

PRISCILA SALES DE CAMPOS

**ALTERAÇÕES RESPIRATÓRIAS AVALIADAS ATRAVÉS DE
CINERRADIOGRAFIA EM MODELOS ANIMAIS**

BRASÍLIA-DF, 2019

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS EM SAÚDE**

**ALTERAÇÕES RESPIRATÓRIAS AVALIADAS ATRAVÉS DE
CINERRADIOGRAFIA EM MODELOS ANIMAIS**

Priscila Sales de Campos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências e Tecnologias em Saúde

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jorge Luis Lopes Zeredo

BRASÍLIA-DF, 2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

SSA163a Sales de Campos, Priscila
ALTERAÇÕES RESPIRATÓRIAS AVALIADAS ATRAVÉS DE
CINERRADIOGRAFIA EM MODELOS ANIMAIS / Priscila Sales de
Campos; orientador Jorge Luís Lopes Zeredo. -- Brasília, 2019.
112 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências e Tecnologias em
Saúde) -- Universidade de Brasília, 2019.

1. CINERRADIOGRAFIA. 2. DOENÇA DE PARKINSON. 3.
ENVELHECIMENTO. 4. FUNÇÃO RESPIRATÓRIA. 5. MODELO ANIMAL. I.
Lopes Zeredo, Jorge Luís, orient. II. Título.

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS EM SAÚDE**

**ALTERAÇÕES RESPIRATÓRIAS AVALIADAS ATRAVÉS DE
CINERRADIOGRAFIA EM MODELOS ANIMAIS**

PRISCILA SALES DE CAMPOS

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Mecanismos Básicos e Tecnologias em Saúde

LINHA DE PESQUISA: Mecanismos Moleculares e Funcionais da Saúde Humana

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS EM SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR.

APROVADA POR:

**Jorge Luís Lopes Zeredo (UnB)
(ORIENTADOR)**

**Tatiana Ramos Lavich (UnB)
(EXAMINADOR EXTERNO)**

**Alexis Fonseca Welker (UnB)
(EXAMINADOR INTERNO)**

**José Airton Jorge Alves (UnB)
(EXAMINADOR INTERNO)**

DATA: 05/07/2019

BRASÍLIA/DF

*“Ao meu pai Edson (in memoriam),
que não está mais entre nós,
mas que sempre acreditou nos meus sonhos
e continua sendo minha maior força na vida.
Sua lembrança me inspira e me faz persistir”.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por minha vida, família e amigos; por todas as alegrias, pela saúde e pela força que me concedeu, para que conseguisse chegar até aqui.

Aos meus pais, Edson (in memorian) e Rita, pelo amor, incentivo e apoio incondicional. Por sempre estar ao meu lado, por tudo aquilo que me ensinaram, por terem sempre me guiado ao melhor caminho e por terem me transformado na pessoa que sou. Sei pai que do céu me acompanha e vibra com minhas conquistas, e me faz ter certeza que o reencontro é certo.

Ao meu esposo e eterno companheiro, Fábio, pessoa com quem amo partilhar a vida, que sempre dividiu comigo as alegrias e as tristezas. Obrigada pelo carinho, a paciência, apoio e por sua capacidade de me trazer força e me incentivar a ultrapassar todos os obstáculos que encontro. Te amo muito!

Às minhas irmãs, por terem sido minhas primeiras amigas e por serem exemplos na minha infância e para minha vida; Camila, por sempre apoiar as minhas escolhas, e Carla que do céu me ilumina, a gente teve tão pouco tempo juntas, mas saiba que você sempre estará em meu coração.

Aos meus sobrinhos por alegrarem a minha vida, me descontraindo em momentos de tensão, principalmente Gabrielly, que mais que uma sobrinha é uma irmã e amiga!

Ao meu orientador, professor Jorge Zeredo, pela orientação, apoio e confiança, e por me auxiliar no meu crescimento profissional, e por me acompanhar em uma viagem a um país tão distante.

À equipe do laboratório CLEA - Japan, que colaboraram para a realização desta pesquisa e assim puderam contribuir para o meu crescimento profissional.

Aos meus amigos de profissão, por terem me apoiado e auxiliado para que esta conquista acontecesse, principalmente à Priscilla Flávia de Melo, companheira de plantões e congressos e que tem sido um anjo em minha vida.

Aos animais utilizados no experimento.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada!

“A felicidade não está em viver, mas em saber viver.
Não vive mais quem mais vive, mas quem melhor vive.”

Mahatma Gandhi

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
RESUMO ESTUDO 1.....	XIV
ABSTRACT ESTUDO 1	XV
RESUMO ESTUDO 2.....	XVI
ABSTRACT ESTUDO 2	XVII
1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO	18
1.2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
1.2.1 Função Respiratória.....	18
1.2.2 Doença de Parkinson.....	25
1.2.2.1 Etiologia.....	27
1.2.2.2 Fisiopatologia	28
1.2.2.3 Sinais e Sintomas Motores.....	30
1.2.2.4 Sinais e Sintomas Não-Motores	34
1.2.2.5 Distúrbios Respiratórios na DP	35
1.2.3 Envelhecimento	40
1.2.3.1 Distúrbios Respiratórios no Envelhecimento	41
1.2.4 Modelo Animal	45
2 ESTUDO 1 - ARTIGO PUBLICADO.....	49
2.1 HIPÓTESE.....	50
2.2 OBJETIVO	50

2.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
2.4	MATERIAL E MÉTODOS	51
2.4.1	Animais	51
2.4.2	Preparação Animal	52
2.4.3	Testes Comportamentais	52
2.4.4	Cinerradiografia	53
2.4.5	Registro Cinerradiográficos	54
2.4.6	Movimentos Respiratórios	56
2.4.7	Análise Estatística.....	57
2.5	RESULTADOS.....	57
2.6	DISCUSSÃO.....	62
2.7	LIMITAÇÕES	65
2.8	CONCLUSÃO	66
3	ESTUDO 2 - MANUSCRITO.....	66
3.1	HIPÓTESE.....	67
3.2	OBJETIVO	67
3.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	68
3.4	MATERIAL E MÉTODOS	68
3.4.1	Animais	68
3.4.2	Registro Cinerradiográfico	69
3.4.3	Análise Estatística.....	71
3.5	RESULTADOS.....	72
3.6	DISCUSSÃO.....	75
3.7	CONCLUSÃO	79
4	REFERÊNCIAS	79

ANEXOS	91
ANEXO 1 - Artigo Publicado.....	91
ANEXO 2 - Normas de publicação do periódico.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios clínicos para diagnóstico na Doença de Parkinson	33
Tabela 2 - Sinais e Sintomas da Doença de Parkinson	33
Tabela 3 - Distúrbios não-motores na Doença de Parkinson	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Movimento da caixa torácica na inspiração	19
Figura 2 - Anatomia do Diafragma	21
Figura 3 - Caracterização da mobilidade toraco-abdominal	22
Figura 4 - Caracterização do seio costofrênico	24
Figura 5 - Realização do "Cylinder test"	53
Figura 6 - Aparelho de Cinerradiografia dos camundongos	56
Figura 7 - Imagem visualizada através do programa KINOVEA.....	56
Figura 8 - Distância entre os seios costofrênicos e a aresta traçada sobre a cúpula diafragmática e ângulo do seio costofrênico	57
Figura 9 - Resultados dos Testes Comportamentais	58
Figura 10 - Resultados da distância entre CPAs e da FR	60
Figura 11 - Resultados dos movimentos do CPAs direito e esquerdo	61
Figura 12 - Resultados do deslocamento diafragmático	62
Figura 13 - Coleta de amostras de saliva nos micos.....	69
Figura 14 - Esquema do aparelho de Cinerradiografia dos micos.....	70
Figura 15 - Local de colocação dos micos para filmagem.....	70
Figura 16 - Imagem visualizada através do programa KINOVEA.....	71
Figura 17 - Resultados dos movimentos do CPAs direito	72
Figura 18 - Resultados dos movimentos do CPAs esquerdo	73
Figura 19 - Resultados da distância entre CPAs.....	74
Figura 20 - Resultados do deslocamento diafragmático	74
Figura 21 - Resultados da FR	75

LISTA DE ABREVIATURAS

CL - corpos ou corpúsculos de Lewy

CPT - capacidade pulmonar total

CPA - costophrenic angle

CRF - capacidade residual funcional

CV - capacidade vital

CVF - capacidade vital forçada

DA - dopamina

DIFF - diferença entre a inspiração e expiração

DNA - ácido desoxirribonucleico - ADN

DP - Doença de Parkinson

EMG - eletromiografia

FR - frequência respiratória

GC - grupo controle

GE - grupo experimental

Hz - hertz

IIQ - intervalo interquartil

KF - núcleo pontino Kolliker-Fuse

MMEF - fluxo médio máximo expiratório

MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

NB - núcleos da base

Pemáx - pressão expiratória máxima

Pdi - pressão transdiafragmática

Pimáx - pressão inspiratória máxima

REM - Rapid Eye Movement

6 - OHDA - 6 – hidroxidopamina

SPF - Specific Patogen Free

SN - substância negra

SNA - sistema nervoso autônomo

SNC - sistema nervoso central

SNM - sinais não motores da doença de Parkinson

VEF₁ - volume expiratório forçado no 1º segundo

VEF₁/CVF - relação volume expiratório forçado no 1º segundo x capacidade vital forçada

