvolver a DP, assim como retarda sua progressão. Durante o treinamento físico, há um acréscimo na produção periférica de óxido nítrico (NO), o qual modula as adaptações cardiovasculares ao exercício. Contudo, nenhum estudo avaliou os efeitos do exercício sobre os níveis periféricos de NO e os seus efeitos modulatórios nas disfunções cardiovasculares de indivíduos com DP. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (nº do processo: 19653.2016.42). Animais treinados (T) ou sedentários (S) foram submetidos a cirurgia estereotáxica para microinfusão bilateral de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) ou solução veículo (grupo Sham). Após 6 dias, os animais foram cateterizados (artéria e veia femoral) para registro dos parâmetros basais (24h após a cateterização), seguido da inibição da óxido nítrico sintase (NOS) pelo N^w-nitro-arginina-metil-ester (L-NAME, 10mg/kg – i.v). A dosagem de nitrito foi realizada na aorta, coração, rim, adrenal e plasma por meio da reação colorimétrica de Griess. Após 4 semanas de natação, houve bradicardia de repouso nos grupos treinados (6-OHDA T e Sham T). O NO estava aumentado na aorta do grupo 6-OHDA S e diminuído nos animais 6-OHDA T. No coração, NO estava aumentado para Sham T quando comparado ao grupo sedentário e diminuído no grupo 6-OHDA T em relação aos animais 6-OHDA S e Sham T. No rim, o NO estava diminuído em 6-OHDA S e Sham T quando comparados ao Sham S, e nas glândulas adrenais, houve diminuição no grupo 6-OHDA T em relação ao 6-OHDA S. A administração de L-NAME promoveu menor aumento da pressão arterial média nos grupos 6-OHDA. As reduções na frequência cardíaca foram melhoradas devido ao treinamento físico. O grupo 6-OHDA S teve menor variância na pressão arterial sistólica, a qual não foi alterada pelo exercício. Nossos dados indicam que o exercício físico não promoveu proteção em relação a diminuição de dopamina no estriado e que as alterações nas respostas ao L-NAME na pressão arterial foram decorrentes da lesão e na frequência cardíaca parecem ter sido devido ao treinamento físico. Além disso, nossos dados mostram alterações no NO periférico o qual parece ser modulado diferentemente pelo exercício e o parkinsonismo.

Palavras-chave: Doença de Parkinson. Frequência cardíaca. L-NAME. Natação. Pressão arterial.

DE JAGER, Lorena. **Effects of previous physical exercise on plasma and tissue nitrite concentrations, and cardiovascular and autonomic parameters in rats with parkinsonism induced by 6-OHDA.** 2018. 56 p. Dissertation (Master Physiological Sciences.) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2018.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative condition characterized by the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNPc). In addition to motor signals, there are cardiovascular dysfunction as postural and postprandial arterial hypotension and blood pressure lability. Studies have shown that physical exercise decreases risk of developing PD as well as slowing its progression. During aerobic exercise, there is an increased production of nitric oxide (NO), which modulates the cardiovascular adaptations to exercise. However, no study has evaluated the effects of exercise on peripheral NO levels and its modulatory effects on cardiovascular dysfunctions of subjects with PD. This study was approved by the Ethics Committee of the State University of Londrina (process number: 19653.2016.42). Trained (T) or sedentary (S) animals underwent stereotactic surgery for bilateral 6-hydroxydopamine (6-OHDA) or vehicle microinfusion (Sham group). After 6 days, the animals were catheterized (femoral artery and femoral vein) for baseline parameters (24 hours after catheterization), followed by inhibition of nitric oxid synthase (NOS) by Nw-nitro-arginine-methyl ester (L-NAME, 10mg / kg - i.v). Nitrite concentration was performed in the aorta, heart, kidney, adrenal and plasma through Griess colorimetric reaction. After 4 weeks of swimming, trained animals presented resting bradycardia (6-OHDA T and Sham T). NO was increased in the aorta of 6-OHDA S, and decreased in 6-OHDA T animals. In the heart, NO was increased in Sham T compared to sedentary and decreased in 6-OHDA T relative to 6-OHDA S and Sham T animals. At the kidney, NO decrease in 6-OHDA S and Sham T when compared to Sham S and, in adrenal gland, there was a decrease in 6-OHDA T in relation to 6-OHDA S. Administration of L-NAME promoted a lower mean arterial pressure increase in the 6-OHDA groups. Reductions in heart rate were improved due to physical training. The 6-OHDA S group had lower variance in systolic blood pressure, which was not altered by exercise. Our data indicate that exercise did not promote protection against the decrease in dopamine in the striatum and that changes in L-NAME responses in blood pressure were due to injury and in heart rate appear to have been due to physical training. In addition, our data show alterations in peripheral NO which appears to be modulated differently by exercise and parkinsonism.

Key words: Parkinson's disease. Heart rate. L-NAME. Swimming. Arterial pressure.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Representação do protocolo experimental para o registro dos parâmetros cardiovasculares25
- Figura 2** - Concentração de dopamina (DA) no estriado quantificado por HPLC após 7 dias da infusão bilateral de veículo ou toxina em animais sedentários ou submetidos ao treinamento físico, com ou sem lesão por 6-OHDA28
- Figura 3** - Alterações na produção de NO^{2-} na aorta (a), coração (b), plasma (c), rim direito (d) e adrenal (e) de animais sedentários ou submetidos ao treinamento físico, com ou sem lesão por 6-OHDA.....30
- Figura 4** - Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (a) e na frequência cardíaca (FC) (b), após a administração endovenosa de salina (tempo -10) e de L-NAME (10mg/kg – tempo 0) em animais sedentários ou submetidos ao treinamento físico, com ou sem lesão por 6-OHDA33
- Figura 5** - Análise da modulação autonômica em (A) variância de PAS, (B) LF abs e (C) VLF abs35
- Figura 6** - Análise da modulação autonômica em (A) variância de IP, (B) LF/HF, (C) LF nu e (D) HF nu.....37
- Figura 7** - Análise do barorreflexo espontâneo em animais sedentários ou submetidos ao treinamento físico, com ou sem lesão por 6-OHDA.....39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros basais de PAM, FC, PAS e PAD de animais sedentários ou submetidos ao treinamento físico, com ou sem lesão por 6-OHDA.....	31
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DA	Dopamina
DP	Doença de Parkinson
eNOS	Óxido Nítrico Sintase endotelial
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FC	Frequência Cardíaca
HO	Hipotensão Ortostática
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzível
L-NAME	N ^w -nitro-arginina-metil-ester
HF	Componente de alta frequência (“high frequency”)
LF	Componente de baixa frequência (“low frequency”)
LF/HF	Balanço Simpato-Vagal
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
nNOS	Óxido Nítrico Sintase neuronal
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAM	Pressão Arterial Média
PAS	Pressão Arterial Sistólica
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNPc	Substância Negra Pars Compacta
Sham S	Sham Sedentário
Sham T	Sham Treinado
VFC	Variabilidade da Frequência Cardíaca
VLF	Componente de muito baixa frequência (“very low frequency”)
6-OHDA	6-hidroxidopamina
6-OHDA S	6-hidroxidopamina Sedentário
6-OHDA T	6-hidroxidopamina Treinado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	DOENÇA DE PARKINSON	14
1.2	ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES	15
1.3	MODELOS EXPERIMENTAIS.....	17
1.4	EXERCÍCIO FÍSICO	18
1.5	ÓXIDO NÍTRICO	20
2	OBJETIVOS	22
2.1	GERAL	22
2.2	ESPECÍFICOS	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1	APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E ANIMAIS.....	23
3.2	EXERCÍCIO FÍSICO	23
3.3	CIRURGIA ESTEREOTÁXICA.....	23
3.4	CATETERIZAÇÃO DE ARTÉRIA E VEIA FEMORAL.....	24
3.5	REGISTRO DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES	24
3.6	DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE DOPAMINA (DA) POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)	25
3.7	ANÁLISE ESPECTRAL DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (P AS) E INTERVALO DE PULSO (IP)	25
3.8	ANÁLISE DO BARORREFLEXO ESPONTÂNEO.....	26
3.9	DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	27
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
4	RESULTADOS	28
4.1	DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE DA ESTRIATAL	28
4.2	DOSAGEM DE NITRITO NO PLASMA, CORAÇÃO, AORTA, RIM, GLÂNDULA ADRENAL	29
4.3	PARÂMETROS CARDIOVASCULARES	31
4.3.1	Parâmetros Cardiovasculares Basais.....	31
4.3.2	Parâmetros Cardiovasculares após inibição por L-NAME	32

4.3.3	Análise Espectral de Pressão Arterial Sistólica (PAS).....	34
4.3.4	Análise Espectral de Intervalo de Pulso (IP).....	36
4.3.5	Análise do Barorreflexo Espontâneo	38
5	DISCUSSÃO	40
6	CONCLUSÕES GERAIS	46
7	REFERÊNCIAS	47
	ANEXO	56
	ANEXO A – Comitê de Ética.....	56

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum e estima-se que a DP afeta 1% da população acima de 60 anos (LAU; BRETELER, 2006). É responsável por gerar alterações no estado físico, social, psicológico e funcional dos indivíduos e tem como manifestações clínicas a bradicinesia, tremor em repouso, rigidez, instabilidade postural e anormalidades da marcha (SIAN et al., 1999; RODRIGUEZ-OROZ et al., 2009).

A DP é caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra pars compacta (SNpc) e a deficiência de dopamina (DA) nos gânglios da base, a qual leva às disfunções motoras relacionadas a doença (MOORE et al., 2005; BLANDINI, 2013). Além do déficit dopaminérgico, a DP é caracterizada pela presença de corpos de Lewy, que são formados pelo acúmulo anormal de α -sinucleína, considerados uma marca histopatológica da doença (KALIA; LANG, 2015).

James Parkinson, em 1817, descreveu pela primeira vez a doença de Parkinson como uma síndrome neurológica que tinha como principais sintomas motores a bradicinesia, rigidez e tremor, em seu trabalho intitulado “Essay on the Shaking Palsy”. Aproximadamente 50 anos depois, Jean-Martin Charcot continuou os estudos desta patologia, e foi quem a denominou como doença de Parkinson como homenagem à James Parkinson (GOETZ, 2011). A descoberta da via sintética de DA e da deficiência de DA na DP, deram origem aos estudos com o fármaco Levodopa, considerado até hoje como padrão ouro no tratamento sintomático da DP. Desde então, diversos estudos vêm sendo realizados para se entender a complexidade e a etiologia da DP. Esses estudos mostram que a DP é considerada um distúrbio neurológico que se manifesta de forma lenta e progressiva e, que se inicia anos antes do diagnóstico poder ser realizado. A doença envolve múltiplas áreas neuroanatômicas e é resultado de uma combinação de fatores genéticos e ambientais, manifestando-se com uma ampla gama de sintomas (KALIA; LANG, 2015). A complexidade da DP é acompanhada pela dificuldade em se fazer um diagnóstico definitivo nos estágios iniciais da doença e as dificuldades no manejo dos sintomas em estágios posteriores. Além disso, não há tratamentos que retardem

o processo neurodegenerativo (KALIA; LANG, 2015).

Toxinas ambientais podem ser fatores de risco, assim como o estresse oxidativo que está envolvido na etiologia da doença. O estresse oxidativo pode ser resultado de disfunção mitocondrial, ou de uma capacidade antioxidante reduzida ou até mesmo devido ao metabolismo da DP que produz espécies reativas de oxigênio (ERO) (MOORE et al., 2005; BLANDINI, 2013). O dano oxidativo em ácidos nucleicos pode ser um fator de risco para a DP (NAKABEPPU et al., 2007). Sendo assim, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e a deficiência do sistema ubiquitina-proteasoma podem estar envolvidos na patogênese da DP esporádica e familiar (MOORE et al., 2005).

A via dopaminérgica nigroestriatal é composta por neurônios dopaminérgicos cujos corpos celulares se localizam na SNpc e projetam seus axônios para o caudado-putamen ou corpo estriado (PRZEDBORSKI, 2005). A redução dos neurônios da SNpc leva a uma redução na projeção de fibras dopaminérgicas para o corpo estriado dorsal, gerando então, uma diminuição dos níveis de (DA) (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Estima-se que quando há uma diminuição de 50-60% de DA, os sintomas motores começam a aparecer (SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017). As características clínicas da disfunção motora são necessárias para o diagnóstico de DP. A DP apresenta sinais motores primários (presença de tremor, rigidez, acinesia, bradicinesia e instabilidade postural) e sinais secundários (distúrbios da marcha, micrografia e problemas na fala) (MOUSTAFA et al., 2016).

Além das características motoras, há presença de sintomas neuropsiquiátricos, distúrbios do sono, sintomas autonômicos, alterações gastrointestinais e sensoriais (CHAUDHURI; SCHAPIRA, 2009), os quais comprometem a qualidade de vida dos pacientes. As características não-motoras da doença de Parkinson refletem déficits em várias funções do SNC e do sistema nervoso autônomo (SNA). A sequência, o tempo e o desenvolvimento dos sintomas não-motores na DP podem variar entre os pacientes. Embora algumas deficiências não-motoras precedam anormalidades motoras (por exemplo, déficits cardíacos, intestinais e olfativos), a maior parte dos sintomas não-motores se desenvolvem ao longo do tempo com a progressão da doença (SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017).

1.2 ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES

A disfunção autonômica na DP é comum e acredita-se que possa ser decorrente da própria condição e/ou dos fármacos utilizados no tratamento desta doença (levodopa, agonistas dopaminérgicos, anticolinérgicos, entre outros) (NICARETTA; ROSSO; MATTOS, 2011). Problemas autonômicos englobam disfunção vesical, intestinal e sexual, além de complicações cardiovasculares. As alterações cardiovasculares mais comuns são: hipotensão arterial ortostática (HO), hipotensão arterial pós-prandial, alteração da variabilidade da pressão arterial (PA) e, possivelmente, fadiga e intolerância ao exercício físico (NICARETTA; ROSSO; MATTOS, 2011; JAIN; GOLDSTEIN, 2012; SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017).