VMV - ventilação máxima voluntária

VR - volume residual

ANEXOS

ANEXO 1 - Artigo publicado

ANEXO 2 - Normas de publicação do periódico

RESUMO ESTUDO 1 - ARTIGO PUBLICADO

Introdução: A doença de Parkinson (DP) é conhecida por causar tremor e rigidez, mas outros sintomas, como disfunções respiratórias e autonômicas, são uma das principais causas de incapacidade e mortalidade nesses pacientes. **Objetivo:** Neste estudo, nós examinamos os movimentos respiratórios usando cineradiografia em um modelo animal de DP tardia / avançada. **Métodos:** Sob anestesia cirúrgica, camundongos C57BL/6J receberam uma injeção de 6-OHDA ou solução salina no estriado direito. Duas semanas após a cirurgia, os animais tiveram seus movimentos respiratórios registrados por radiografia em vídeo sem qualquer restrição de movimento. Durante as gravações, os animais foram submetidos a um desafio leve de estresse agudo. Testes comportamentais foram realizados para avaliar a gravidade da lesão de 6-OHDA. **Resultados:** Como resultado, testes comportamentais confirmaram comprometimentos motores severos em camundongos 6-OHDA em comparação aos controles. Camundongos 6-OHDA mostraram um padrão respiratório predominantemente torácico com excursão diafragmática reduzida e frequência respiratória reduzida após o estresse. **Conclusão:** Esses resultados sugerem que a degeneração nigroestriatal avançada pode causar alterações respiratórias com as características dos distúrbios respiratórios do tipo obstrutivo.

Palavras-chave: Respiração, Diafragma, Radiografia, Modelos de Doenças, Comportamento, Animal.

ABSTRACT ESTUDO 1 - ARTIGO PUBLICADO

Introduction : Parkinson's disease (PD) is known to cause tremor and rigidity, but other symptoms such as respiratory and autonomic dysfunctions are a major cause of disability and mortality in patients. **Objective:** In this study, we examined respiratory movements by using cineradiography on a murine model of late/advanced PD. **Methods:** Under surgical anesthesia, C57BL/6J mice received an injection of either 6-OHDA or vehicle solution to the right striatum. Two weeks after surgery, the animals had their respiratory movements recorded by video X-ray without any restraint. During recordings the animals were submitted to a mild acute-stress challenge. Behavioral tests were performed to assess the severity of the 6-OHDA lesion. **Results:** As a result, behavioral tests confirmed severe motor impairments in 6-OHDA mice as compared to controls. 6-OHDA mice showed a predominantly thoracic respiratory pattern with reduced diaphragmatic excursion, and reduced respiratory frequency after stress. **Conclusion:** These results suggest that advanced nigrostriatal degeneration may cause respiratory alterations with the features of obstructive-type respiratory disorders.

Keywords: Respiration, Diaphragm, Radiography, Disease models, Behavior, Animal.

RESUMO ESTUDO 2 - MANUSCRITO

Introdução: A expectativa de vida aumentou acentuadamente durante o século passado e espera-se que continue a aumentar em praticamente todas as populações em todo o mundo. Estudos em humanos mostraram que o envelhecimento está associado a uma diminuição significativa da complacência da parede torácica, envolvendo a complacência da caixa torácica (tórax superior) e a complacência do compartimento diafragmático-abdominal (tórax inferior). Além disso, idosos apresentam diminuição da sensação de dispnéia e diminuição da resposta ventilatória à hipóxia e hipercapnia, tornando-os mais vulneráveis à insuficiência ventilatória durante estados de alta demanda, como situações de estresse e possíveis desfechos desfavoráveis. No entanto, estudos em humanos não conseguem distinguir as alterações causadas pela senescência natural daquelas causadas por fatores ambientais ou genéticos.

Objetivo: Nosso objetivo foi avaliar a fisiologia respiratória em idosos (> 12 anos) em comparação com os jovens (<3 anos), em micos-comuns nascidos e criados em um estabelecimento de criação comercial, ou seja, minimamente expostos a fatores ambientais. **Métodos:** Esta pesquisa foi realizada em 16 micos-comuns (*Callithrix jacchus*). Os dados foram coletados por registros cineradiográficos. Durante 3 dias consecutivos, os macacos foram filmados dentro do aparelho raio-x para avaliação de movimentos respiratórios durante a respiração tranquila. **Resultados:** Como resultado, os parâmetros da função respiratória mostraram redução da excursão diafragmática no grupo de idosos, em comparação com o grupo jovem. **Conclusão:** Podemos concluir que alterações na amplitude dos movimentos respiratórios podem estar associadas ao envelhecimento nesse modelo. Estes resultados podem confirmar a aplicabilidade de todos ou alguns destes testes como experimentos válidos para o estudo do processo de envelhecimento em macacos.

Palavras-chave: Senescência, mico- comum, função respiratória.

ABSTRACT ESTUDO 2 - MANUSCRITO

Introduction: Life expectancy has risen sharply during the past century and is expected to continue to rise in virtually all populations throughout the world. Studies in humans have shown that aging is associated with a significant decrease in chest wall compliance, involving rib cage (upper thorax) compliance and compliance of the diaphragm-abdomen compartment (lower thorax). In addition, older adults experience decreased sensation of dyspnea and diminished ventilatory response to hypoxia and hypercapnia, making them more vulnerable to ventilatory failure during high demand states like stress situations, with possibly poor outcomes. However, human studies cannot distinguish changes caused by natural senescence from those caused by environmental or genetic factors. **Objective:** Our objective was to evaluate the respiratory physiology in the elderly (>12 y.o.) as compared to the young (<3 y.o.), in common marmosets born and raised in a commercial breeding facility, i.e, minimally exposed to environmental factors. **Methods:** This research was conducted in 16 Common marmosets (*Callithrix jacchus*). Data were collected by cineradiographic recordings. During 3 consecutive days, the monkeys will be filmed inside the x-movie apparatus for assessment of respiratory movements during quiet respiration. **Results:** As a result, parameters of respiratory function showed reduced diaphragmatic excursion in the elderly group, as compared to the young group. **Conclusion:** We may conclude that changes in the amplitude of respiratory movements may be associated with aging. These results might confirm the applicability of all or some of these tests as valid experiments for the study of the aging process in monkeys.

Keywords: Senescence, Common marmosets, respiratory function.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

A presente tese apresenta os resultados das atividades desenvolvidas durante o período de doutorado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde da Faculdade de Ceilândia na Universidade de Brasília. Este projeto teve sua coleta de dados realizada em parceria com a Tokyo Medical and Dental University e Clea Inc.

1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

1.2.1 Função Respiratória

A principal função do sistema pulmonar é promover a troca gasosa entre o ambiente e o corpo, possibilitando que o oxigênio seja transportado do ar atmosférico para o tecido pulmonar e que o dióxido de carbono se mova no sentido contrário. Esta troca gasosa nos pulmões ocorre através de cerca de 300 milhões de pequenos alvéolos, sendo a área de superfície total disponível para a difusão num pulmão humano em torno de 60-80 m² (1,2).

Os pulmões flutuam dentro da caixa torácica, unidos a ela pelo líquido pleural encontrado entre os folhetos visceral e parietal da pleura e com função lubrificante para redução do atrito entre o parênquima pulmonar e a caixa torácica durante os movimentos pulmonares dentro da cavidade (2).

A parede torácica pode ser considerada dividida em duas partes operando em paralelo, ou seja, a caixa torácica e o abdome-diafragma.

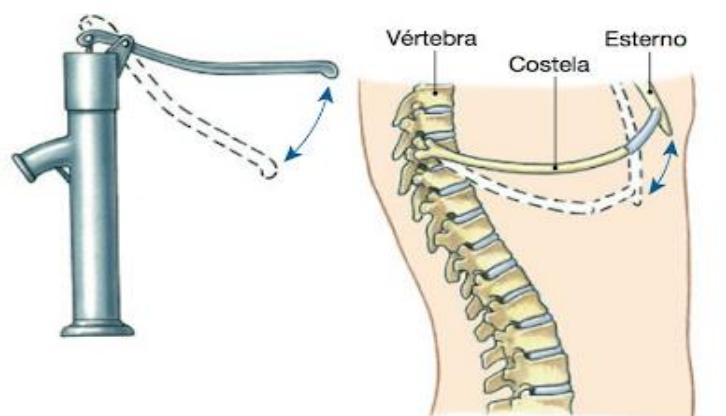
A ventilação pulmonar é a renovação constante do ar contido no interior dos pulmões e se dá através do fluxo aéreo do meio externo para o interior dos pulmões (inspiração) e vice-versa (expiração), decorrente das pressões criadas pela expansão e pela contração torácicas associadas à atuação dos músculos respiratórios (2).

Os pulmões têm a capacidade de se expandir na inspiração, permitindo a entrada de ar no seu interior e também a capacidade de voltar ao seu volume inicial durante a expiração. Isto se deve às forças elásticas do parênquima. No

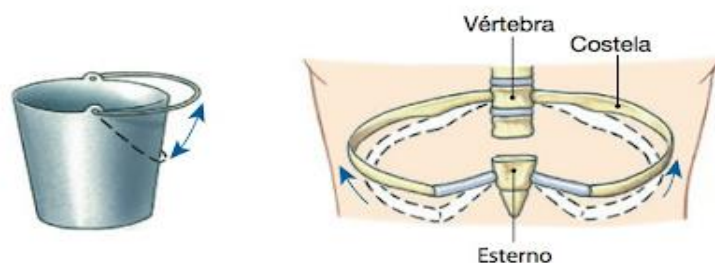
entanto o tórax se adapta a variação volumétrica dos órgãos, aumentando o seu diâmetro (3). Este aumento de volume é devido o trabalho em conjunto das articulações costovertebrais, esternocostais e dos músculos que atuam nas costelas, gerando o movimento de elevação das costelas, ou seja, o movimento de expansão da caixa torácica (4).

O tórax é constituído pelo esterno, costelas, cartilagens costais e vértebras torácicas. É limitado anteriormente pelo esterno, superiormente pela clavícula e inferiormente pelo diafragma. A cavidade torácica serve para fixar a coluna vertebral posteriormente e faz a fixação do esterno na parte anterior, além de proteger os órgãos internos (coração, pulmões) (5).

A caixa torácica se movimenta durante a ventilação, realizando dois movimentos: no movimento de alça de balde ocorre um aumento do diâmetro transverso do tórax devido à elevação das costelas durante a inspiração; e no movimento de braço de bomba ocorre um aumento do diâmetro ântero-posterior do tórax devido à elevação e à projeção anterior do esterno durante a inspiração (4,5) (Fig. 1).



(a) O movimento similar ao da alavanca de uma bomba manual de água aumenta a dimensão ântero-posterior da caixa torácica.



(b) Um movimento similar ao da alça de um balde aumenta a dimensão lateral da caixa torácica.

Figura 1. Movimento da caixa torácica durante a inspiração. A. Movimento de braço de bomba. B. Movimento de alça de balde.

O diafragma é o músculo ventilatório mais importante, responsável por grande parte do aumento do volume pulmonar durante uma inspiração tranqüila. Em forma de abóboda ou cúpula possui um centro tendinoso (centro frênico) e está localizado entre o tórax e o abdômen, serve como uma barreira mecânica entre a cavidade torácica e cavidade abdominal mantendo o gradiente de pressão entre essas duas cavidades (6). É innervado pelos dois nervos frênicos, que deixam a medula espinhal entre o terceiro e quinto segmento cervical (4). As fibras musculares do diafragma se inserem no esterno, nas seis costelas inferiores e na coluna vertebral por meio de dois pilares. As outras extremidades dessas fibras convergem para se fixar no tendão central fibroso (7).

Importantes estruturas passam por três aberturas: forame da veia cava inferior, o hiato esofágico e o hiato aórtico (Fig. 2). O hiato aórtico é o mais inferior e mais posterior das grandes aberturas e é encontrado no nível da margem inferior da décima segunda vértebra torácica; permite a passagem da aorta, do ducto torácico, de troncos linfáticos derivados da porção inferior da parede posterior do tórax e das veias ázigo e hemiázigo. O hiato esofágico está localizado ao nível da décima vértebra torácica. Ele permite a passagem do esôfago, de nervos gástricos, de ramos esofágicos dos vasos gástricos esquerdos e de alguns vasos linfáticos. O forame da veia cava se encontra no nível do disco entre a oitava e a nona vértebras torácicas, é atravessado pela veia cava inferior, a qual se adere à margem da abertura, e por alguns ramos do nervo frênico direito. Existem duas aberturas menores em cada pilar: uma permite a passagem do nervo esplânico maior, e a outra permite a passagem do nervo esplânico menor (3).

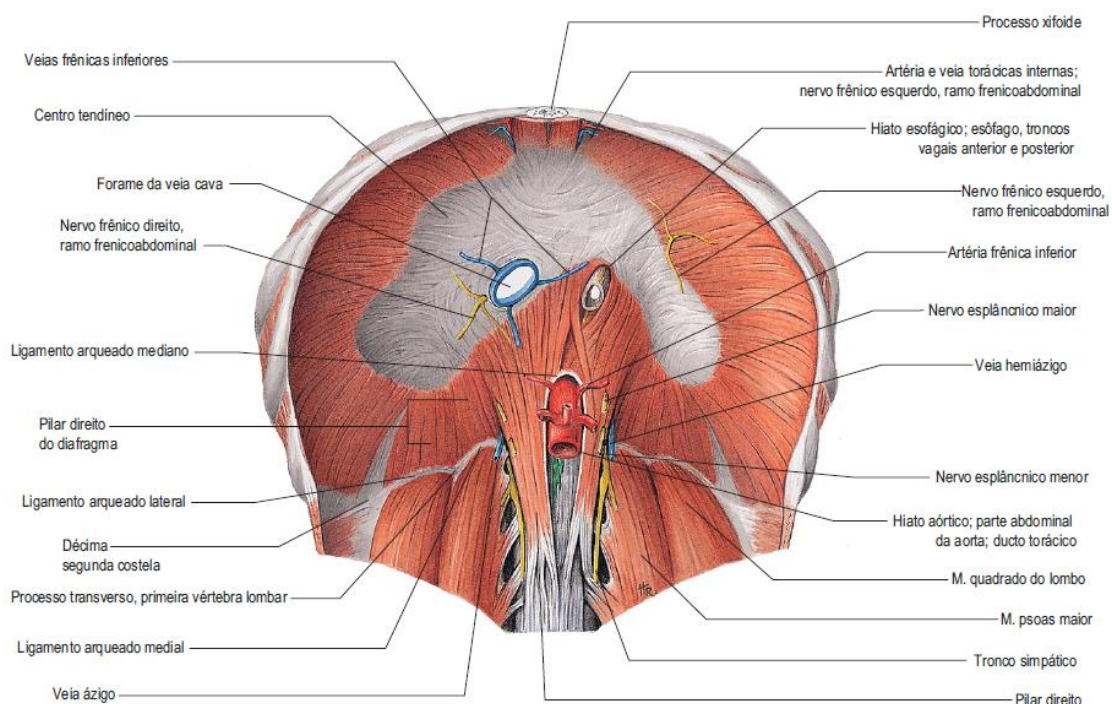


Figura 2. Anatomia do diafragma Fonte: adaptado da internet (www.anatomiaonline.com)

A contração do diafragma permite que o volume interno da caixa torácica aumente em decorrência do seu alongamento crânio-caudal durante a inspiração, quando suas duas partes se contraem empurrando as vísceras abdominais para baixo e para frente, causando aumento na pressão abdominal e deslocamento do conteúdo abdominal para baixo. A parte costal também expande a caixa torácica inferior, elevando as costelas para fora (1,8). Além disso, o diafragma ajuda na emese, micção e defecação pelo aumento da pressão intra-abdominal e ajuda a prevenir o refluxo gastroesofágico, exercendo pressão externa no hiato esofágico (9).

Sendo responsável por 2/3 do volume corrente na posição sentada e em pé e 3/4 na posição supina, o diafragma é responsável por 50-60% da ventilação, aumentando o eixo vertical e alargando as bases do tórax em sua fase ativa. Exerce ação sinérgica e antagônica com os músculos abdominais, conforme a fase da respiração (10). Na inspiração, as costelas mais inferiores são fixadas, ocorrendo a contração das fibras musculares e tração do tendão central para baixo e para frente, a contração do diafragma provoca a descida de sua abóboda de 1 a 2 cm no interior da cavidade abdominal, isso alonga o tórax e aumenta seu volume. Esses pequenos movimentos para baixo do

diafragma são possíveis porque as vísceras abdominais podem ser empurradas contra a parede abdominal relativamente complacente (Fig. 3) (7).