A disfunção autonômica cardíaca pode ocorrer em até 80% dos pacientes com DP (SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017). A HO é um marcador de disfunção simpática e é comum na DP com uma frequência relatada de 30-58% (revisado por GOLDSTEIN, 2006). A denervação cardíaca noradrenérgica, a denervação noradrenérgica extra-cardíaca e insuficiência do barorreflexo são alterações cardiovasculares que parecem atuar juntas na hipotensão postural na DP, assim como resultam também nas outras disfunções cardiovasculares citadas anteriormente (JAIN; GOLDSTEIN, 2012).

Um estudo sobre os sintomas não-motores da doença mostra que pacientes com DP apresentam frequência cardíaca (FC) marcadamente elevada em relação aos indivíduos saudáveis (revisado por SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017). Além disso, o monitoramento da PA durante vinte e quatro horas mostra que as alterações no perfil da PA e a hipertensão supina geralmente ocorrem na DP, frequentemente nos pacientes que desenvolvem HO (SCHMIDT et al., 2009). Uma análise retrospectiva do teste de estresse cardiovascular em indivíduos assintomáticos mostrou que, durante o pico de exercício, a frequência cardíaca máxima e o percentual teórico de frequência cardíaca máxima foram significativamente mais baixas nas pessoas que desenvolveram DP do que nos indivíduos controle (PALMA et al., 2013).

Estudos anteriores de nosso laboratório mostram que ratos com lesão bilateral por 6-hidroxidopamina (6-OHDA), apresentam diminuição nos parâmetros basais de pressão arterial média (PAM) e FC, os quais são acompanhados por redução da modulação simpática na pressão arterial sistólica (PAS) (Ariza et al.,

2015a). Além disso, as respostas ao baroreflexo e ao quimioflexo estão alteradas em ratos com parkinsonismo induzido por 6-OHDA. Falquetto e colaboradores (2017) observaram menor sensibilidade barorreflexa e diminuição do número de neurônios do tronco encefálico envolvidos na função cardiovascular encefálico de ratos induzidos ao parkinsonismo por 6-OHDA no corpo estriado (FALQUETTO et al., 2017). A injeção de 6-OHDA no feixe mediano do prosencéfalo diminui a FC cardíaca noturna em ratos, enquanto a injeção na área tegmental ventral altera a regulação da pressão arterial circadiana (SEI et al., 1999; SAKATA et al. 2002; SLACK et al., 2010). Também, por meio da telemetria, foi observado perda de periodicidade circadiana, especialmente na FC, em ratos com infusão bilateral de 6-OHDA (BOULAMERY et al., 2010).

1.3 MODELOS EXPERIMENTAIS

Modelos animais são utilizados para se estudar as diferentes fases/estados de doenças humanas. Em relação à DP, a literatura tem mostrado diferentes modelos que são capazes de induzir ao parkinsonismo ou que mimetizam um ou mais sintomas da DP. Tem sido proposto modelos farmacológicos, como por exemplo, ratos tratados com reserpina e o haloperidol. Existem ainda os modelos genéticos e os modelos induzidos por neurotoxina, como por exemplo: a 6-hidroxidopamina (6-OHDA), a rotenona, o paraquat, o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), o lipopolissacarídeo (LPS) e a metanfetamina. Os modelos de lesão por neurotoxina têm como característica em comum a lesão da via nigroestriatal (DUTY; JENNER, 2011; JACKSON-LEWIS; BLESA; PRZEDBORSKI, 2012).

Como a DP é uma doença multifacetada, não há nenhum modelo que apresente todas as características da doença, pois os modelos tóxicos apresentam algumas características, enquanto que os modelos genéticos, apresentam outras (DUTY; JENNER, 2011; JACKSON-LEWIS; BLESA; PRZEDBORSKI, 2012). A partir dos dois modelos, pode-se aprender mais sobre o que está envolvido na etiologia da doença, como radicais livres, inibição do complexo I da cadeia mitocondrial, inflamação e modificações protéicas (JACKSON-LEWIS; BLESA; PRZEDBORSKI, 2012).

Um dos modelos clássicos e mais utilizados para a indução de parkinsonismo é o modelo de lesão com a toxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) na SNPc. A neurotoxina 6-OHDA, por não atravessar a barreira hematoencefálica, deve ser administrada diretamente no local a ser lesionado, entre eles, a SNPc, o corpo estriado ou o feixe prosencéfalo medial. A 6-OHDA, após a infusão, é captada pelos transportadores de dopamina, ficando concentrada nos terminais nervosos de dopamina, inibindo o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, o que leva a produção de ERO ou a diminuição na produção de ATP, que conduz a morte neuronal dos neurônios dopaminérgicos (DUTY; JENNER, 2011; ZIGMOND; SMEYNE, 2014). A lesão com 6-OHDA não induz a produção de corpos de Lewy (JACKSON-LEWIS; BLESA; PRZEDBORSKI, 2012).

Como citado anteriormente, dados da literatura e de nosso laboratório mostram alterações cardiovasculares com este modelo por 6-OHDA. Dessa forma, a utilização do modelo de parkinsonismo por 6-OHDA tem se mostrado uma ferramenta útil para se estudar alterações cardiovasculares na DP.

1.4 EXERCÍCIO FÍSICO

O exercício físico traz diversos efeitos benéficos ao nosso organismo, como: aumento da produção de energia mitocondrial, estimulação das defesas antioxidantes, redução da inflamação, indução de angiogênese e sinaptogênese (MELO; MARTINHO; MICHELINI, 2003; DE ABREU et al., 2009; MASTELARI et al., 2011; ZIGMOND; SMEYNE, 2014; RAQUEL et al., 2016). Dentre os efeitos promovidos pelo treinamento físico sobre o sistema cardiovascular, destaca-se a bradicardia de repouso, melhora do ganho e sensibilidade do barorreflexo e melhora da plasticidade na modulação autonômica (DE ABREU et al., 2009; MARTINS-PINGE, 2011; RAQUEL et al., 2016). O exercício físico regular atua no sistema cardiovascular por meio de remodelamento da circulação no músculo liso vascular e no coração (DI CARLO & BISHOP, 1990), melhora da capacidade antioxidante no miocárdio, redução de gordura do epicárdio, de alterações na função mitocondrial, no aumento da expressão da eNOS levando ao aumento da produção de NO, que apresenta efeitos anti-inflamatórios, vasodilatadores e anti-plaquetários importantes para a homeostase vascular (revisado por GOLBIDI; LAHER, 2012).

Além disso, tem sido demonstrado que o exercício físico é capaz de diminuir o

risco de desenvolver a DP, assim como retardar a sua progressão (GOODWIN et al., 2008). O efeito modulatório do exercício físico em modelos animais de parkinsonismo tem sido avaliada e tem sido mostrado melhora na função motora e capacidade de proteção dos neurônios dopaminérgicos (HOU et al., 2017). Estudos mostram que camundongos que realizam exercício físico antes (12 semanas) e após (8 semanas) a lesão por 6-OHDA tem menor diminuição de tirosina hidroxilase (TH) (ZIGMOND; SMEYNE, 2014). Goes e colaboradores (2014) mostraram que camundongos que passaram por um protocolo de natação por 4 semanas antes da exposição a 6-OHDA tem atenuação em alguns distúrbios causados pela lesão, entre estes, menor geração das ERO, redução dos níveis de interleucina-1 beta ($IL-1\beta$), menor produção de glutathione redutase (GR) e glutathione-S-transferase (GST). O exercício físico durante 4 semanas promove, em camundongos com parkinsonismo crônico angiogênese no cérebro (AL-JARRAH et al., 2010). Também, o exercício físico de esteira promove proteção de neurônios dopaminérgicos em ratos com lesão unilateral de 6-OHDA no estriado, que iniciaram a esteira no dia anterior a lesão e que continuaram o exercício por mais 2-4 semanas (YOON et al., 2007; TAIJIRI et al., 2010). Além disso, o exercício mostrou que em camundongos expostos a um ambiente enriquecido (combinação de exercício, interações sociais e aprendizado) ou exercício isolado durante a idade adulta adquirem proteção ao parkinsonismo induzido por MPTP (FAHERTY et al., 2005).

A variabilidade da frequência cardíaca (VFC) é uma medida da função do sistema nervoso autônomo e estudos têm mostrado que a diminuição da VFC apresenta relação com maior índice de morbidade e mortalidade cardiovascular. Ainda, com o envelhecimento, essa variabilidade tende a diminuir. Em um estudo de coorte, Alonso e colaboradores (2015) observaram que uma menor VFC está associada ao aumento do risco de DP. O exercício físico promove aumento da capacidade do SNA em responder às demandas do sistema cardiovascular por meio do aumento da VFC (SOUZA et al., 2007; SOUZA et al., 2009, TEZINI et al., 2008). Também, a prática regular de exercício físico é capaz de modular o equilíbrio autonômico, aumentando a atividade parassimpática e diminuindo a atividade simpática (DE ABREU et al., 2009). Assim, o treinamento físico têm se mostrado um mecanismo para aumentar a VFC, por meio do aumento da modulação vagal e da diminuição do tônus do sistema nervoso simpático (ROUTLEDGE et al., 2010; PRINSLOO; LAURIE RAUCH; DERMAN, 2014).

1.5 ÓXIDO NÍTRICO (NO)

O NO está envolvido em diversos processos fisiológicos, porém pode apresentar efeitos citotóxicos ao organismo. Este gás é formado pela conversão de L-arginina em L-citrulina e NO pela NO sintase (NOS), na presença de co-fatores como o NADPH e oxigênio. A NOS apresenta três isoformas diferentes: a NOS neuronal (nNOS ou NOS I), NOS induzível (iNOS ou NOS II), NOS endotelial (eNOS ou NOS III), (MOLINA et al., 1998; GUIX et al., 2005). A isoforma nNOS (células nervosas, músculo cardíaco e músculo esquelético) e a eNOS (células que alinham os vasos sanguíneos) são constitutivamente expressas e são dependentes de cálcio. Em contraste, a iNOS é independente de cálcio e é expressa sob condições patológicas em diversas células envolvidas no sistema imune (MOLINA et al., 1998; DAFF, 2010).

O NO parece estar envolvido nos processos que levam a neurodegeneração na DP e em modelos experimentais (MOLINA et al., 1999; YUSTE et al., 2012). A administração de inibidores de NOS na DP, como o N^w-nitro-arginina-metil-ester (L-NAME – inibe as formas dependentes de Ca²⁺), atenua a queda de DA e de seus metabólitos em ratos que tiveram uma injeção unilateral de 6-OHDA. A administração de 7-Nitroindazol (7-NI – inibidor da nNOS) também foi capaz de proteger dos efeitos neurotóxicos da lesão por MPTP, sugerindo então a participação do NO na DP (SCHULZ et al., 1995; DI MONTE et al., 1996; BARTH WAL; SRIVASTAVA; DIKSHIT, 2001; VÍTEČEK et al., 2012). Ainda a inibição da nNOS, protege contra a lesão de neurônios dopaminérgicos e diminui o comportamento motor e reduz a discinesia induzida por L-DOPA em roedores parkinsonianos (DEL-BEL et al., 2011). Também, o pré-tratamento com o aminoácido L-arginina (L-arg) atenuou a perda de células de DA na SNpc (HAMI et al., 2015).

As diferentes isoformas de NOS parecem se comportar de maneira diferente na DP. No caso da nNOS, a degeneração de neurônios dopaminérgicos leva a diminuição da expressão de nNOS na substância negra (CZARNECKA et al., 2013), enquanto que, a administração de MPTP em camundongos, leva a elevação significativa da iNOS (LIBERATORE et al., 1999). Em humanos, foi encontrado aumento da expressão de iNOS na SNpc em amostras cerebrais post-mortem de indivíduos com DP (HUNOT et al., 1996). O papel dessas isoformas no

desenvolvimento da DP ainda precisa ser melhor elucidado.

O treinamento físico aumenta a força de cisalhamento sobre o endotélio vascular, o que aumenta a produção de NO pelo endotélio (MCALLISTER; LAUGHLIN, 2006). Assim, sessões repetidas de exercício físico favorecem a vasodilatação, o que tem efeitos positivos sobre o sistema cardiovascular (GREEN et al., 2004; MCALLISTER; LAUGHLIN, 2006; FRANCESCO MARINO et al., 2009). O aumento da expressão da eNOS, decorrente do treinamento físico, está envolvido nas adaptações cardiovasculares ao exercício. Além disso, é de conhecimento também que o treinamento físico altera a expressão das enzimas produtoras de NO em áreas centrais de controle cardiovascular, promovendo modulação sobre a atividade autonômica. Na área rostroventrolateral do bulbo (RVLM) por exemplo, há diminuição da biodisponibilidade do NO (SOUSA et al., 2015; RAQUEL et al., 2016), o qual propicia o menor tônus simpático cardiovascular após exercício crônico.

Considerando que o exercício físico é capaz de trazer benefícios a pacientes com DP e que os estudos que relacionam parkinsonismo com o exercício físico não avaliaram os possíveis benefícios do treinamento físico sobre as alterações cardiovasculares, assim como sua relação com as concentrações de NO no sistema cardiovascular, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do treinamento físico prévio por natação em variáveis cardiovasculares, autonômicas e concentrações de NO no sistema cardiovascular de ratos induzidos ao parkinsonismo por infusão bilateral de 6-OHDA na SNpc.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos cardiovasculares e autonômicos em ratos acordados e induzidos ao parkinsonismo por infusão bilateral de 6-OHDA na SNpc, após 4 semanas de treinamento físico por natação; assim como, avaliar as concentrações de nitrito plasmático e tissular nestes animais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar as alterações cardiovasculares e autonômicas basais em animais acordados, treinados ou sedentários, lesados ou não por 6-OHDA;
- Investigar o efeito do treinamento físico na variabilidade da pressão arterial sistólica e do intervalo de pulso em animais acordados, treinados ou sedentários, lesados ou não por 6-OHDA;
- Avaliar o barorreflexo espontâneo basal em animais acordados, treinados ou sedentários, lesados ou não por 6-OHDA;
- Avaliar as concentrações de NO no plasma, coração, adrenal, rim e aorta de animais treinados ou sedentários, lesados ou não por 6-OHDA;
- Avaliar as alterações cardiovasculares após inibição da NOS em animais acordados, treinados ou sedentários, lesados ou não por 6-OHDA;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E ANIMAIS

Ratos Wistar adultos, pesando entre 200-250g no início do protocolo, foram mantidos em ambiente com temperatura e ventilação adequados ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), em um ciclo claro-escuro de 12h. Os animais tinham água e ração ad libitum. Os experimentos foram conduzidos durante a fase clara do ciclo. Todos os protocolos experimentais estão de acordo com a Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (CONCEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (nº do processo: 19653.2016.42).