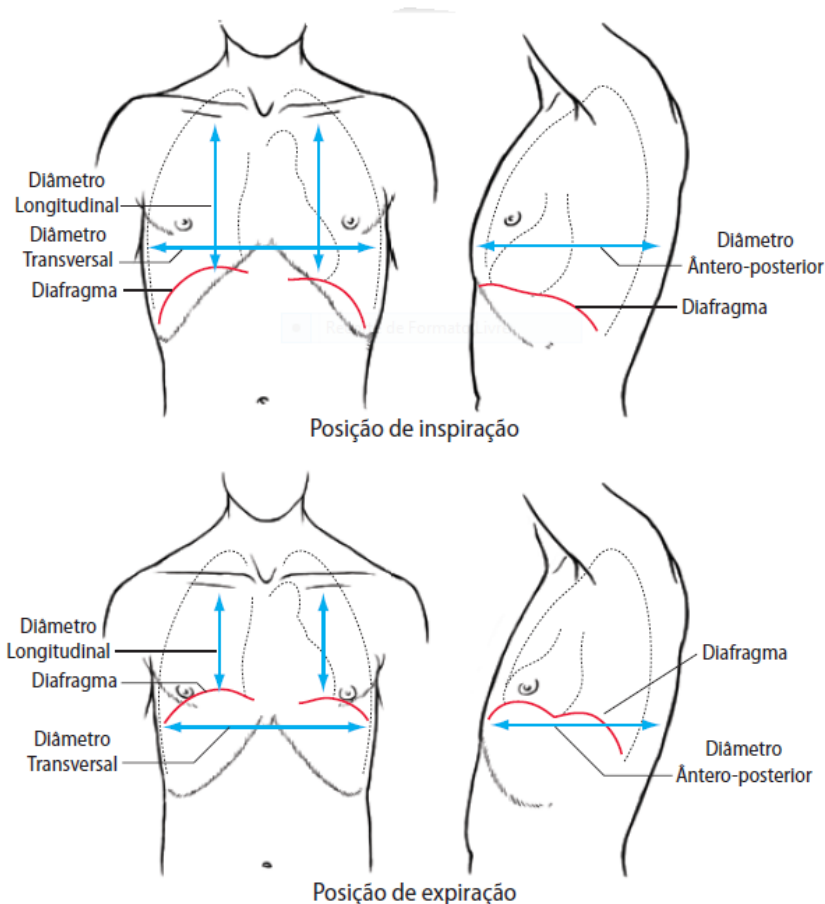


Figura 3. Caracterização da mobilidade do diafragma durante inspiração e expiração. Fonte: adaptado da internet.

Durante a inspiração, o movimento da parede abdominal depende da descida do diafragma que desloca o abdome e vísceras e faz com que a parede abdominal se aumente. Ao mesmo tempo, no entanto, a elevação das costelas aumenta a distância entre a sínfise púbica e a margem costal tendendo a produzir um movimento para dentro da parede abdominal. O resultado depende da magnitude relativa destas duas influências opostas. Como normalmente o movimento descendente do diafragma é maior que o movimento ascendente da caixa torácica, a parede abdominal se move para fora durante a inspiração, embora aproximadamente metade do movimento do diafragma é cancelado pelo movimento ascendente da caixa torácica. Todos os músculos inspiratórios, incluindo o diafragma normal, agem para elevar a caixa

torácica. No final de uma máxima inspiração há um endireitamento repentino da espinha torácica que também eleva a caixa torácica (11).

Durante uma inspiração profunda, o diafragma pode descer até 10 cm, atingindo o limite da complacência da parede abdominal, com aumento da pressão abdominal e nesse ponto, a contração do diafragma contra o tendão central eleva as costelas inferiores (7). Estas ações reduzem a pressão intrapleural, o que provoca a expansão pulmonar. Esta expansão reduz a pressão intrapulmonar abaixo da pressão atmosférica, permitindo o fluxo de ar para o interior dos pulmões. Durante o exercício e situações de estresse, onde se tem um aumento da frequência respiratória e conseqüentemente da demanda ventilatória, a inspiração é auxiliada por músculos acessórios da inspiração (intercostais externos, escalenos, peitorais menores e esternocleidomastoídeos) (1).

A expiração ao repouso é um processo passivo. Os pulmões e a parede torácica são elásticos e tendem a retornar à posição de equilíbrio após se expandirem na inspiração (1,2). Quando a respiração torna-se vigorosa; como no exercício, situações de estresse ou patologia respiratória, a expiração deixa de ser passiva, nesse caso a ação expiratória é ativa, potencializada pelos músculos expiratórios. Os músculos intercostais internos e o reto abdominal contraem-se, aumentando a pressão intra-abdominal e pleural. O diafragma é empurrado para cima e as costelas são puxadas para baixo e para dentro, auxiliando a redução do volume pulmonar durante a expiração (2,8). Em indivíduos normais, os músculos abdominais funcionam na respiração apenas quando a ventilação excede 40 litros. À medida que a ventilação minuto aumenta além desse ponto, os músculos abdominais são ativados durante partes cada vez maiores do ciclo expiratório (11).

Para uma função respiratória ótima, ambos os hemidiafragmas devem estar intactos. A lesão de um nervo frênico resulta em hemidiafragma elevado e uma mecânica respiratória prejudicada. A lesão nos nervos frênicos resulta em quase apnéia, resultando em recrutamento pesado dos músculos acessórios da respiração que podem compensar apenas a curto prazo (9). A disfunção diafragmática é uma causa sub-diagnosticada de dispnéia e deve sempre ser considerada no diagnóstico diferencial de dispnéia inexplicada. Podendo variar

de uma perda parcial da capacidade de gerar pressão (fraqueza) até uma perda completa da função diafragmática (paralisia) (12).

Quando a função do diafragma está comprometida, os músculos acessórios devem assumir este papel, porém são muito menos eficientes, resultando em falta de ar com esforço respiratório. Além da função respiratória, o diafragma também contribui para a estabilização mecânica da coluna vertebral, funcionando como a estrutura superior de estabilização. Sua contração também aumenta a pressão intra-abdominal, trabalhando em sinergia com o assoalho pélvico e os músculos abdominais para aumentar a estabilização da coluna vertebral (13).

Os músculos inspiratórios são essenciais para atividades ventilatórias e não ventilatórias. Além de serem ativos durante a respiração, os músculos inspiratórios são recrutados quase ao máximo durante outros comportamentos, como por exemplo, espirrar ou tossir. Portanto, a perda da função muscular inspiratória pode comprometer as trocas gasosas e a saúde do sistema pulmonar como um todo (14).

A superfície entre os pulmões e o diafragma deve ser angular e forma os seios costofrênicos (laterais, anteriores e posteriores). Lateralmente, a inserção diafragmática forma um ângulo agudo com a parede torácica, conhecido como "ângulo costofrênico", é o ângulo agudo onde a pleura costal se une à pleura diafragmática, ou seja, formado pelo encontro das cúpulas diafragmáticas com a parede torácica (15) (Fig. 4). Essa área não contém tecido pulmonar e é evidente nos exames radiológicos normais (16).

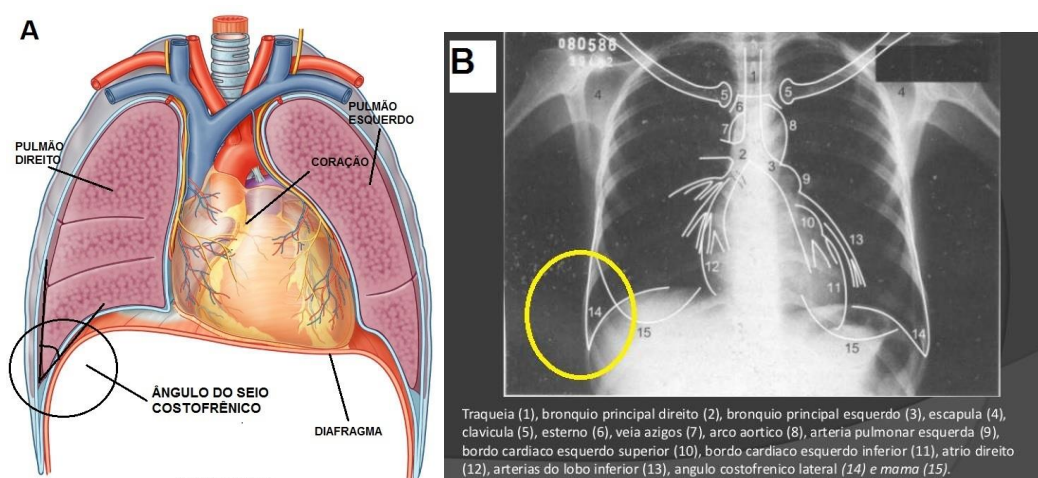


Figura 4. Caracterização do seio costofrênico: A) Desenho esquemático do tórax, com suas estruturas anatômicas, visualização do seio costofrênico. B) Imagem radiológica com a caracterização do seio costofrênico (número 14): encontro das cúpulas diafragmáticas com a parede torácica. Fonte: adaptado de Drake et al., 2010 (17); Carmen Lúcia Fujita.

O encurtamento do diafragma e dos músculos intercostais ocasiona diminuição do volume de ar e das taxas de fluxo de ar inspirado, redução da força, fadiga e incoordenação dos músculos diafragmático e acessórios (18). Essa restrição mecânica à mobilidade diafragmática também promove um desequilíbrio na relação ventilação/perfusão, repercutindo em hipoventilação de áreas pulmonares ventilatório-dependentes (19). A força muscular respiratória está relacionada aos volumes pulmonares, especialmente o diafragma, cuja força de contração é extremamente sensível às mudanças de volume pulmonar e à sua posição, o encurtamento desses músculos, diafragma e intercostais, ocasionam menor habilidade em gerar mudanças de volume (20). Portanto, não somente a fraqueza muscular diafragmática, mas também a falência no recrutamento muscular aumentam a morbidez, uma vez que propiciam a ocorrência de atelectasias e subseqüentes infecções respiratórias, principalmente em regiões mais basais dos pulmões (21).

Ao longo da vida, várias circunstâncias e condições podem afetar a capacidade do músculo diafragma para gerar força e, por sua vez, este músculo pode sofrer fraqueza e disfunção significativas. Estresse hipóxico, doença crítica, caquexia do câncer, distúrbio pulmonar obstrutivo crônico (DPOC) e sarcopenia relacionada à idade são exemplos de condições nas quais existe disfunção significativa do músculo diafragma. Semelhante a outros músculos estriados, o diafragma mantém uma notável capacidade de plasticidade tanto na saúde quanto na doença. Por outro lado, a remodelação muscular respiratória em resposta a estressores fisiopatológicos pode ter efeitos deletérios e consequências para a mecânica respiratória, aumentando o risco de morbidade respiratória (22).

Como todo o organismo, o sistema respiratório é, portanto, afetado pelas consequências do envelhecimento fisiológico e de doenças neurodegenerativas, podendo também sofrer perturbações patológicas.

1.2.2 Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson (DP) é uma afecção crônica, degenerativa e progressiva do sistema nervoso central, que decorre da morte dos neurônios produtores de dopamina da substância negra, conseqüentemente acarretando

diminuição das células produtoras de dopamina na via nigroestriatal e dos neurônios contendo neuromelanina no tronco cerebral, especialmente na camada ventral da parte compacta da substância negra e do lócus cerúleos (23).

É o segundo distúrbio neurodegenerativo mais comum após a doença de Alzheimer e espera-se um crescimento social e de custos econômicos sobre as sociedades à medida que as populações envelhecem (24). Enquanto o Parkinson não é considerado uma doença fatal, os pacientes geralmente têm uma expectativa de vida mais curta do que pessoas sem a doença e podem morrer de complicações da doença (por exemplo, pneumonia ou quedas fatais) (25).

A DP é caracterizada por distúrbios motores, disfunções posturais e cognitivas. Quando os sinais e sintomas são detectados, provavelmente já ocorreu a perda de aproximadamente 60% dos neurônios dopaminérgicos, e o conteúdo de dopamina no estriado é cerca de 80% inferior ao normal (23).

O parkinsonismo é definido como uma vasta categoria de doenças que apresentam diminuição da neurotransmissão dopaminérgica nos núcleos da base, estando estas classificadas em: parkinsonismo primário, secundário, plus e heredodegenerativas. Sendo a Doença de Parkinson a correspondente ao parkinsonismo primário (23).

A DP é uma afecção progressiva do sistema nervoso, caracterizada pelos sinais cardinais de rigidez, acinesia, bradicinesia, tremor e instabilidade postural. Apresenta uma etiologia idiopática e afirma-se ainda que o processo de envelhecimento está intimamente interligado a esta afecção (26).

Embora a doença possa se desenvolver em qualquer idade, seu início é mais comum em adultos mais velhos, com um pico de incidência em cerca dos 60-65 anos, porém há dados que sugerem um aumento mesmo após os 80 anos. A probabilidade de desenvolver a doença aumenta com a idade, com um risco de vida de cerca de 2%. Uma história familiar positiva duplica o risco de desenvolver DP em cerca de 4% (27). Os homens têm maior prevalência e incidência do que as mulheres. Pacientes com DP podem viver 20 ou mais anos, dependendo da idade de início. A taxa de mortalidade é cerca de 1,6 vezes maior do que em indivíduos normais da mesma idade. A morte é geralmente devida a alguma doença não relacionada concomitante ou devido

aos efeitos da diminuição da mobilidade, aspiração ou aumento das quedas com danos físicos subseqüentes (25).

1.2.2.1 Etiologia

A etiologia é tida como idiopática, mas estudos acreditam que a DP pode ser decorrente de um conjunto de fatores, sejam eles genéticos, toxinas ambientais, estresse oxidativo e anormalidades mitocondriais; que podem interagir e contribuir para o desenvolvimento neurodegenerativo da doença e/ou alterações do envelhecimento devido à aceleração da perda de neurônios dopaminérgicos com o passar dos anos (23).

A patogênese permanece incompletamente conhecida, mas a contribuição da genética molecular tem sido determinante ao abrir novas vias de exploração de proteínas, vias metabólicas e outros processos celulares envolvidos. No entanto, as formas hereditárias de DP representam uma minoria de casos da doença. A doença resulta provavelmente de complexas interações entre fatores genéticos e ambientais e os processos patológicos implicados envolvem disfunção mitocondrial, stress oxidativo, inflamação e excitotoxicidade como citado anteriormente (24).

Os fatores ambientais estão interligados aos pacientes de DP que vivem em zona rural e que estão mais expostos a pesticidas e herbicidas. As questões químicas ocorrem como resultado a exposições a produtos químicos industriais. O estresse oxidativo ocorre por um desequilíbrio entre os fatores que promovem a formação de radicais livres e os mecanismos de defesa antioxidativos. As questões genéticas estão ligadas a existência de genes (denominados de “PARK” e numerados sequencialmente) que favorecem o desenvolvimento da enfermidade, porém agindo de forma indireta. E as disfunções mitocondriais podem ser decorrentes de fatores tóxicos, bem como genéticos, que tendem a ocasionar uma cascata de eventos originando morte celular programada (23).

Atualmente considera-se como fatores etiopatogênicos mais importantes a chamada causa multifatorial, ou seja, a combinação de predisposição genética com a presença de fatores tóxicos ambientais. Com relação à contribuição do envelhecimento cerebral, este estaria relacionado com a prevalência da idade, associada à perda neuronal progressiva (23).

1.2.2.2 Fisiopatologia

A doença de Parkinson fisiopatologicamente é caracterizada pela presença de disfunções monoaminérgicas múltiplas, incluindo déficits dos sistemas dopaminérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos e noradrenérgicos (24).

A doença se inicia nos núcleos motores dorsais dos nervos glossofaríngeo e vago, e no núcleo olfativo anterior. A degeneração segue um trajeto ascendente a partir do tronco encefálico. A primeira estrutura a ser afetada seria o núcleo do décimo nervo craniano, que dá origem ao nervo vago. Em seguida seriam afetados o *locus coeruleus*, os núcleos da Rafe e o pedúnculo pontino. Por fim, o avanço da doença chegaria a atingir a substância negra, e portanto os núcleos da base, e outras estruturas próximas (28).

Os núcleos da base (NB) são uma coleção de massas nucleares de substância cinzenta interligadas, localizadas profundamente na base do cérebro. Considera-se atualmente que sejam compostos do caudado e do putâmen (coletivamente denominados *striatum* ou corpo estriado) mais o globo pálido, núcleo subtalâmico e a substância negra (29). Os NB têm um papel importante na produção dos movimentos voluntários e controle dos ajustes posturais associados aos mesmos. Sua ação ocorre através de duas vias principais, que se diferenciam quanto à expressão de neuroreceptores, além da dopamina presente em ambas. Uma via direta, excitatória, que facilita o movimento; e outra indireta, inibitória, que promove sua inibição (30, 29).

O sistema dopaminérgico sofre despigmentação, associado à depleção do neurotransmissor dopamina resultando na degeneração de neurônios dopaminérgicos da substância negra que se projetam para o estriado. Estes neurônios são importantes para o controle do processamento da informação pelos núcleos da base, acabam reduzindo dessa forma a atividade das áreas motoras do córtex cerebral, levando à diminuição dos movimentos voluntários (31).

Ocorre então, a deposição de uma proteína anômala, a alfa-sinucleína, que forma os corpos de Lewy (CL), a marca patológica da DP. Os CL são corpos de inclusão citoplasmática dos eosinófilos, existentes na substância negra do mesencéfalo, que se aglomeram em grandes quantidades. Acontece ainda a perda das células do núcleo pedúnculo-pontino, associado a inibição

aumentada do próprio núcleo pedúnculo-pontino, desinibindo as vias retículo-espinhal e vestibulo-espinhal, causando uma contração excessiva dos músculos posturais. De uma maneira geral define-se a existência de uma perda neuronal progressiva no grupo de células ventro-laterais da parte compacta da substância negra do mesencéfalo (23).