3.2 EXERCÍCIO FÍSICO

Os ratos foram distribuídos em 4 grupos experimentais: sedentários Sham (Sham S); sedentários com lesão por 6-OHDA (6-OHDA S), treinados Sham (Sham T) e treinados com lesão por 6-OHDA (6-OHDA T). Os animais que passaram pelo treinamento físico seguiram o protocolo de natação de acordo com Martins-Pinge e colaboradores (2005). O protocolo consiste em 20 sessões (4 semanas) de uma hora de natação por dia, durante 5 dias/por semana. Na primeira semana, há um período de adaptação, havendo aumento gradual do tempo de natação até alcançar o tempo de uma hora, iniciando com 15 minutos no primeiro dia, seguido de 30 minutos no segundo dia, 45 minutos no terceiro e uma hora no quarto dia. O protocolo de natação ocorreu durante o período da manhã em um tanque de vidro (100X60X50 cm) contendo água aquecida à $31 \pm 1^\circ\text{C}$ e profundidade de 40 cm (de água). Após o treinamento os animais eram retirados do tanque, secados e voltavam ao biotério setorial.

3.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

No dia seguinte ao término do protocolo de treinamento físico, os animais foram submetidos à anestesia com Cloridrato de Cetamina e Cloridrato de Xilasina (100 e 6,7 mg/kg, i.p.; Ceva Santé Animale, São Paulo, Brasil) para indução do parkinsonismo. Em seguida, foram colocados em um aparelho estereotáxico (David

Kopf), e perfurações no crânio dos animais foram realizadas com uma broca de baixa rotação, permitindo a microinfusão da neurotoxina 6-OHDA (6 mg/mL em 0,2% de ácido ascórbico em solução salina estéril) diretamente na SNpc. Para tal procedimento, as seguintes coordenadas estereotáticas foram utilizadas como referência, a partir do bregma: - 5,0 mm do bregma; latero-lateral (LL) \pm 2,1 mm da linha média; dorsoventral (DV), - 8,0 mm do crânio segundo (PAXINOS & WATSON, 1998). A microinfusão foi realizada com o auxílio de uma agulha (30 gauge) conectada a um tubo de polietileno adaptado a uma microseringa de 10 μ l (Hamilton, EUA) encaixada em uma bomba de infusão. Após a infusão da toxina (3 minutos), a agulha permanecia no local por mais 2 minutos para evitar o refluxo da substância. Em seguida, a pele do escalpo foi suturada e somente retornaram ao biotério setorial após recuperação da anestesia. O grupo Sham foi submetido ao mesmo procedimento cirúrgico, porém com a infusão da solução veículo (ácido ascórbico e salina). Como medida profilática, após a cirurgia os animais receberam 30.000 UI de Pentabiótico Veterinário (Fontoura-Wyeth, Brasil) aplicados em 0,2 mL (i.m.) (ARIZA et al., 2010).

3.4 CATETERIZAÇÃO DE ARTÉRIA E VEIA FEMORAL

Após seis dias da cirurgia estereotática, os animais foram novamente submetidos à anestesia com Cloridrato de Cetamina e Cloridrato de Xilasina (100 e 6,7 mg/kg, i.p.; Ceva Santé Animale, São Paulo, Brasil) para a cirurgia de cateterização crônica da artéria e veia femorais, com o objetivo de monitorização da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) em ratos não anestesiados.

3.5 REGISTRO DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES

Após 24 horas da cateterização, os parâmetros cardiovasculares basais foram obtidos durante pelo menos 30 minutos antes do início do protocolo experimental. A pressão arterial média (PAM) e FC foram registradas por meio de um transdutor de pressão (MLT0830) acoplado ao sistema de aquisição de dados Powerlab system4/20T (ADInstruments®). Durante o registro, os animais não estavam anestesiados. Após o registro basal, uma injeção in bolus de salina 0,9% (1mL/Kg) foi administrada, seguida após 10 minutos de uma injeção in bolus de L-NAME

(10mg/kg – de Santa Cruz Biotechnology®, Texas, USA. Control), um inibidor seletivo das isoformas dependentes de cálcio, ou seja da via constitutiva (cNOS) (VÍTEČEK et al., 2012; CASTARDO-DE-PAULA et al., 2017). Após 2h de registro, os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação e amostras do tecido cerebral foram isoladas. O estriado de cada animal foi dissecado a olho nu manualmente e pesado, garantindo assim a homogeneidade. As amostras foram armazenadas a -80°C até posterior análise de concentração de DA no estriado para confirmar a eficácia do modelo. Segue abaixo a representação esquemática dos protocolos para o registro dos parâmetros cardiovasculares (Figura 1).

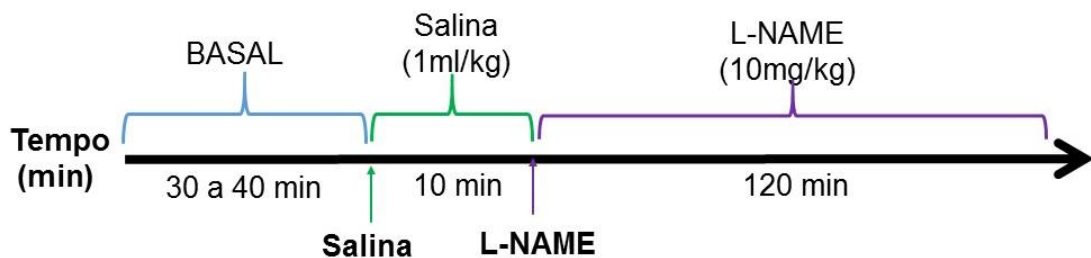


Figura 1. Representação do protocolo experimental para o registro dos parâmetros cardiovasculares.

3.6 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE DA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

As amostras do corpo do estriado dissecado foram suspensas com ácido perclórico 0,1M com 0,02% de metabissulfito de sódio como antioxidante, em concentração de 5 µL/mg de material cerebral. Após sonicação, os homogenatos foram centrifugados a 13.000 rpm durante 10 min a 4° C e 30 µL. O sobrenadante foi injetado em uma estação de cromatografia líquida de alto desempenho com detector eletroquímico. Esta determinação permitiu confirmar a eficácia da lesão por 6-OHDA na SNPc, caracterizada por diminuição na concentração de DA.

3.7 ANÁLISE ESPECTRAL DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS) E INTERVALO DE PULSO (IP)

A partir dos registros de PAP adquiridos pelo software LabChart 7.0 (ADInstruments, Bella Vista, Austrália), o qual é capaz de detectar pontos de inflexão nos pulsos de pressão e gerar séries, batimento-a-batimento, com valores de IP e PAS para cada ciclo cardíaco. Os dados de pressão arterial sistólica (PAS) e de intervalo de pulso (IP) no domínio da frequência foram convertidos para o programa computacional Cardioseries v2.4 (<http://www.danielpenteado.com>), por meio do qual a análise da variabilidade foi realizada. As séries temporais, batimento-a-batimento, com valores de IP e PAS foram reamostradas em 10 Hz (1 valor a cada 100 ms) por interpolação cúbica do tipo spline, para regularização do intervalo de tempo entre batimentos. As séries com valores interpolados de IP e PAS foram divididas em segmentos com 512 valores cada, com sobreposição de 50% (Protocolo de Welch). A estacionaridade dos valores de IP e PAS de cada segmento foi examinada visualmente e os segmentos com artefatos ou transientes foram excluídos. Os segmentos foram integrados em bandas de baixa frequência (LF: 0,20 – 0,75 Hz) e alta frequência (HF: 0,75 – 3,00 Hz), e os resultados foram expressos em unidades absolutas (ms^2 ou mmHg^2) e normalizadas (un). Os valores normalizados foram obtidos por meio de cálculos da potência relativa das bandas de LF e HF levando em consideração a potência total de espectro menos a potência de banda de muito baixa frequência (VLF: < 0,20 Hz). Para avaliar o equilíbrio simpátovagal cardíaco, calculou-se a razão entre a potência das bandas de LF e HF (LF/HF) do espectro do IP (DUTRA et al., 2013; TEZINI; DIAS; SOUZA, 2013).

3.8 ANÁLISE DO BARORREFLEXO ESPONTÂNEO

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

rampa de PAS (sequência de quatro ou mais batimentos), nos quais aumentos ou reduções progressivas da PAS foram acompanhados, ou não de aumentos ou reduções do IP, o programa computacional buscava por alterações no IP sem qualquer intervalo, ou seja, delay de zero batimento. Uma sequência barorreflexa só foi utilizada quando o coeficiente de correlação (r) entre os valores de PAS e IP for maior ou igual a 0,8. A SBR foi determinada a partir da média de inclinação da reta da regressão linear entre os valores de PAS e IP de cada sequência barorreflexa encontrada.

3.9 DOSAGEM DE NO

Para a dosagem da concentração de NO, foram utilizados diferentes animais dos usados nos outros protocolos. Estes foram submetidos a eutanásia no sétimo dia após a cirurgia estereotáxica e, além do corpo estriado que foi retirado para avaliar a eficácia da lesão, tiveram também o coração, aorta, rim direito, adrenal e plasma coletados e armazenados em freezer -80°C . A dosagem indireta da concentração de NO foi realizada por meio da quantificação de nitrito (NO_2^-) após tratamento da amostra com cádmio, através da reação colorimétrica de Griess (NAVARRO-GONZÁLVIZ; GARCÍA-BENAYAS; ARENAS, 1998).

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram avaliados em relação a normalidade dos dados por meio do teste Shapiro Wilk. Os gráficos de resposta de duas horas foram analisados pelo teste two-way ANOVA para medidas repetidas (two-way RMANOVA), seguido do pós-teste de Bonferroni. Para as outras análises, ANOVA One-Way, seguido de teste Bonferroni foram empregados. Os resultados foram analisados utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism, 5^a edição, e as diferenças foram consideradas significativas para um valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE DOPAMINA ESTRIATAL

A análise pelo método de HPLC indicou que as concentrações de DA no corpo estriado tanto no grupo 6-OHDA S e 6-OHDA T foram menores quando comparado aos Sham S e Sham T ($p < 0,0001$) (Figura 2).

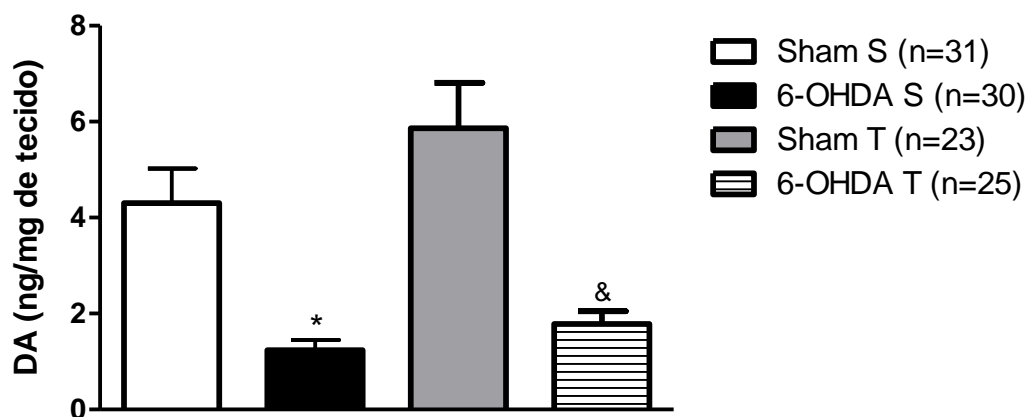


Figura 2. Concentração de dopamina (DA) no estriado quantificado por HPLC após 7 dias da infusão bilateral de veículo ou 6-OHDA em animais sedentários ou submetidos ao treinamento físico. * $p < 0,05$ vs Sham S; & $p < 0,05$ vs Sham T. Os valores estão expressos em média \pm SEM. O número dos grupos está entre os parênteses (ANOVA One-way, seguido do teste de Bonferroni).

4.2 CONCENTRAÇÕES DE NITRITO NO PLASMA, CORAÇÃO, AORTA, RIM, GLÂNDULA ADRENAL EM ANIMAIS SEDENTÁRIOS OU SUBMETIDOS AO TREINAMENTO FÍSICO, COM OU SEM LESÃO POR 6-OHDA

A partir da dosagem indireta de NO^{2-} , pode-se observar na Figura 3, que houve aumento de NO na aorta de ratos 6-OHDA S em relação aos Sham S, e houve diminuição nas concentrações de NO nos ratos 6-OHDA T quando comparado ao 6-OHDA S e ao Sham T ($p < 0,05$).

Para o coração, houve aumento no grupo Sham T quando comparado ao Sham S e redução de NO no grupo 6-OHDA T em relação ao grupo Sham T ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos nas concentrações de NO^{2-} no plasma.

Em relação ao rim, houve redução de NO nos animais 6-OHDA S e Sham T em relação ao Sham S. Na adrenal, houve menor concentração de NO no grupo 6-OHDA T em relação ao 6-OHDA S.