A deposição dos CL segue uma ordem na progressão da doença, iniciando-se provavelmente anos antes do aparecimento dos sintomas motores no bulbo olfativo e tronco cerebral, e estendendo-se progressivamente até outras regiões cerebrais, o que está de acordo com a clínica e a história natural da doença (24).

O mecanismo responsável pelo aparecimento da síndrome rígido-acinética, se dá pela disfunção do sistema nigroestriatal, com diminuição da concentração de dopamina ao nível dos receptores dopaminérgicos situados nos núcleos da base, no corpo estriado (23,32). Existem alterações compensatórias, como a supersensibilidade dos receptores de dopamina, onde os sintomas da DP são encontrados pela primeira vez apenas quando há uma redução de cerca de 80% concentração de dopamina no putâmen (ou uma perda de 60% de neurônios dopaminérgicos) (27). Com uma maior perda na concentração de dopamina, a bradicinesia progride e se torna mais grave. A consequência da perda nigroestriatal é uma fisiologia alterada do estriado. O corpo estriado contém receptores de dopamina D1 e D2. A dopamina é excitatória no receptor D1 e inibitória no receptor D2. Deficiência de dopamina nestes receptores resulta em alteração nos núcleos subjacentes: excesso de atividade do núcleo subtalâmico e globo pálido interno, e aumento da inibição no tálamo e no córtex cerebral (25). A síndrome rígido-acinética se apresenta de forma desigual em sua distribuição, afetando primeiramente os músculos proximais, especialmente ombros e pescoço, progredindo para os músculos da face, membros superiores e inferiores. Pode afetar inicialmente um lado do corpo, se alastrando até envolver todo o corpo, sendo que à medida que a doença progride se torna mais grave e diminui a habilidade dos pacientes se moverem com facilidade. Estas alterações fisiológicas dos padrões são restaurados para normalidade com o tratamento com levodopa (23).

1.2.2.3 Sintomas Motores

A DP é a causa mais frequente de “parkinsonismo”. O parkinsonismo pode ter inúmeras causas além da DP, mas o parkinsonismo da DP (dito “típico”) tende a ter características próprias: os sintomas apresentam-se, e progridem pelo menos durante alguns anos predominantemente de um lado do corpo, havendo envolvimento da marcha e instabilidade postural em fases mais avançadas. A DP possui evolução progressiva, tendendo a acentuar os déficits motores; conseqüentemente, a doença pode ser classificada em estágios, pela sua complexidade utilizando-se a descrição dos Estágios de Função Motora (24).

Para melhor compreensão sobre as áreas cerebrais acometidas na DP, dividiu-se a doença em seis estágios.

No estágio 1 ocorre o comprometimento do núcleo motor dorsal dos nervos glossofaríngeo e vago, além da zona reticular intermediária e do núcleo olfatório anterior, constituindo assim um processo neurodegenerativo quase que totalmente localizado nas fibras dopaminérgicas que inervam o putâmen dorso-lateral. Este estágio acaba se manifestando como distúrbio olfatório (23).

No estágio 2, existe o comprometimento adicional dos núcleos da rafe, núcleo reticular gigantocelular e do complexo do lócus cerúleos. Ocorre a progressão para tronco encefálico baixo, com produção de sintomas não motores, como alterações do olfato, homeostase, ciclo sono-vigília e sistema nervoso autônomo (23,33).

No estágio 3, observa-se o acometimento da parte compacta da substância negra do mesencéfalo. Com o comprometimento da substância negra e de outros núcleos profundos, ocorre a téttrade clássica da doença, marcando o diagnóstico clínico da síndrome (23,33).

Já nos estágios 4 e 5 há comprometimentos das regiões prosencefálicas, do mesocórtex temporal e de áreas de associação do neocórtex e neocórtex pré-frontal, respectivamente (23).

No estágio 6, ocorre o comprometimento de áreas de associação do neocórtex, áreas pré-motoras e área motora primária. Presença dos CL nas estruturas límbicas e neocórtex, presença de sintomatologia neuropsiquiátrica, como depressão, declínio cognitivo e alucinações visuais (23,33).

Esses referidos comprometimentos manifestam-se inicialmente de forma motora, onde são chamados de sinais cardinais da doença de parkinson. Sendo eles: rigidez, tremor, bradicinesia e instabilidade postural. O tremor de repouso é frequentemente o primeiro sintoma reconhecido pelo paciente. Mas a doença às vezes se inicia com sintomas de bradicinesia; e em alguns pacientes, o tremor pode nunca se desenvolver (25).

1) Bradicinesia: diminuição progressiva da velocidade e/ou da amplitude do movimento. A bradicinesia pode culminar numa interrupção completa do movimento (bloqueios motores, ou freezing). Acredita-se que esta alteração seja o resultado da ausência de dopamina no estriado, levando a um desequilíbrio entre os sistemas inibitórios e excitatórios, sendo que devido aos padrões de movimentos tenderem a uma alternância de excitação/inibição, o movimento tranca em uma direção com dificuldade de progressão o que leva a uma lentidão dos movimentos, especialmente os automáticos, havendo uma pobreza geral da movimentação e queixa frequente de fraqueza (23). Outras manifestações de bradicinesia são a hipomimia (face inexpressiva ou imóvel), a hipofonese (voz com menor volume) e a micrografia (caligrafia mais pequena, por vezes imperceptível). A bradicinesia é o sintoma mais incapacitante da DP, com a lentidão e o tempo prolongado de movimento, levando a um aumento da dependência nas tarefas cotidianas (24,34).

2) Rigidez: sensação de resistência na movimentação passiva de um membro ao longo de todo o movimento, na flexão e na extensão. Caracterizada por uma resistência aumentada ao movimento passivo por toda a amplitude de movimento, é global e plástica, caracterizada pela permanência dos membros nas atitudes posturais que lhe são impostas. Não é alterada pela velocidade da movimentação e aumenta com a movimentação ativa simultânea de outro membro. A rigidez “em roda dentada” sente-se na movimentação passiva do membro afetado e resulta da conjugação de tremor e rigidez. Da mesma forma que a rigidez se apresenta nos músculos, apresenta-se nos órgãos internos, como fígado, estômago e intestino, tornando-os mais lentos (35,24).

3) Tremor de repouso: é tido como o sintoma inicial da DP. Em cerca de 50% tem início nas extremidades distais, em decorrência de oscilações involuntárias de uma parte do corpo. Ocorre a uma frequência de 4-5 Hz e está presente nas extremidades, quase sempre distalmente. É observado em

condições de repouso que diminui ou desaparece com o início de alguma ação, podendo aparecer novamente quando o paciente mantiver uma ação ou postura mais prolongada. O mais típico da DP é o “tremor a contar moedas”, caracterizado por movimentos simultâneos de adução-abdução do polegar e flexão-extensão dos restantes dos dedos. (34,36).

4) Alterações posturais e da marcha: a postura é fletida, por vezes de forma muito acentuada (camptocórmia), mas retifica em decúbito, o que a distingue das deformidades ósteo-articulares da coluna vertebral. A habilidade para manter uma postura estável pode não estar comprometida em condições de equilíbrio sem perturbação e com atenção plena, e à medida que a base de apoio se estreita ou as demandas de atenção variam, a instabilidade postural aumenta. Isso se deve a perda de reflexos posturais (24). Na posição ortostática, há uma ligeira flexão em todas as articulações, levando a uma “postura simiesca”, com joelhos e quadris um pouco flexionados, ombros arqueados e a cabeça para frente. Na posição sentada, o paciente tende a afundar na cadeira, deslizando para os lados e com a cabeça pendendo para frente (37). A marcha é lenta, os passos são pequenos, há redução do balanceio dos membros superiores e pode surgir festinação (apresenta-se por passos curtos, rápidos e arrastados, sem a participação dos movimentos dos braços); durante a marcha os pés podem ficar “colados” ao chão (bloqueios da marcha). Entende-se que essa marcha é em decorrência da postura adotada por estes portadores, pois a cabeça anterioriza-se, ocorre um aumento da cifose torácica com uma flexão de joelhos, onde o corpo adota uma postura que favorece a anteriorização do centro de gravidade (23).

5) Congelamento – Incapacidade transitória de executar movimentos ativos (bloqueio motor) ocorre subitamente durante alguns segundos. Atinge mais frequentemente as pernas ao andar, podendo envolver a abertura das pálpebras, a fala (palilalia) e a escrita (34,33)

Tabela 1. Critérios Clínicos para diagnóstico de Doença de Parkinson**1. Doença de Parkinson clinicamente provável:**

Combinção de pelo menos dois sintomas / sinais cardinais (incluindo distúrbios dos reflexos posturais)

2. Doença de Parkinson clinicamente definida:

Qualquer combinação de três dos quatro sintomas/sinais cardinais

Sintomas/Sinais Cardinais

Tremor de Repouso

Rigidez

Brdicinesia

Diminuição dos reflexos posturais

Fonte: Moreira et al., 2007 (33)**Tabela 2: Sintomas e Sinais que auxiliam no diagnóstico de Doença de Parkinson**

Postura axial alterada, dificuldade em virar-se na cama

Postura em flexão

Micrografia

Distonia do pé e hálux

Amimia (face em máscara, fixado)

Fala disártrica, hesitante ou com perda da tensão articulatória

Redução do piscamento e blefarosspasmos

Disfagia

Distúrbio do sono

Distúrbios sexuais

Dermatite seborréica

Fonte: Moreira et al., 2007 (33)

Estes sinais e sintomas resultam da deficiência de dopamina do estriado e geralmente são corrigíveis com uso de levodopa e agonistas da dopamina. À medida que a DP progride ao longo do tempo, os sintomas que não respondem ao desenvolvimento de levodopa, como a postura flexionada, o fenômeno de congelamento, e perda de reflexos posturais; são muitas vezes referidos como características não dopaminérgicas relacionadas à DP. Além disso, a bradicinesia que respondeu à levodopa no estágio inicial da doença aumenta à medida que esta se agrava e não responde mais à medicação. São particularmente esses sintomas motores intratáveis que levam às deficiências como aumento da imobilidade e dificuldades de equilíbrio (25).

1.2.2.4 Sintomas Não Motores

Cada vez mais se reconhece a importância dos “sintomas não motores” (SNM) da DP, que têm grande impacto na qualidade de vida dos doentes. A DP caracteriza-se não só pela deficiência exclusiva do sistema dopaminérgico, mas sim, por um comprometimento de vários outros sistemas monoaminérgicos, como os neurotransmissores serotoninérgicos e o noradrenérgicos, representando, assim, uma síndrome clínica, patológica e bioquímica que pode ser desencadeada por diversos fatores genéticos e ambientais. Isto explica o surgimento de outros sintomas não motores (23).

Estes sintomas podem surgir anos antes dos sintomas motores (a chamada “fase pré-motora” da DP). Alguns dos SNM mais importantes na DP são: hipósmia, disautonomia (hipotensão ortostática, sialorreia, alterações urinárias, obstipação, hipersudorese e disfunção erétil), alterações do sono (insônia, perturbação do comportamento do sono REM ou RBD, movimentos periódicos dos membros no sono, síndrome de pernas inquietas, sonolência diurna excessiva) (38), depressão, apatia, ansiedade, fadiga, dor, disfunção sexual, alterações psicóticas (alucinações visuais) e perturbações do controlo dos impulsos (compras compulsivas, jogo patológico, hiperfagia compulsiva, generosidade incontrolada, hipersexualidade e comportamentos motores repetitivos sem propósito) surgindo estes últimos geralmente como efeitos adversos da medicação dopaminérgica (24).

Os sintomas sensoriais incluem dor, dormência, formigamento e queimação nos membros afetados; estes ocorrem em cerca de 40% dos pacientes. Alterações comportamentais e mentais são comuns e incluem mudanças humor, diminuição da motivação e da apatia, lentidão no pensamento (bradifrenia) e deterioração cognitiva (deterioração ligeira até à demência, sobretudo nas fases avançadas da doença (39). A demência é mais comum naqueles com idade mais avançada no início da DP e pode ocorrer em cerca de 40% desses pacientes; isso se torna mais incapacitante do que as características motoras do DP (25).

Tabela 3: Distúrbios não-motores na Doença de Parkinson

ANORMALIDADES NEUROCOMPORAMENTAIS
Alterações na personalidade (apatia, falta de confiança, medo excessivo, ansiedade, labilidade e inflexibilidade emocionais, abstinência social, dependência)
Demência (anomia parcial, desorientação espacial, paranoia, psicose, alucinações)
Bradifrenia (lento processo de pensamento, perda de concentração, dificuldade na formação de conceitos)
Depressão
Distúrbios do sono
Disfunção sexual
Efeitos colaterais psiquiátricos do tratamento
OUTRAS MANIFESTAÇÕES
Disfunção autonômica (hipotensão ortostática, desregulação respiratória, vermelhidão, "suores encharcantes", constipação, disfunções esfinteriana e sexual).
Sintomas sensoriais (parestesias, dores, acatisia; disfunção visual, olfativa e vestibular)
Seborréia, edema podal, fadiga, perda de peso

Fonte: Moreira et al., 2007 (33)

1.2.2.5 Distúrbios Respiratórios na Doença Parkinson

Os distúrbios respiratórios na DP têm sido evidenciados desde as descrições iniciais da doença em 1817 e as complicações respiratórias, principalmente a pneumonia aspirativa e a embolia pulmonar, são as causas mais comuns de óbito nesses pacientes (40,41).

Apesar de a maioria dos pacientes não relatarem sintomas respiratórios até os estágios mais avançados da doença, a disfunção respiratória progressiva pode ser um fator que contribui para a diminuição nas atividades da vida diária (42)

A etiologia das disfunções respiratórias permanece desconhecida, sendo considerada multifatorial, ocorrem na maioria dos pacientes com DP, possivelmente em virtude da fisiopatologia complexa, dos poucos estudos investigativos, e, ainda, pelo fato de que as suas repercussões podem ser assintomáticas. (43). O grau de comprometimento é compatível com o estágio da doença, evidenciando que as condições funcionais respiratórias decrescem proporcionalmente à evolução da DP (44).

Testes de função pulmonar, medições da função muscular respiratória e eletromiografia diafragmática revelaram que pacientes com DP sofrem tanto padrão obstrutivo, restritivo ou misto de disfunção ventilatória, disfunção das vias aéreas superiores e diminuição da força dos músculos respiratórios, mesmo em estágios iniciais da doença, possivelmente devido à dessincronização central ou periférica dos músculos respiratórios, ou pelo envolvimento de medicação com levodopa (45).

Os distúrbios respiratórios na DP podem ser explicados por diversos mecanismos tais como perda da flexibilidade da musculatura respiratória, alterações posturais, alterações na ativação e coordenação muscular e envolvimento das vias aéreas superiores a nível de estruturas glóticas e supraglóticas (46,47). Vincken et al. (48) investigou a possibilidade do envolvimento extrapiramidal da parte superior músculos estriados das vias aéreas presentes no parkinsonismo, investigando seu papel na manutenção da patência da via aérea superior, levando à limitação do fluxo aéreo. Usando a visualização de fibra óptica da via aérea superior, esses autores relataram irregularidade involuntárias dos movimentos da glote e estruturas supraglóticas.

A maioria dos estudos relata taquipnéia, dispnéia e irregularidades do ritmo respiratório, assim como diminuição das pressões respiratórias máximas (PImáx e PEmáx) (45,49).

Vários estudos observaram características de padrão respiratório restritivo em pacientes que sofrem de DP com função pulmonar diminuída e redução da resistência e força dos músculos respiratórios (50,51,52), bem como uma diminuição da complacência pulmonar (42,53). Valores baixos de capacidade vital forçada (CVF) e volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1) também caracterizam o padrão restritivo encontrado nesses pacientes, provavelmente resultado de um esforço expiratório incoordenado ou uma complacência anormalmente baixa da caixa torácica, secundária à rigidez da parede torácica (54). Outros estudos sugerem que as essas alterações restritivas são as mais frequentes, avaliada através da curva de fluxo-volume, e atribuem tal anormalidade à incoordenação e rigidez da musculatura respiratória o que pode ter limitado os movimentos respiratórios (55,56,57). Ocorre então nesses pacientes um aumento da rigidez da caixa torácica, redução da pressão de recolhimento elástico, diminuição do volume de ar e das

taxas de fluxo de ar inspirado, além da fadiga e incoordenação dos músculos respiratórios, sendo isso um grande indicador de doença neuromuscular (58).

Outros estudos, porém, relatam um tipo obstrutivo de disfunção respiratória caracterizada por uma redução da relação volume expiratório forçado no 1º segundo x capacidade vital forçada ($VEF1/CVF < 75\%$ do valor normal), limitação ao fluxo de ar ($MMEF < 65\%$ do valor normal), aprisionamento aéreo com presença de volume residual VR maior que o normal ($> 120\%$). Os baixos valores encontrados podem ser atribuídos à rigidez do músculo respiratório e hipocinesia, podem estar correlacionados com a severidade da doença parkinsoniana, deficiência, grau de rigidez e a presença de tremor, e indicam que as anormalidades da função pulmonar são causadas por aumento da atividade parassimpática (59,60,61). Alguns estudos sugerem que essas alterações respiratórias são um evento precoce na DP (62). Além disso, os pacientes com DP apresentam diminuição das forças musculares inspiratórias e expiratórias, e da *endurance* da musculatura respiratória (59). A maioria dos indivíduos com DP apresentam obstrução em vias aéreas superiores, com aumento do volume residual, isso se correlaciona à ação sinérgica da rigidez e bradicinesia podendo ser estas as variáveis indutoras da obstrução das vias aéreas superiores. Estes achados suportam a hipótese de que os parkinsonianos manifestam maior risco de distúrbios respiratórios do tipo obstrutivo, podendo sugerir que as alterações de fluxo aéreo em parkinsonianos sejam predominantemente obstrutivas devido à limitação de fluxo aéreo secundária à diminuição da força dos músculos respiratórios e principalmente das vias aéreas superiores, que comumente apresentam incoordenação neuromuscular (63, 42).