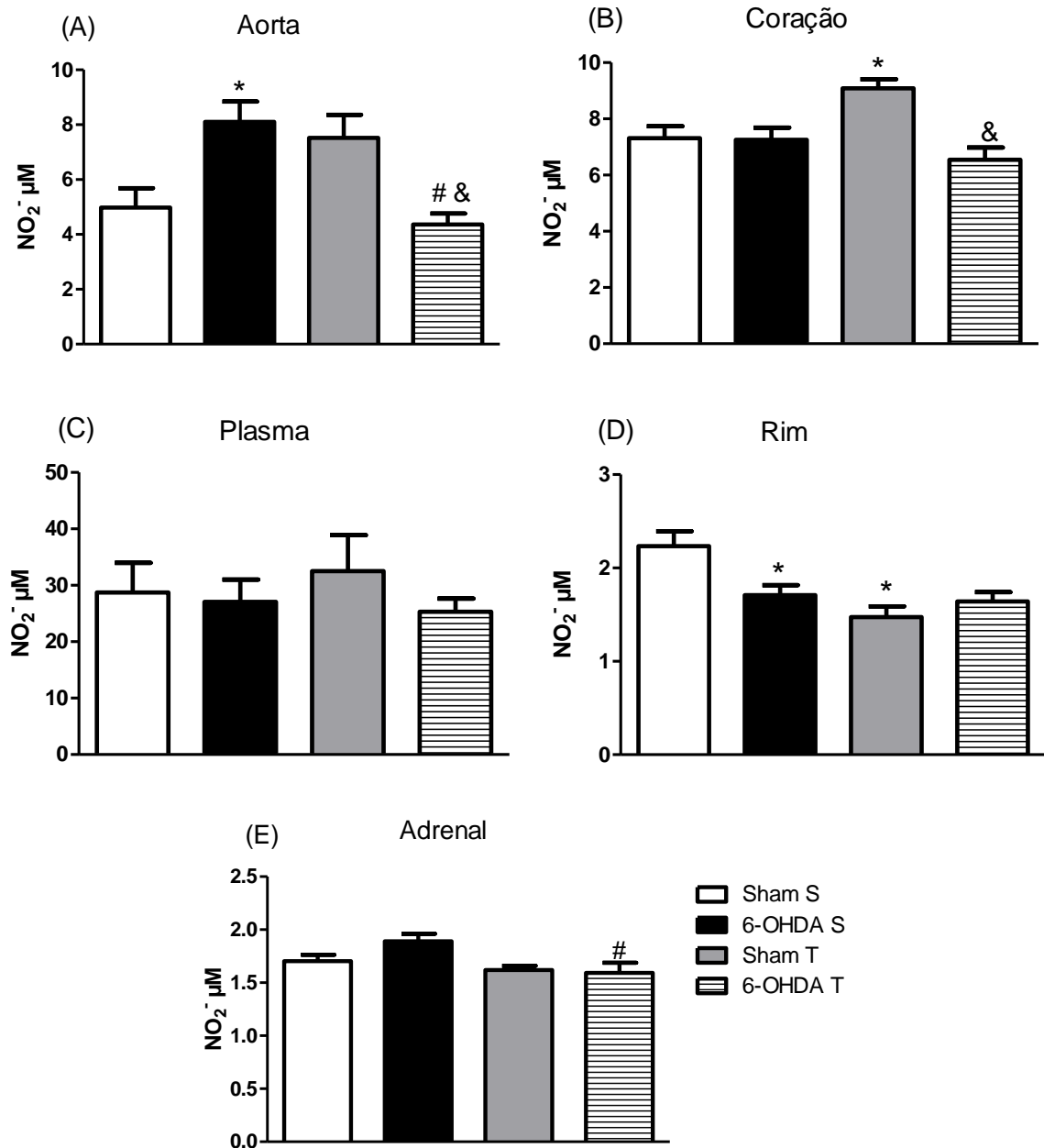


Figura 3. Alterações na produção de NO_2^- na aorta (a), coração (b), plasma (c), rim direito (d) e adrenal (e) de animais sedentários ou submetidos ao treinamento físico, com ou sem lesão por 6-OHDA. * $p < 0,05$ vs Sham S; # $p < 0,05$ vs 6-OHDA S; & $p < 0,05$ vs Sham T. Os valores estão expressos em média \pm SEM (ANOVA One-Way, seguido do teste de Bonferroni). A) Aorta: Sham S (n=9); 6-OHDA S (n=14); Sham T (n=8); 6-OHDA T (n=10). B) Coração: Sham S (n=9); 6-OHDA S (n=9); Sham T (n=8); 6-OHDA T (n=8). C) Plasma: Sham S (n=9); 6-OHDA S (n=11); Sham T (n=8); 6-OHDA T (n=11). D) Rim: Sham S (n=9); 6-OHDA S (n=9); Sham T (n=6); 6-OHDA T (n=7). E) Adrenal: Sham S (n=12); 6-OHDA S (n=10); Sham T (n=7); 6-OHDA T (n=8).

4.3 PARÂMETROS CARDIOVASCULARES

4.3.1 Análise dos parâmetros cardiovasculares basais em animais sedentários ou submetidos ao treinamento físico, com ou sem lesão por 6-OHDA

Os valores basais para PAM, FC, pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD) para cada grupo foram obtidos como o valor médio de pelo menos 10 minutos de registro basal para cada animal. Os dados mostraram que houve menor PAM e PAS nos animais 6-OHDA T em relação ao Sham T ($p < 0,05$). Também, a FC basal estava diminuída nos animais Sham T e no 6-OHDA T em relação aos seus controles Sham S e 6-OHDA S ($p < 0,05$), respectivamente (Tabela 1). Os animais que passaram pelo treinamento físico apresentaram bradicardia de repouso após 4 semanas de natação.

Tabela 1: Parâmetros basais de PAM (a), FC (b), PAS (c) e PAD (d) de animais sedentários ou submetidos ao treinamento físico, com ou sem lesão por 6-OHDA.

	Sham S (n=10)	6-OHDA S (n=6)	Sham T (n=8)	6-OHDA T (n=7)
PAM (mmHg)	106,1 ± 1,88	100,2 ± 1,84	110,1 ± 2,38	100,2 ± 1,51 ^{&}
FC (bpm)	348,2 ± 7,73	355,7 ± 4,81	313,0 ± 4,72 [*]	311,9 ± 13,53 [#]
PAS (mmHg)	127,8 ± 2,56	121,3 ± 2,08	129,4 ± 2,68	118,9 ± 1,83 ^{&}
PAD (mmHg)	88,16 ± 2,33	82,34 ± 2,08	94,59 ± 2,73	84,97 ± 1,79

* $p < 0,05$ vs Sham S; # $p < 0,05$ vs 6-OHDA S; & $p < 0,05$ vs Sham T. Os valores estão expressos em média ± SEM. O número dos grupos está entre os parenteses (ANOVA One-way, seguido do teste de Bonferroni). PAM: pressão arterial média; FC: frequência cardíaca; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica.

4.3.2 Análise dos parâmetros cardiovasculares basais (PAM e FC) em animais sedentários ou submetidos ao treinamento físico, com ou sem lesão por 6-OHDA, após injeção endovenosa de salina (1mg/Kg) e de L-NAME (10mg/Kg)

Foi realizada a injeção in bolus de salina 0,9% (1mg/kg) após 30 minutos de registro basal da PAM e FC e, após 10 minutos, a injeção in bolus de L-NAME (10mg/kg) foi efetuada, seguido do registro por 2h dos parâmetros cardiovasculares. As análises foram realizadas considerando os valores basais no tempo -20. No tempo -10, foi realizada a administração de salina e no tempo 0, a administração de L-NAME. A evolução temporal dos valores médios da PAM e FC entre os grupos experimentais após a administração in bolus de salina e L-NAME está representada na Figura 4.

Após injeção de salina não houve alterações nos parâmetros cardiovasculares de PAM e FC em todos os grupos experimentais. Já, a administração de L-NAME levou ao aumento da PAM e diminuição da FC para todos os animais (Figura 4).

Pode-se observar na figura 4a, que houve um menor aumento da PAM no tempo 20 no grupo 6-OHDA S em relação ao Sham S ($p < 0,05$). Nos tempos 5, 10, 40, 50 e 70 houve um menor aumento da PAM do grupo 6-OHDA T em relação ao Sham T ($p < 0,05$).

Em relação a FC, houve diferença entre os animais Sham T com o grupo Sham S nos tempos 30, 40, 80, 90 e 100 ($p < 0,05$). E entre 6-OHDA T em relação ao 6-OHDA S nos tempos 50 ao tempo 120. Os animais treinados mantiveram a bradicardia por mais tempo.

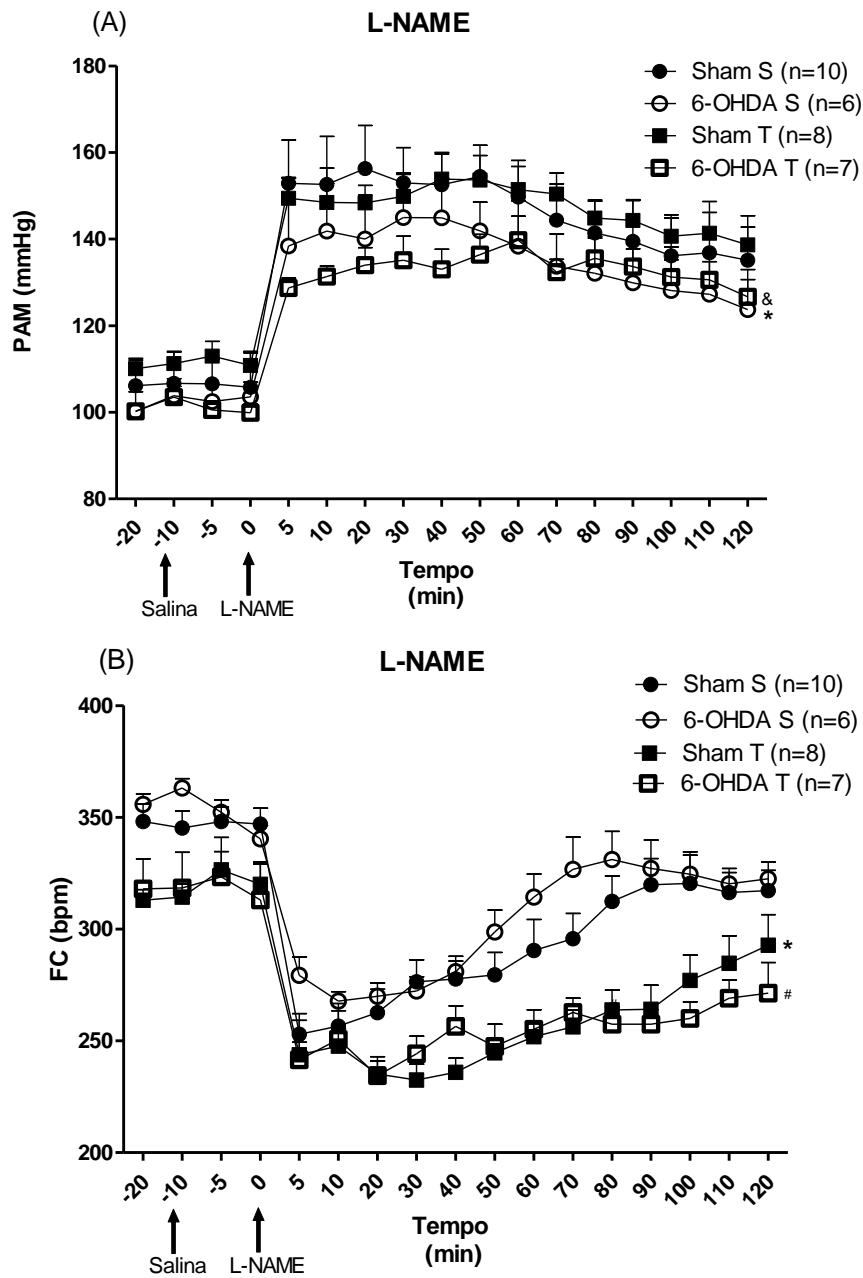


Figura 4. Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (a) e na frequência cardíaca (FC) (b), após a administração endovenosa de salina (tempo -10) e de L-NAME (10mg/kg – tempo 0) em animais sedentários ou submetidos ao treinamento físico, com ou sem lesão por 6-OHDA. * $p < 0,05$ vs Sham S; # $p < 0,05$ vs 6-OHDA S; & $p < 0,05$ vs Sham T. Os valores estão expressos em média \pm SEM. O número dos grupos está entre os parenteses (RMANOVA Two-way, seguido do teste de Bonferroni). Em (a), há diferença significativa entre 6-OHDA S e Sham S no tempo 20 ($p < 0,05$), e há diferença significativa entre 6-OHDA T e Sham T nos tempos 5, 10, e 40, 50 e 70 ($p < 0,05$). Em (b), há diferença significativa entre Sham T com Sham S nos tempos 30, 40, 80, 90 e 100 ($p < 0,05$). E entre 6-OHDA T em relação ao 6-OHDA S nos tempos 50 ao tempo 120.

4.3.3 Análise da variabilidade da PAS

Nossos resultados mostram uma menor variação na modulação da PAS no domínio do tempo de animais 6-OHDA S em relação ao Sham S (Figura 5) entre os grupos treinados não houve diferença. Na análise espectral de LFabs e VLFabs de PAS, não houve diferença entre os 4 grupos.

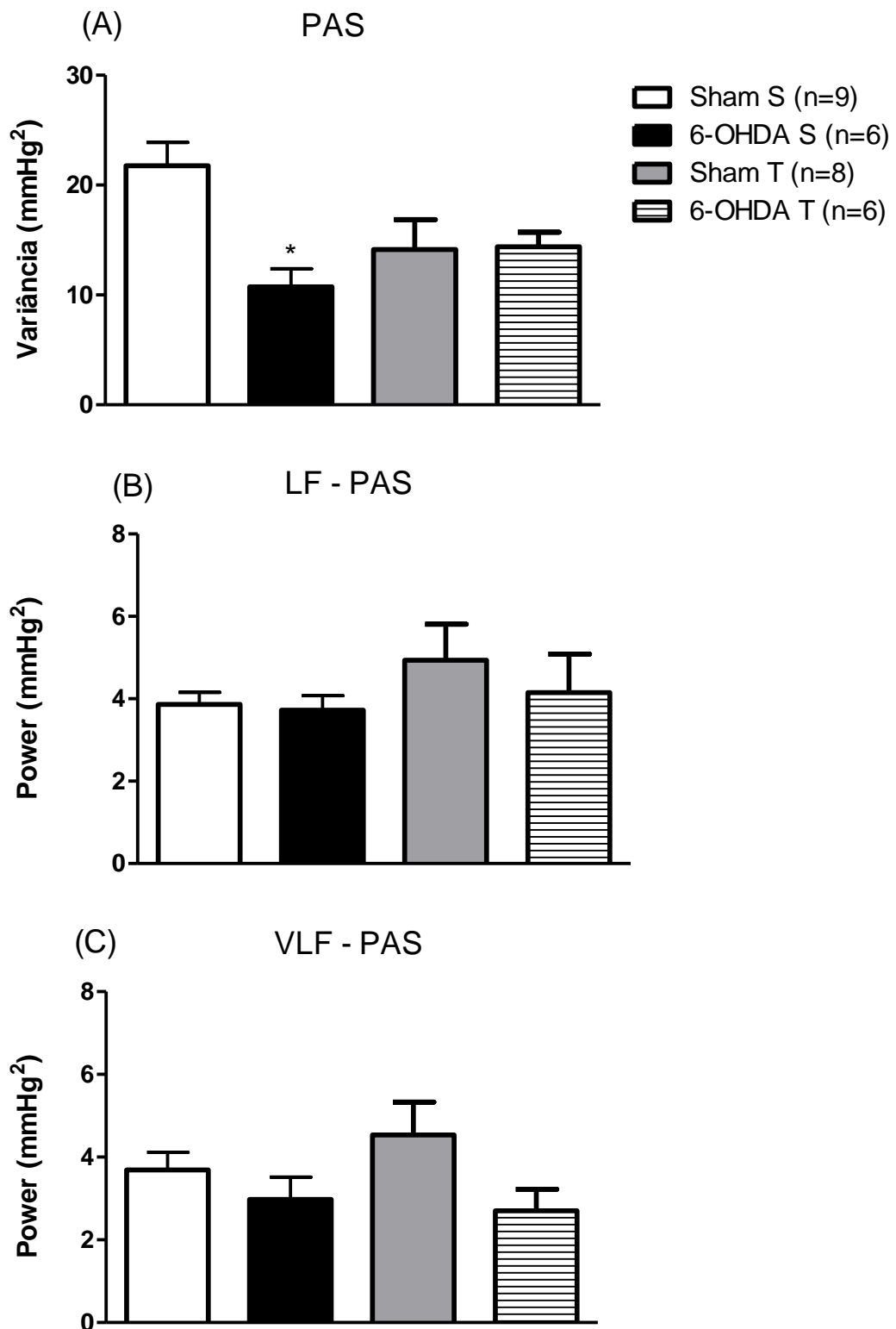


Figura 5. Análise da modulação autonômica em (A) variância de PAS, (B) LF abs e (C) VLF abs. A pressão arterial sistólica (PAS) foi realizada em animais sedentários ou submetidos ao treinamento físico, com ou sem lesão por 6-OHDA. * $p < 0,05$ vs Sham S; # $p < 0,05$ vs. 6-OHDA S; $p < 0,05$ vs Sham T. Os valores são expressos como média \pm SEM. O número de grupos está entre parênteses (ANOVA One-way, seguido do teste Bonferroni). LF, baixa frequência; HF, alta frequência; VLF, muito baixa frequência.

4.3.4 Análise da variabilidade do IP

Para o IP, não houve diferença estatística na variância da modulação no domínio do tempo, também, não houve diferença na relação LF/HF e para os componentes normalizados LF e HF entre os 4 grupos avaliados (Figura 6).

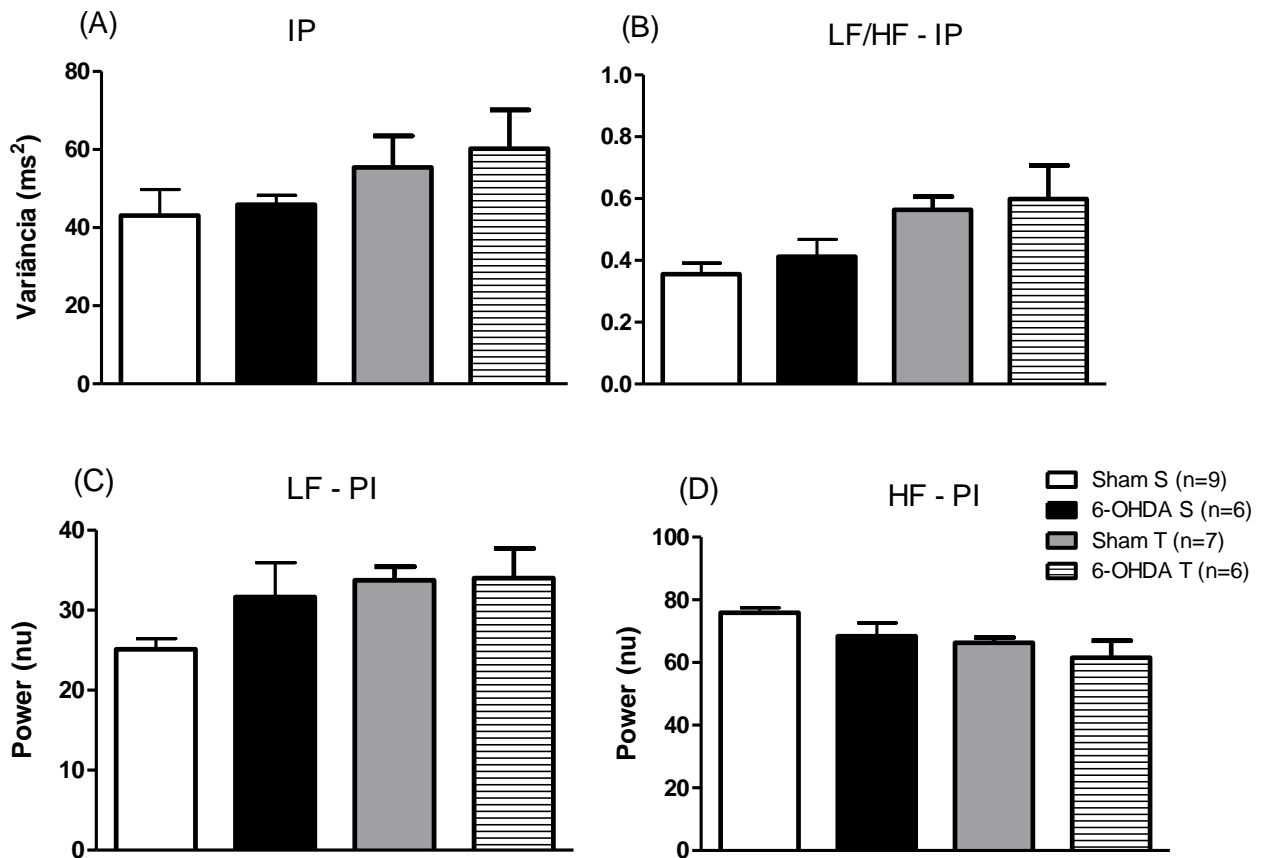


Figura 6. Análise da modulação autonômica em (A) variância de IP, (B) LF/HF, (C) LF nu e (D) HF nu. A variabilidade da frequência cardíaca foi realizada em animais sedentários ou submetidos ao treinamento físico, com ou sem lesão 6-OHDA. * $p < 0,05$ vs Sham S; # $p < 0,05$ vs 6-OHDA S; $p < 0,05$ vs Sham T. Os valores estão expressos como média \pm SEM. O número de grupos está entre parênteses (ANOVA One-way, seguido do teste de Bonferroni). LF, baixa frequência; HF, alta frequência; IP, intervalo de pulso.

4.3.5 Análise do Barorreflexo Espontâneo

Em relação ao barorreflexo espontâneo, não houve diferença entre os 4 grupos no ganho total, nas sequências “up”, assim como nas sequências “down” entre os 4 grupos.

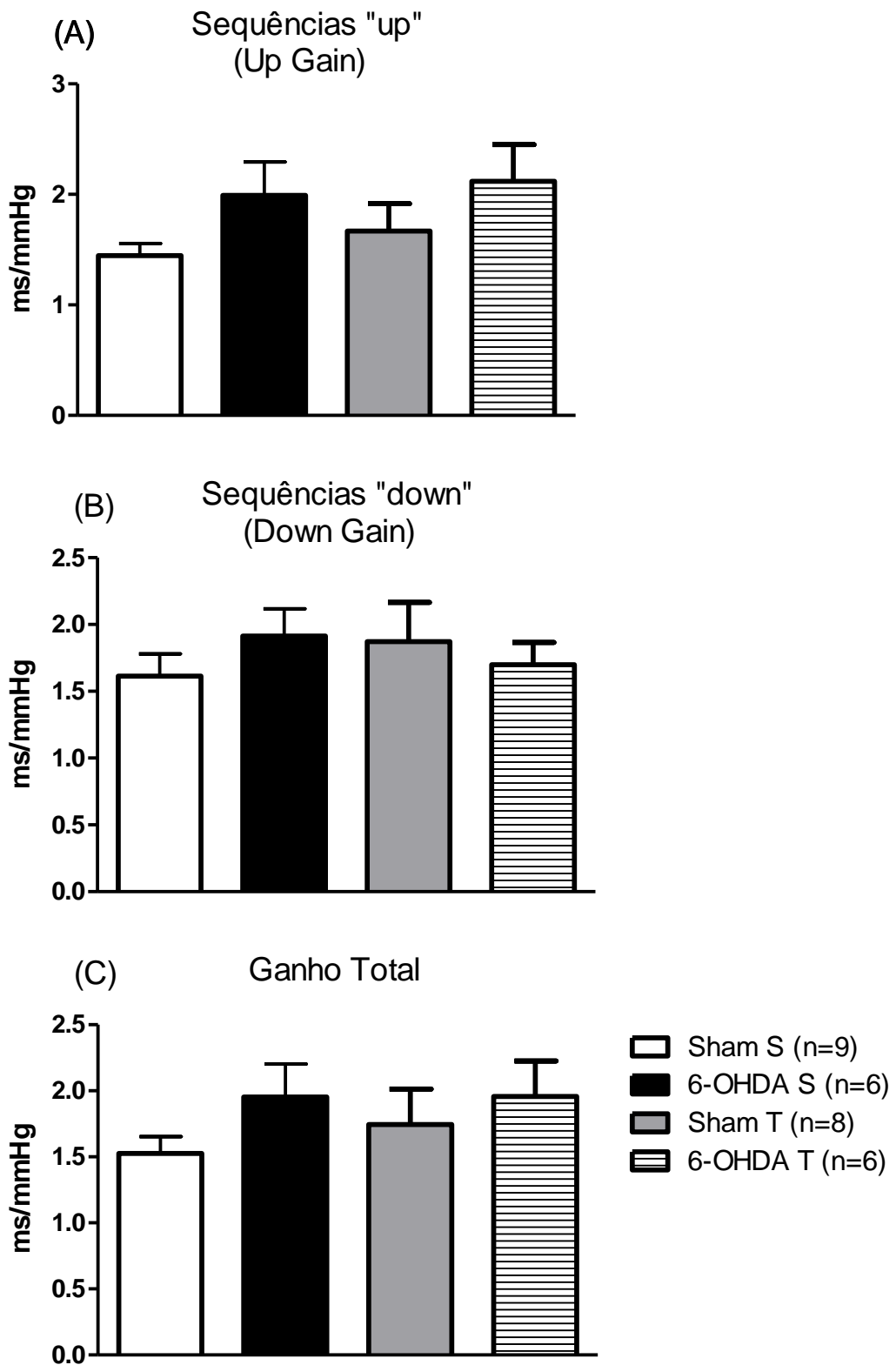


Figura 7. Análise do barorreflexo espontâneo em animais sedentários ou submetidos ao treinamento físico, com ou sem lesão por 6-OHDA, (A) Sequências "up" (Up gain), (B) Sequências "down" (Down gain) e (C) Ganho total. * $p < 0,05$ vs Sham S; # $p < 0,05$ vs 6-OHDA S; $p < 0,05$ vs Sham T. Os valores estão expressos como média \pm SEM. O número de grupos está entre parênteses (ANOVA One-way, seguido do teste de Bonferroni).

5. DISCUSSÃO

Neste estudo foi possível investigar as alterações cardiovasculares e concentrações de NO tissular e no plasma em animais induzidos ao parkinsonismo após lesão na SNPc por infusão de 6-OHDA, submetidos previamente a exercício crônico ou mantidos sedentários. A adequação do modelo de parkinsonismo foi comprovado pela diminuição nos níveis de DA no estriado nos animais lesados; no entanto, o treinamento físico não foi capaz de reverter essa perda de DA. Após 4 semanas de natação, houve bradicardia de repouso nos dois grupos treinados (6-OHDA T e Sham T), também demonstrando a eficiência do protocolo de exercício em induzir condicionamento cardiovascular, o que já foi observado em vários outros estudos de nosso grupo utilizando este mesmo protocolo (MARTINS-PINGE et al., 2005; DE ABREU et al., 2009; MASTELARI et al., 2011). Em relação ao NO plasmático, não houve diferença estatística entre os grupos, porém, na aorta houve aumento nas concentrações de NO no grupo 6-OHDA S, e diminuição nos animais 6-OHDA T. Também, em relação ao coração, houve aumento de NO nos animais Sham T em relação aos sedentários e diminuição de NO nos animais 6-OHDA T em relação ao 6-OHDA S e Sham T. A administração de L-NAME promoveu alterações na modulação tônica da PAM e da FC nos diferentes grupos de animais, induzindo um aumento na PA e queda na FC. Os dados mostraram que os animais lesados responderam com menor aumento da PA em comparação aos controles em determinados tempos, e com relação à frequência cardíaca os grupos treinados mantiveram a bradicardia por mais tempo em relação aos grupos sedentários. Dessa forma, tivemos diferentes influências sobre os parâmetros cardiovasculares após a inibição da NOS.