Existem evidências de que uma anormalidade no controle e função das vias aéreas superiores pode ser responsável pela limitação ao fluxo de ar presente nas doenças extrapiramidais. Constata-se que essa obstrução grave das vias aéreas superiores, sendo a maior anormalidade pulmonar. Os músculos intrínsecos da laringe, e provavelmente toda a musculatura das vias aéreas superiores, estão afetados pelos movimentos involuntários característicos da DP. A disfunção das vias aéreas superiores é um fator importante na retenção de secreções, atelectasias, aspiração e infecções respiratórias nos pacientes com DP (64).

A postura em flexão e a rigidez da musculatura intercostal comprometem a mobilidade da caixa torácica, com conseqüente diminuição da expansibilidade pulmonar na inspiração e da depressão torácica na expiração, levando a uma limitação progressiva da ventilação (37). A complacência torácica diminui pela limitação na extensão de tronco e da amplitude articular do tórax e da coluna vertebral, secundária a artrose e outras alterações torácicas como a cifoescoliose ou fibrose pleural, com conseqüente redução dos volumes pulmonares. Portanto, a amplitude torácica diminuída em decorrência da postura em flexão do tronco e a degeneração ósteo-articular, alteram o eixo da coluna vertebral, o que repercute na inspiração e na expiração reduzindo a capacidade vital. Podendo apresentar valores significativamente menores de perimetria torácica caracterizando acentuada diminuição da sua mobilidade torácica durante a respiração o que repercute no aumento do trabalho muscular, com conseqüente diminuição da expansibilidade pulmonar na inspiração e da depressão torácica na expiração (56).

Portanto, a amplitude torácica diminuída altera o eixo da coluna vertebral (63). O tórax rígido e resistente aos movimentos rápidos acarretam limitação progressiva da ventilação, a fixação postural em flexão e a rigidez da musculatura intercostal comprometem a mobilidade da caixa torácica (65, 58).

A influência do movimento toraco-abdominal na função pulmonar de pacientes com DP demonstra uma diminuição significativa do movimento torácico durante medidas de volume corrente normal, sem diferença na mobilidade abdominal. Porém, durante manobras de inspiração máxima, os movimentos abdominais também apresentaram diferença significativa nos pacientes com DP. A incoordenação entre a respiração e os movimentos toraco-abdominais nos pacientes com DP pode ser a possível explicação para as alterações encontradas, e o diafragma parece somente demonstrar suas alterações em manobras de ventilação forçada (19).

A força de contração da musculatura respiratória encontra-se comprometida uma vez que a imobilidade e a rigidez generalizada dos músculos responsáveis pela respiração dificultam a expansão do conjunto tórax-abdômen, bem como diminuem a força muscular (57,58). A fraqueza da musculatura respiratória, especialmente da expiratória, pode ocasionar redução

da pressão expiratória máxima, menores fluxos expiratórios, bem como aumento do volume residual, estando possivelmente correlacionada ao agravamento da doença (47,46). A presença de fraqueza dos músculos respiratórios é consistente com a redução da capacidade de realização de manobras expiratórias forçadas. A fraqueza muscular em pacientes com DP restringe a capacidade de superar a rigidez e contribui para a redução do volume pulmonar e da pressão respiratória, o que irá impactar na deglutição, tosse e fonação (66). Resultados obtidos em pacientes com DP usando eletroneuromiografia (EMG) dos músculos respiratórios (67,68) mostrou que, enquanto o diafragma exibe uma atividade próxima da normal outros músculos mostraram uma atividade contínua que poderia estar relacionado com a rigidez do parkinsoniano, na medida em que foi observado predominantemente no lado mais afetado em pacientes com DP assimétrica.

Esses pacientes apresentam redução significativa das fibras musculares do tipo IIA, levando à atrofia por desuso ou descondicionamento físico, predispondo à fraqueza e fadiga musculares. Ainda, a redução de massa muscular leva a incoordenação dos movimentos, quedas freqüentes, intolerância ao exercício e piora progressiva do condicionamento físico, limitando as atividades de vida diária (58).

Com relação a influência do estresse na DP, as pesquisas demonstram que a perda de neurônios dopaminérgicos mesocortical, que ocorre em estágios mais avançados da DP, pode resultar num sistema mais vulnerável ao estresse (69). Animais submetidos ao estresse têm aumentos de deficiências motoras decorrentes da perda de dopamina. Segundo alguns estudos o estresse agudo prejudica movimento durante o "reaching test" em animais, sugerindo ansiedade associada ao estresse pode influenciar a função motora (70). Após a lesão, os animais acinéticos ainda estão sensíveis ao estresse e pode ocorrer uma liberação relativamente maior de quantidade de dopamina extracelular, apoiando a idéia de que o stress pode modular o sistema nigroestriatal lesionado (71). Estes estudos indicam que o estresse pode interferir no controle dopaminérgico dos movimentos motores, com glucocorticóides, possivelmente afetando a resposta compensatória ao sistema motor danificado (70,72). Em outro estudo constatou-se que o estresse de imobilização aguda determinada antes da administração de 6-hidroxidopamina

(6-OHDA) aumenta déficits comportamentais e neuroquímicos em comparação com os animais que apenas receberam 6-OHDA (73).

Animais que receberam 6-OHDA apresentaram movimentos mais lentos, entraram em estado de congelamento mais vezes e tornaram-se mais rígidos quando desafiado com os estressores, apresentando respostas normais quando deixados sozinhos em suas gaiolas (74).

Os pacientes com DP inicial podem demonstrar sintomas característicos de grave deficiência de dopamina após submetidos ao estresse (74), indicando, pelo menos, o estresse temporário induz a uma aceleração da doença (75,76). Além disso, acinesia é muitas vezes precipitada por situações emocionalmente angustiantes, indicando que o estresse afeta a DP de modo semelhante à neurodegeneração em modelos experimentais (77).

Estas observações sugerem que o stress pode ser uma variável importante que influencia os processos e sintomas neurodegenerativos da PD. O estresse exagera déficits funcionais e acelera a perda de neurônios produtores de dopamina. Assim, o estresse pode representar uma variável crítica na progressão neurodegenerativa de eventos subjacentes da DP.

1.2.3 Envelhecimento

O envelhecimento pode ser compreendido como um conjunto de alterações estruturais e funcionais do organismo, que se acumulam de forma progressiva, especificamente em função da idade. O aumento na proporção de idosos na população ocorre em todo o mundo, acarretando um aumento dos custos e gastos médico-sociais, criando problemas sociais, políticos e econômicos (78). Este envelhecimento da população do mundo desenvolvido afeta o planejamento futuro em serviços de emergência e aumenta o interesse em estudos de doenças crônicas. De acordo com o estudo das Nações Unidas (79), atualmente, as pessoas com mais de 69 anos representam 22% da população total, e estima-se um aumento de 35% até 2100 (80).

Doenças respiratórias associadas ao avanço da idade são contribuintes significativos para morbidade e mortalidade em adultos > 65 anos de idade. Por exemplo, comparado com adultos mais jovens, há uma incidência três vezes maior de pneumonia em adultos saudáveis > 65 anos de idade e uma

incidência 10 vezes maior de pneumonia em pacientes > 65 anos de idade em instituições de cuidados crônicos (81). Este aumento da incidência de doenças respiratórias relacionada ao envelhecimento pode ser atribuída em parte a um processo progressivo enfraquecimento dos músculos respiratórios resultando em tosse menos eficaz (82).

Com base na alta incidência de internações e mortes decorrentes de patologias respiratórias, principalmente no inverno, observa-se grande interesse das entidades governamentais mundiais, no controle e prevenção de doenças respiratórias na população idosa. As doenças mais comuns nos idosos são de natureza cardíaca ou respiratória, embora número extenso de comorbidades pode afetar o prognóstico e diagnóstico desta população (80).

O processo de envelhecimento desencadeia no indivíduo uma série de alterações fisiológicas, sendo que as primeiras podem ser detectadas já ao fim da terceira década de vida. Essas alterações são observadas em todos os sistemas do organismo, sendo que as principais alterações funcionais que afetam o desempenho físico são a perda de força muscular geral e a redução da amplitude de movimentos articulares. Associadas às alterações ósseas e articulares e dos tecidos moles, estas alterações promovem modificações no posicionamento dos segmentos corporais, durante a sustentação do corpo e na biomecânica respiratória (83).

1.2.3.1 Distúrbios Respiratórios no Envelhecimento

O sistema respiratório possivelmente seja o sistema do organismo que envelhece mais rapidamente devido à maior exposição a poluentes ambientais ao longo dos anos. Ao longo do restante da vida