O modelo de parkinsonismo por 6-OHDA, é um modelo clássico, que apresenta alterações comportamentais e motoras da DP (ARIZA et al., 2010; DUTY; JENNER, 2011). No presente estudo, pode-se observar que houve diminuição maior que 50% nas concentrações de DA após 7 dias de infusão de 6-OHDA, o que corrobora com outros estudos utilizando o mesmo modelo (ARIZA et al., 2015a; SILVA et al., 2015). Este é o grau de depleção encontrado em modelos animais que tentam mimetizar as fases iniciais da DP, em conjunto com o aparecimento dos sintomas motores (RODRIGUEZ-OROZ et al., 2009; DUTY; JENNER, 2011).

A natação durante 4 semanas prévias à indução do parkinsonismo não

promoveu diferença nas concentrações de DA, ou seja, não houve neuroproteção sobre a diminuição de DA. Dados da literatura em camundongos e utilizando exercícios prévios à lesão também não demonstram proteção dos neurônios dopaminérgicos (O'DELL et al., 2007; AGUIAR et al., 2014). Outros estudos no entanto, mostraram que a realização do exercício físico antes e/ou após a lesão por MTPT ou por 6-OHDA foi capaz de promover alterações protetoras e benéficas a estes animais (SIM et al., 2004; FAHERTY et al., 2005; AL-JARRAH et al., 2010; TUON et al., 2012). Em nosso modelo há diminuição bastante acentuada dos neurônios dopaminérgicos bilateralmente e em um curto período de tempo. Um dos estudos que mostram a neuroproteção, utilizaram um modelo diferente e com perda menor de dopamina estriatal, como nos estudos de Tillerson e colaboradores, onde a lesão por 6-OHDA foi unilateral e levou a queda de aproximadamente 25% de DA (TILLERSON et al., 2001, 2002). Em camundongos induzidos ao parkinsonismo crônico por MTPT (com uma dose que promove neurodegeneração severa e persistente dos neurônios dopaminérgicos), 4 semanas de esteira após a lesão, promove adaptações cardiovasculares e metabólica, mas não promove alterações nas funções dopaminérgicas nigroestriatais (AL JARRAH et al., 2007). Gerecke e colaboradores (2010) mostraram a importância do tempo e intensidade de exercício em camundongos que realizaram corrida espontânea durante um mês onde não houve proteção; durante 2 meses houve proteção parcial e durante três meses, houve proteção completa à perda de DA pelo parkinsonismo induzido pelo MPTP. Sendo assim, em experimentos com animais o tempo apropriado, a duração e a intensidade podem reduzir a lesão induzida por diferentes toxinas, porém, estudos que não mostram alterações, podem ser decorrentes de tempo e intensidade não suficientes para isto (HOU et al., 2017). Assim, é possível sugerir que no modelo de 6-OHDA as lesões bilaterais levaram a grande perda de neurônios dopaminérgicos, o que pode ter contribuído para a falta de neuroproteção com o exercício físico, além disso, realizar o exercício durante um período maior ou até mesmo durante o período de lesão poderia ter contribuído com a neuroproteção.

Até o momento não há estudos que tenham avaliado o NO no sistema cardiovascular e na adrenal e rim de animais induzidos ao parkinsonismo após 7 dias de lesão bilateral com 6-OHDA, e nem em outros modelos animais. Nosso trabalho mostra que não houve diferença na concentração de NO no plasma, mas sim, na aorta, coração, rim e adrenal. Um estudo que avaliou o NO periféricamente,

no sistema gastrointestinal de animais induzidos unilateralmente por 6-OHDA, mostrou que houve redução na expressão da nNOS entérica (BLANDINI et al., 2009). A maior parte dos estudos envolvendo modelos de parkinsonismo avalia as concentrações de NO cerebrais. Nesses estudos foi mostrado que há aumento na expressão de iNOS na SNPc e uma diminuição de nNOS na substância negra (LIBERATORE et al., 1999; CZARNECKA et al., 2013). Em humanos, um aumento da expressão de iNOS foi encontrada na SNPc em amostras cerebrais post-mortem de indivíduos com DP (HUNOT et al., 1996).

Considerando que a NOS se expressa de diferentes maneiras, é possível que o aumento de NO na aorta de animais 6-OHDA S possa ser decorrente do aumento da expressão de iNOS, devido a ativação pela via induzível. Após 4 semanas de natação, há aumento de NO no coração, e este pode ser devido ao aumento da eNOS, pois sabe-se que a atividade física regular leva a aumentos na expressão do gene para a eNOS e, posteriormente, da proteína eNOS (MCALLISTER; LAUGHLIN, 2006). Também, há aumento na produção periférica de NO devido ao “estresse de cisalhamento”, o qual favorece a síntese e biodisponibilidade de NO pelo endotélio vascular (GREEN et al., 2004; MCALLISTER; LAUGHLIN, 2006; FRANCESCO MARINO et al., 2009). Yang e colaboradores (2002) relatam que exercício aeróbico por meio da esteira durante 10 semanas promoveu aumento na expressão de iNOS e eNOS em células endoteliais da aorta de ratos (YANG et al., 2002). Após protocolo de natação de 3-4 semanas, ratos Sprague-Dawley tiveram expressão aumentada de nNOS no músculo esquelético e da eNOS nos pulmões, átrio e aorta (TATCHUM-TALOM et al., 2000). O exercício modula a atividade da eNOS, levando ao aumento da expressão dessa enzima nas células da aorta e do coração, sem alterações nos pulmões e na veia cava (DAO et al., 2011). Neste estudo, na aorta, no coração e na adrenal de animais 6-OHDA T ocorreu diminuição de NO, sugerindo o envolvimento das diferentes isoformas de NO com a implantação da lesão e a associação com o treinamento físico.

A literatura tem relatado que o treinamento físico é uma terapia não-farmacológica eficaz no controle da produção de NO pela via iNOS e na proteção da função endotelial em camundongos submetidos à dieta com alta ingestão de açúcar (SILVA et al., 2016). Em humanos com insuficiência cardíaca, um programa de treinamento físico de 6 meses foi efetivo na redução da expressão de iNOS no músculo esquelético (GIELEN et al., 2005). Sugere-se que o exercício físico por

natação possa ter promovido este mesmo efeito no controle da produção de NO pela iNOS na aorta, no coração e na adrenal de animais induzidos ao parkinsonismo por 6-OHDA após 4 semanas de natação. Entretanto, estudos adicionais devem ser realizados para avaliar a expressão das diferentes isoformas nestes diferentes grupos experimentais. Em relação ao rim, há diminuição nos grupos 6-OHDA S e Sham T em relação ao Sham S. Avaliando os diferentes grupos é possível observar alterações no grupo 6-OHDA S e no grupo Sham T, destacando que o grupo 6-OHDA T teve sua atividade de NO semelhante ao grupo Sham S, enfatizando que houve efeito do exercício sobre a produção de NO.

Em relação aos parâmetros cardiovasculares basais, não houve alterações nos valores de PAM e FC do grupo 6-OHDA S em relação ao Sham S, o que corrobora com dados da literatura utilizando o mesmo modelo (SILVA et al., 2015). O presente estudo confirma dados anteriores da literatura de que a natação não altera os valores de PAM em ratos, mas induz bradicardia de repouso (MEDEIROS et al., 2004; MEHANNA et al., 2007; MASTELARI et al., 2011; RAQUEL et al., 2016). Além disso, mostra que esta bradicardia se manteve presente mesmo depois de 7 dias após o último dia de natação tanto no grupo Sham T, quanto no grupo 6-OHDA T em relação aos seus controles. Uma diminuição na PAM e na PAS foi observada em 6-OHDA T quando comparado ao Sham T, o que pode ser decorrente de um aumento numérico nos valores de Sham T em relação ao Sham S, devido a um efeito compensatório da PA em relação à bradicardia de repouso.

A inibição da NOS por administração endovenosa de L-NAME promoveu hipertensão e bradicardia em todos os grupos, mostrando a participação tônica do NO no controle cardiovascular. A dose de 10mg/kg foi escolhida de acordo com o estudo de Chen e Hu (1997), os quais observaram a resposta máxima do aumento de PAM e diminuição da FC com esta dose (CHEN; HU, 2011). O L-NAME sofre hidrólise e forma L-NG-nitroarginina (L-NNA), esta, interage de forma não covalente com as três isoformas da NOS. A constante de dissociação das cNOS e iNOS é diferente, sendo maior na iNOS, na qual a ligação é revertida rapidamente (revisado por Vitecek et al., 2012). Dados na literatura, mostram hipertensão após L-NAME em animais com a mesma dose e mesmo tempo (GARDINER et al., 1990; CASTARDO-DE-PAULA et al., 2017).

A resposta ao L-NAME na PAM foi influenciada pela lesão, pois na curva houve menor aumento da PAM no tempo 20 no grupo 6-OHDA S em relação ao

Sham S. Nos tempos 5, 10, 40, 50 e 70 houve menor aumento da PAM do grupo 6-OHDA T em relação ao Sham T. Como citado anteriormente, o L-NAME parece estar mais envolvido com a inibição da via constitutiva, sugerindo que o tônus nitrérgico da eNOS está menor nos animais lesionados por 6-OHDA em relação aos animais Sham, de forma independente do treinamento físico. A resposta da FC ao L-NAME, parece ter sido influenciada pelo treinamento físico, pois houve diferença entre o grupo Sham T com o grupo Sham S nos tempos 30, 40, 80, 90 e 100, e entre 6-OHDA T em relação ao 6-OHDA S nos tempos 50 ao tempo 120. Considerando que o exercício físico promove maior sensibilidade barorreflexa (MEDEIROS et al., 2004; RAQUEL et al., 2016), é possível que após 4 semanas de natação, os animais treinados foram mais capazes de corrigir instantaneamente as oscilações na PAM, melhorando a homeostase cardiovascular (RAQUEL et al., 2016) e mantendo a bradicardia por mais tempo em comparação aos sedentários, enquanto a PA se mantém acima do basal. Embora a análise do barorreflexo espontâneo não tenha se mostrado diferente entre os grupos, é possível que estímulos farmacológicos, como o aumento da PA pelo L-NAME, tenham alcançado potência para mostrar efeitos de ganho barorreflexo maiores nos grupos treinados.

Em relação à variabilidade, dados da literatura mostram que os animais induzidos ao parkinsonismo por 6-OHDA mostram variabilidade reduzida da pressão arterial sistólica e maior atividade barorreflexa (ARIZA et al., 2015b). A variabilidade da frequência cardíaca é uma medida que pode avaliar a modulação do SNA sobre o sistema cardiovascular no exercício físico e em condições patológicas. Mudanças em seus padrões funcionam como um indicador de saúde, uma pessoa saudável geralmente apresenta maior variabilidade de FC, de modo que a redução da variabilidade de FC pode funcionar como um indicador de várias doenças (VANDERLEI et al., 2009). Nossos resultados mostram uma variação menor na modulação do domínio do tempo de PAS de animais 6-OHDA S em relação ao Sham S, o que corrobora com os dados da literatura (ARIZA et al., 2015a). No entanto, apesar de mostrarem bradicardia de repouso após 4 semanas de natação, não houve alterações na variabilidade da FC e na atividade barorreflexa, o que pode ser devido ao fato de que a análise ocorreu após 8 dias do último dia de natação, podendo ter iniciado as perdas funcionais adquiridas pelo treinamento. Além disso, existem componentes não autonômicos que influenciam a redução da frequência cardíaca em repouso, como alterações na atividade marcapasso no nodo sinusal

que leva a diminuição da frequência cardíaca intrínseca (BAHRAINY et al., 2016).

As diferentes isoformas de NOS parecem ter atividades diferente entre os grupos 6-OHDA e Sham, e o exercício físico foi capaz de modular a quantidade do NO. Além disso, foi possível observar que as alterações na resposta ao L-NAME na PAM foram decorrentes da lesão e as alterações na FC foram consequentes do exercício físico. Esses efeitos funcionais se relacionam com os achados do NO na aorta e no coração, onde o aumento do NO na aorta nos animais lesados pode ser decorrente da via induzível e proporcionou menor aumento da pressão após inibição da cNOS. Por outro lado, o aumento do NO no coração dos animais treinados é sugestivo dos efeitos barorreflexos sobre a FC, sendo refletidos pela bradicardia aumentada nesses animais ao aumento da pressão. Sendo assim, estudos futuros para quantificar a expressão das diferentes isoformas da NOS envolvidas nos componentes periféricos e centrais do controle cardiovascular poderão elucidar melhor os mecanismos envolvidos na disfunção cardiovascular e a modulação pelo exercício prévio.

6. CONCLUSÕES

Nossos achados indicam que o exercício físico não promoveu proteção em relação a diminuição de dopamina no estriado e que as alterações nas respostas ao L-NAME na pressão arterial foram decorrentes da lesão e na frequência cardíaca parecem ter sido devido ao treinamento físico. Os dados também sugerem o envolvimento das diferentes isoformas da NOS. Além disso, este é o primeiro estudo a mostrar as alterações nas concentrações de NO no sistema cardiovascular de animais induzidos ao parkinsonismo por 6-OHDA na SNPc e a modulação por meio do exercício físico prévio.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, A. S.; TRISTÃO, F. S. M.; AMAR, M.; CHEVARIN, C.; GLASER, V.; DE PAULA MARTINS, R.; MOREIRA, E. L. G.; MONGEAU, R.; LANFUMEY, L.; RAISMAN-VOZARI, R.; LATINI, A.; PREDIGER, R. D. S. Six weeks of voluntary exercise don't protect C57BL/6 mice against neurotoxicity of MPTP and MPP+. **Neurotoxicity Research**, v. 25, n. 2, p. 147–152, 2014.

AL-JARRAH, M.; JAMOUS, M.; AL ZAILAEY, K.; BWEIR, S. O. Endurance exercise training promotes angiogenesis in the brain of chronic/progressive mouse model of parkinson's disease. **NeuroRehabilitation**, v. 26, n. 4, p. 369–373, 2010.

AL-JARRAH, M.; POTHAKOS, K.; NOVIKOVA, L.; SMIRNOVA, I.V.; KURZ, M.J.; STEHNO-BITTEL, L.; LAU, Y.S. Endurance exercise promotes cardiorespiratory rehabilitation without neurorestoration in the chronic mouse model of Parkinsonism 12 with severe neurodegeneration. **Neuroscience**, v. 149, p. 28–37, 2007.

ALONSO, A. ; HUANG, X.; MOSLEY, T. H.; HEISS, G.; CHEN, H. Heart rate variability and the risk of Parkinson disease: The Atherosclerosis Risk in Communities study. **Annals of neurology**, v. 77, n. 5, p. 877-883, 2015.

ARIZA, D.; LIMA, M. M. S.; MOREIRA, C. G.; DOMBROWSKI, P. A.; AVILA, T. V.; ALLEMAND, A.; B MENDES, D. A. G.; CUNHA, C. Da; VITAL, M. A. B. F. Intranigral LPS administration produces dopamine, glutathione but not behavioral impairment in comparison to MPTP and 6-OHDA neurotoxin models of Parkinson's disease. **Neurochemical Research**, v. 35, n. 10, p. 1620–1627, 2010.

ARIZA, D.; SISDELI, L.; CRESTANI, C. C.; FAZAN, R.; MARTINS-PINGE, M. C. Dysautonomias in Parkinson's disease: cardiovascular changes and autonomic modulation in conscious rats after infusion of bilateral 6-OHDA in substantia nigra. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 308, n. 3, p. H250–H257, 2015a. Disponível em: <<http://ajpheart.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajpheart.00406.2014>>.

ARIZA, D.; SISDELI, L.; CRESTANI, C. cesar; FAZAN, R.; MARLI CARDOSO MARTINS-PINGE. Dysautonomias in Parkinson's disease: cardiovascular changes and autonomic modulation in conscious rats after infusion of bilateral 6-OHDA in substantia nigra. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 308, n. 3, p. H250–H257, fev. 2015b.

BAHRAINY, S.; LEVY, W. C.; BUSEY, J. M.; CALDWELL, J. H.; STRATTON, J. R. Exercise training bradycardia is largely explained by reduced intrinsic heart rate. **International Journal of Cardiology**, v. 222, p. 213–216, 2016.

BARTHWAL, M. K.; SRIVASTAVA, N.; DIKSHIT, M. Role of nitric oxide in a progressive neurodegeneration model of Parkinson's disease in the rat. **Redox Rep**, v. 6, n. 5, p. 297–302, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11778847>.

BLANDINI, F. Neural and immune mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 8, n. 1, p. 189–201, 2013.

BLANDINI, F.; BALESTRA, B.; LEVANDIS, G.; CERVIO, M.; GRECO, R.; TASSORELLI, C.; COLUCCI, M.; FANIGLIONE, M.; BAZZINI, E.; NAPPI, G.; CLAVENZANI, P.; VIGNERI, S.; DE GIORGIO, R.; TONINI, M. Functional and neurochemical changes of the gastrointestinal tract in a rodent model of Parkinson's disease. **Neuroscience Letters**, v. 467, n. 3, p. 203–207, 2009.

BOULAMERY, A.; SIMON, N.; VIDAL, J.; MEDICALE, L. D. P.; MÉDECINE, F. De; F, B. J. M. Effects of L-Dopa on circadian rhythms of 6-OHDA striatal lesioned rats: a radiotelemetric study. **Chronobiology international**, v. 27, n. 2, p. 251–264, 2010.

CASTARDO-DE-PAULA, J. C.; DE CAMPOS, B. H.; AMORIM, E. D. T.; DA SILVA, R. V.; DE FARIAS, C. C.; HIGACHI, L.; PINGE-FILHO, P.; BARBOSA, D. S.; MARTINS-PINGE, M. C. Cardiovascular risk and the effect of nitric oxide synthase inhibition in female rats: The role of estrogen. **Experimental Gerontology**, v. 97, n. July, p. 38–48, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2017.07.016>>.

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

CHEN, H. I.; HU, C. T. Endogenous nitric oxide on arterial hemodynamics : a comparison between normotensive and hypertensive rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, p. 1816–1823, 2011.

CZARNECKA, A.; LENDA, T.; DOMIN, H.; KONIECZNY, J.; ŚMIAŁOWSKA, M.; LORENC-KOCI, E. Alterations in the expression of nNOS in the substantia nigra and subthalamic nucleus of 6-OHDA-lesioned rats: The effects of chronic treatment with L-DOPA and the nitric oxide donor, molsidomine. **Brain Research**, v. 1541, p. 92–105, 2013.

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

DAO, V. T. V.; FLOEREN, M.; KUMPF, S.; BOTH, C.; PETER, B.; BALZ, V.; SUVORAVA, T.; KOJDA, G. Catalase activity prevents exercise-induced up-regulation of vasoprotective proteins in venous tissue. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 15, n. 11, p. 2326–2334, 2011.

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

DE ABREU, S. B.; LENHARD, A.; MEHANNA, A.; DE SOUZA, H. C. D.; DE AGUIAR CORREA, F. M.; HASSER, E. M.; MARTINS-PINGE, M. C. Role of paraventricular nucleus in exercise training-induced autonomic modulation in conscious rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 148, n. 1–2, p. 28–35, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.autneu.2009.02.007>>.

- DEL-BEL, E.; PADOVAN-NETO, F. E.; RAISMAN-VOZARI, R.; LAZZARINI, M. Role of Nitric Oxide in Motor Control : Implications for Parkinson's Disease pathophysiology and Treatment. **Current pharmaceutical design**. p. 471–488, 2011.
- DICARLO, S.E.; BISHOP, V.S. Exercise training enhances cardiac afferent inhibition 5 of baroreflex function. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory 6 Physiology**, v. 258, n. 1, p. H212-H220, 1990.
- DI MONTE, D. A.; ROYLAND, J. E.; JAKOWEC, M. W.; LANGSTON, J. W. Role of nitric oxide in methamphetamine neurotoxicity: protection by 7-nitroindazole, an inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. **Journal of Neurochemistry**, v. 67, n. 6, p. 2443–2450, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8931477>.
- DUTRA, S. G. V; PEREIRA, A. P. M.; TEZINI, G. C. S. V; MAZON, J. H.; MARTINS-PINGE, M. C.; SOUZA, H. C. D. Cardiac Autonomic Modulation Is Determined by Gender and Is Independent of Aerobic Physical Capacity in Healthy Subjects. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–9, 2013.
- DUTY, S.; JENNER, P. Animal models of Parkinson's disease: A source of novel treatments and clues to the cause of the disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 4, p. 1357–1391, 2011.
- FAHERTY, C. J.; SHEPHERD, K. R.; HERASIMTSCHUK, A.; SMEYNE, R. J. Environmental enrichment in adulthood eliminates neuronal death in experimental Parkinsonism. **Molecular Brain Research**, v. 134, n. 1, p. 170–179, 2005.
- FALQUETTO, B.; TUPPY, M.; POTJE, S. R.; MOREIRA, T. S.; ANTONIALI, C.; TAKAKURA, A. C. Cardiovascular dysfunction associated with neurodegeneration in an experimental model of Parkinson's disease. **Brain Research**, v. 1657, p. 156–166, 2017.
- FRANCESCOMARINO, S. Di; SCIARTILLI, A.; VALERIO, V. Di; BALDASSARRE, A. Di; GALLINA, S. The effect of physical exercise on endothelial function. **Sports Medicine**, v. 39, n. 10, p. 797–812, 2009.
- GARDINER, S. M.; COMPTON, A. M.; KEMP, P. a; BENNETT, T. Regional and cardiac haemodynamic responses to glyceryl trinitrate, acetylcholine, bradykinin and endothelin-1 in conscious rats: effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester. **British journal of pharmacology**, v. 101, n. 3, p. 632–9, 1990. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1917737&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- GERECKE, K. M.; JIAO, Y.; PANI, A.; PAGALA, V.; SMEYNE, R. J. Exercise protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. **Brain research**, v. 1341, p. 72–83, 2010.

GIELEN, S.; ADAMS, V.; LINKE, A.; ERBS, S.; MÖBIUS-WINKLER, S.; SCHUBERT, A.; SCHULER, G.; HAMBRECHT, R. Exercise training in chronic heart failure: correlation between reduced local inflammation and improved oxidative capacity in the skeletal muscle. **European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation**, v. 12, n. 4, p. 393–400, 2005. Disponível em: <<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=16079649&retmode=ref&cmd=prlinks>>.

GOES, A. T. R.; SOUZA, L. C.; FILHO, C. B.; DEL FABBRO, L.; DE GOMES, M. G.; BOEIRA, S. P.; JESSE, C. R. Neuroprotective effects of swimming training in a mouse model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine. **Neuroscience**, v. 256, p. 61–71, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.09.042>>.

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

GOLBIDI, S.; LAHER, I. Exercise and the cardiovascular system. **Cardiology Research and Practice**, v. 1, n. 1, 2012.

GOLDSTEIN, D. S. Orthostatic hypotension as an early finding in Parkinson's disease. **Clinical Autonomic Research**, v. 16, n. 1, p. 46–54, 2006.

GOODWIN, V. A.; RICHARDS, S. H.; TAYLOR, R. S.; TAYLOR, A. H.; CAMPBELL, J. L. The effectiveness of exercise interventions for people with Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. **Movement Disorders**, v. 23, n. 5, p. 631–640, 2008.

GREEN, D. J.; MAIORANA, A.; O'DRISCOLL, G.; TAYLOR, R. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. **The Journal of physiology**, v. 561, n. Pt 1, p. 1–25, 2004. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1665322&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

GUIX, F. X.; URIBESALGO, I.; COMA, M.; MUÑOZ, F. J. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Progress in Neurobiology**, v. 76, n. 2, p. 126–152, 2005.

HAMI, J.; HOSSEINI, M.; SHAHI, S.; LOTFI, N.; TALEBI, A.; AFSHAR, M. Effects of L-arginine pre-treatment in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's diseases in Balb/c mice. **Iranian journal of neurology**, v. 14, n. 4, p. 195–203, 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4754598&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

HOU, L.; CHEN, W.; LIU, X.; QIAO, D.; ZHOU, F.-M. Exercise-Induced Neuroprotection of the Nigrostriatal Dopamine System in Parkinson's Disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 9, n. November, 2017a. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnagi.2017.00358/full>>.

HOU, L.; CHEN, W.; LIU, X.; QIAO, D.; ZHOU, F. M. Exercise-induced neuroprotection of the nigrostriatal dopamine system in Parkinson's disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 9, n. NOV, 2017b.

HUNOT, S.; BOISSIÈRE, F.; FAUCHEUX, B.; BRUGG, B.; MOUATT-PRIGENT, A.; AGID, Y.; HIRSCH, E. C. Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 72, n. 2, p. 355–363, 1996.

ITO, D.; ITO, O.; MORI, N.; CAO, P.; SUDA, C.; MUROYA, Y.; HAO, K.; SHIMOKAWA, H.; KOHZUKI, M. Exercise training upregulates nitric oxide synthases in the kidney of rats with chronic heart failure. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 40, n. 9, p. 617–625, 2013.

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

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

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

LAU, L. M. L. De; BRETELER, M. M. B. Epidemiology of Parkinson's disease. **The Lancet Neurology** v. 5, n. June, p. 525–535, 2006.

LIBERATORE, G. T.; JACKSON-LEWIS, V.; VUKOSAVIC, S.; MANDIR, A. S.; VILA, M.; MCAULIFFE, W. G.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M.; PRZEDBORSKI, S. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. **Nature Medicine**, v. 5, n. 12, p. 1403–1409, 1999.

MARTINS-PINGE, M. C. Cardiovascular and autonomic modulation by the central nervous system after aerobic exercise training. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 9, p. 848–854, 2011.

MARTINS-PINGE, M. C.; BECKER, L. K.; LUCCIZANO GARCIA, M. R.; ZOCCAL, D. B.; NETO, R. V.; BASSO, L. S.; DE SOUZA, H. C. D.; LOPES, O. U. Attenuated pressor responses to amino acids in the rostral ventrolateral medulla after swimming training in conscious rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 122, n. 1–2, p. 21–28, 2005.

MASTELARI, R. B.; DE SOUZA, H. C. D.; LENHARD, A.; DE AGUIAR CORRÊA, F. M.; MARTINS-PINGE, M. C. Nitric oxide inhibition in paraventricular nucleus on cardiovascular and autonomic modulation after exercise training in unanesthetized rats. **Brain Research**, v. 1375, p. 68–76, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2010.12.049>>.

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

MEDEIROS, A.; OLIVEIRA, E. M.; GIANOLLA, R.; CASARINI, D. E.; NEGRÃO, C. E.; BRUM, P. C. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 12, p. 1909–1917, 2004.

MEHANNA, A.; VITORINO, D. C.; PANIS, C.; BLANCO, E. E. A.; PINGE-FILHO, P.; MARTINS-PINGE, M. C. Cardiovascular and pulmonary effects of NOS inhibition in endotoxemic conscious rats subjected to swimming training. **Life Sciences**, v. 81, n. 16, p. 1301–1308, 2007.

MELO, R. M.; MARTINHO, E.; MICHELINI, L. C. T Training-induced, pressure-lowering effect in SHR: wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. **Hypertension**, v. 42, n. 4, p. 851-857, 2003.

MOLINA, J. A.; JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, F. J.; ORTÍ-PAREJA, M.; NAVARRO, J. A. The role of nitric oxide in neurodegeneration: Potential for pharmacological intervention. **Drugs and Aging**, v. 12, n. 4, p. 251–259, 1998.

MOORE, D. J.; WEST, A. B.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Molecular Pathophysiology of Parkinson's Disease. **Annual Review of Neuroscience**, v. 28, n. 1, p. 57–87, 2005. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.neuro.28.061604.135718>>.

MOUSTAFA, A. A.; CHAKRAVARTHY, S.; PHILLIPS, J. R.; GUPTA, A.; KERI, S.; POLNER, B.; FRANK, M. J.; JAHANSHAHI, M. Motor symptoms in Parkinson's disease: A unified framework. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 68, p. 727–740, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.07.010>>.

NAKABEPPU, Y.; TSUCHIMOTO, D.; YAMAGUCHI, H.; SAKUMI, K. Oxidative damage in nucleic acids and Parkinson's disease. **Journal of Neuroscience Research**, 2007. .

NAVARRO-GONZÁLVIZ, J. A.; GARCÍA-BENAYAS, C.; ARENAS, J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 679–681, 1998.

NICARETTA, D. H.; ROSSO, A. L.; MATTOS, J. P. de. Disautonomia na Doença de Parkinson, Revisão da literatura. **Rev Bras Neurol**, v. 47, n. 4, p. 25–29, 2011.

O'DELL, S. J.; GROSS, N. B.; FRICKS, A. N.; CASIANO, B. D.; NGUYEN, T. B.; MARSHALL, J. F. Running wheel exercise enhances recovery from nigrostriatal dopamine injury without inducing neuroprotection. **Neuroscience**, v. 144, n. 3, p. 1141–1151, 2007.

PALMA, J.-A.; CARMONA-ABELLAN, M.-M.; BARRIOBERO, N.; TREVINO-PEINADO, C.; GARCIA-LOPEZ, M.; FERNANDEZ-JARNE, E.; LUQUIN, M. R. Is cardiac function impaired in premotor Parkinson's disease? A retrospective cohort study. **Movement Disorders**, v. 28, n. 5, p. 591–596, 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mds.25431>>.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. San Diego, CA: Elsevier, 1998.

PRINSLOO, G. E.; LAURIE RAUCH, H. G.; DERMAN, W. E. A brief review and clinical application of heart rate variability biofeedback in sports, exercise, and rehabilitation medicine. **Physician and Sportsmedicine**, v. 42, n. 2, p. 88–99, 2014.

PRZEDBORSKI, S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 11, n. SUPPL. 1, p. 3–7, 2005.

RAQUEL, H. de A.; MASSON, G. S.; BARNA, B. F.; ZANLUQUI, N. G.; PINGE-FILHO, P.; MICHELINI, L. C.; MARTINS-PINGE, M. C. Swimming Training Modulates Nitric Oxide-Glutamate Interaction in the Rostral Ventrolateral Medulla in Normotensive Conscious Rats. **Frontiers in Physiology**, v. 7, n. June, p. 1–10, 2016. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fphys.2016.00221/abstract>>.

RODRIGUEZ-OROZ, M. C.; JAHANSHAHI, M.; KRACK, P.; LITVAN, I.; MACIAS, R.; BEZARD, E.; OBESO, J. A. Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. **The Lancet Neurology**, v. 8, n. 12, p. 1128–1139, 2009.

ROUTLEDGE, F. S.; CAMPBELL, T. S.; MCFETRIDGE-DURDLE, J. A.; BACON, S. L. Improvements in heart rate variability with exercise therapy. **The Canadian Journal of Cardiology**, v. 26, n. 6, p. 303–12, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20548976%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2903986>>.

SAKATA, M.; SEI, H.; TOIDA, K.; FUJIHARA, H.; URUSHIHARA, R.; MORITA, Y. Mesolimbic dopaminergic system is involved in diurnal blood pressure regulation. **Brain research**, v. 928, n. 1-2, p. 194-201, 2002.

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

SCHMIDT, C.; BERG, D.; HERTING; PRIEUR, S.; JUNGHANNS, S.; SCHWEITZER, K.; GLOBAS, C.; SCHÖLS, L.; REICHMANN, H.; ZIEMSEN, T. Loss of nocturnal blood pressure fall in various extrapyramidal syndromes. **Movement Disorders**, v. 24, n. 14, p. 2136–2142, 2009.

SCHULZ, J. B.; MATTHEWS, R. T.; MUQIT, M. M. K.; BROWNE, S. E.; BEAL, M. F. Inhibition of Neuronal Nitric Oxide Synthase by 7-Nitroindazole Protects Against MPTP Induced Neurotoxicity in Mice. **Journal of Neurochemistry**, v. 64, n. 2, p. 936–939, 1995.

SEI, H.; IKEMOTO, K.; ARAI, R.; MORITA, Y. Injection of 6-hydroxydopamine into the ventral tegmental area suppresses the increase in arterial pressure during REM sleep in the rat. **Sleep Res Online**, v. 2, p. 1-6, 1999.

SIAN, J.; GERLACH, M.; YODIM, M. B. H.; RIEDERER, P. Parkinson's disease: A major hypokinetic basal ganglia disorder. **Journal of Neural Transmission**, v. 106, n. 5–6, p. 443–476, 1999.

SILVA, A. S.; ARIZA, D.; DIAS, D. P. M.; CRESTANI, C. C.; MARTINS-PINGE, M. C. Cardiovascular and autonomic alterations in rats with Parkinsonism induced by 6-OHDA and treated with L-DOPA. **Life Sciences**, v. 127, p. 82–89, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2015.01.032>>.

SILVA, J. F.; CORREA, I. C.; DINIZ, T. F.; LIMA, P. M.; SANTOS, R. L.; CORTES, S. F.; COIMBRA, C. C.; LEMOS, V. S. Obesity, inflammation, and exercise training: Relative contribution of inos and enos in the modulation of vascular function in the mouse aorta. **Frontiers in Physiology**, v. 7, n. SEP, p. 1–13, 2016.

SIM, Y. J.; KIM, S. S.; KIM, J. Y.; SHIN, M. S.; KIM, C. J. Treadmill exercise improves short-term memory by suppressing ischemia-induced apoptosis of neuronal cells in gerbils. **Neuroscience Letters**, v. 372, n. 3, p. 256–261, 2004.

SINGH, S.; DAS, T.; RAVINDRAN, A.; CHATURVEDI, R. K.; SHUKLA, Y.; AGARWAL, A. K.; DIKSHIT, M. Involvement of nitric oxide in neurodegeneration: a study on the experimental models of Parkinson's disease. **Redox report**, v. 10, n. 2, p. 103–9, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15949131>>.

SLACK, K.; BILLING, R.; MATTHEWS, S.; ALLBUTT, H. N.; EINSTEIN, R.; HENDERSON, J. M. Subtle cardiovascular dysfunction in the unilateral 6-hydroxydopamine-lesioned rat. **Parkinson's Disease**, v. 2010, 2010

SOUZA, H. C. D. D.; PENTEADO, D. M. D.; MARTIN-PINGE, M. C.; BARBOSA NETO, O.; TEIXEIRA, V. D. P. A.; BLANCO, J. H. D.; SILVA, V. J. D. D. Nitric oxide synthesis blockade increases hypertrophy and cardiac fibrosis in rats submitted to aerobic training. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 89, n. 2, p. 99-104, 2007.

SOUZA, H. C.; DE ARAÚJO, J. E.; MARTINS-PINGE, M. C.; COZZA, I. C.; MARTINS-DIAS, D. P. Nitric oxide synthesis blockade reduced the baroreflex sensitivity in trained rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 150, n.1, p. 38-44, 2009.

SOUSA, L. E.; MAGALHÃES, W. G.; BEZERRA, F. S.; SANTOS, R. A. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; ISOLDI, M. C.; ALZAMORA, A. C. Exercise training restores oxidative stress and nitric oxide synthases in the rostral ventrolateral medulla of renovascular hypertensive rats. **Free Radical Research**, v. 49, n. 11, p. 1335–1343, 2015. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10715762.2015.1069291>>.

TATCHUM-TALOM, R.; SCHULZ, R.; MCNEILL, J. R.; KHADOUR, F. H. Upregulation of neuronal nitric oxide synthase in skeletal muscle by swim training. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 279, n. 4, p. H1757-66, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11009463>>.

TAJIRI, N.; YASUHARA, T.; SHINGO, T.; KONDO, A.; YUAN, W.; KADOTA, T.; JING, M. Exercise exerts neuroprotective effects on Parkinson's disease model of rats. **Brain research**, v. 1310, p. 200-207, 2010.

TEZINI, G. C.; SILVEIRA, L. C.; MAIDA, K. D.; BLANCO, J. H. D.; SOUZA, H. C. The effect of ovariectomy on cardiac autonomic control in rats submitted to aerobic physical training. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 143, n. 1, p. 5-11, 2008.

TEZINI, G. C. S. V.; DIAS, D. P. M.; SOUZA, H. C. D. Aerobic physical training has little effect on cardiovascular autonomic control in aging rats subjected to early menopause. **Experimental Gerontology**, v. 48, n. 2, p. 147–153, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2012.11.009>>.

TILLERSON, J. L.; COHEN, A. D.; CAUDLE, W. M.; ZIGMOND, M. J.; SCHALLERT, T.; MILLER, G. W. Forced nonuse in unilateral parkinsonian rats exacerbates injury. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 15, p. 6790–6799, 2002.

TILLERSON, J. L.; COHEN, a D.; PHILHOWER, J.; MILLER, G. W.; ZIGMOND, M. J.; SCHALLERT, T. Forced limb-use effects on the behavioral and neurochemical effects of 6-hydroxydopamine. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 12, p. 4427–4435, 2001.

TUON, T.; VALVASSORI, S. S.; LOPES-BORGES, J.; LUCIANO, T.; TROM, C. B.; SILVA, L. A.; QUEVEDO, J.; SOUZA, C. T.; LIRA, F. S.; PINHO, R. A. Physical training exerts neuroprotective effects in the regulation of neurochemical factors in an animal model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 227, p. 305–312, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.09.063>>.

VANDERLEI, L. C. M.; PASTRE, C. M.; HOSHI, R. A.; CARVALHO, T. D. De; GODOY, M. F. De. Basic notions of heart rate variability and its clinical applicability. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 24, n. 2, p. 205–217, 2009.

VÍTEČEK, J.; LOJEK, A.; VALACCHI, G.; KUBALA, L. Arginine-based inhibitors of nitric oxide synthase: Therapeutic potential and challenges. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, 2012.

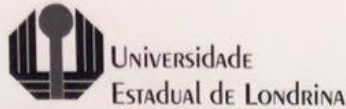
YANG, A.-L.; TSAI, S.-J.; JIANG, M. J.; JEN, C. J.; CHEN, H. Chronic exercise increases both inducible and endothelial nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells of rat aorta. **Journal of biomedical science**, v. 9, n. 2, p. 149–155, 2002.

YOON, M. C.; SHIN, M. S.; KIM, T. S.; KIM, B. K.; KO, I. G.; SUNG, Y. H.;... & KIM, 25 C. J. Treadmill exercise suppresses nigrostriatal dopaminergic neuronal loss in 6-26 hydroxydopamine-induced Parkinson's rats. **Neuroscience letters**, v. 423, n. 1, p. 27 12-17, 2007.

YUSTE, J. E.; ECHEVERRY, M. B.; ROS-BERNAL, F.; GOMEZ, A.; ROS, C. M.; CAMPUZANO, C. M.; FERNANDEZ-VILLALBA, E.; HERRERO, M. T. 7-Nitroindazole down-regulates dopamine/DARPP-32 signaling in neostriatal neurons in a rat model of Parkinson's disease. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 7, p. 1258–1267, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.07.031>>.

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

Cômite de Ética – ANEXO



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 232/2016

Londrina, 26 de Outubro de 2016.

Prezada Pesquisadora,

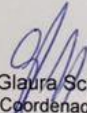
Certificamos que o projeto intitulado "**Avaliação das alterações cardiovasculares em ratos acordados e induzidos ao parkinsonismo por 6-OHDA após exercício físico**", protocolo CEUA nº **19653.2016.42**, sob a responsabilidade de **Marli Cardoso Martins Pinge**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em reunião realizada em **11/10/2016**.

O objetivo do projeto é avaliar os efeitos cardiovasculares e autonômicos em ratos acordados e induzidos ao parkinsonismo por infusão bilateral de 6-OHDA na Substancia negra parte compacta (SCpc), após 4 semanas de treinamento físico por natação. Será realizada cirurgia estereotáxica sob anestesia intraperitoneal de Cloridrato de Cetamina (100mg/Kg) e Cloridrato de Xilazina (20 mg/Kg) para microinfusão bilateral da toxina 6-OHDA na dose de 6mg/mL e outra cirurgia para canulação crônica da artéria e veia femoral. Ao final da primeira cirurgia será administrado uma dose única (30.000 UI) de pentabiótico veterinário e após a segunda cirurgia será administrado paracetamol 200 mg/mL na dose de 1,5 mg/100g de rato para analgesia. Registro da PA e FC dos animais no estado acordado e protocolos experimentais: 1) injeção endovenosa de antagonista α -adrenérgicos, o prazosin (1 mg / mL); 2) injeção endovenosa in bolus de solução de cianeto de potássio (KCN) na concentração de 50 μ g/1 mL; 3) injeção endovenosa in bolus de fenilefrina (FE) (3 μ g/1mL; Sigma Chemical) e nitroprussiato de sódio (NPS) 16 μ g/1mL (Sigma Chemical). Eutanásia por guilhotina. GI 3.

Vigência do Projeto	05/10/2016 a 28/02/2018
Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	240
Peso/Idade	200 a 250 g
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central / UEL
Amostras a serem coletadas	Cérebro, coração, vasos sanguíneos, plasma.

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

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


 Prof. Dra. Glaucia Scantamburlo Alves Fernandes
 Coordenadora da CEUA/UEL

Ilma. Sra.

Prof. Dra. Marli Cardoso Martins Pinge

Coordenadora do Projeto

Departamento de Ciências Fisiológicas / Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para Coordenação do Biotério Central / UEL; Chefe do Departamento de Ciências Fisiológicas e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas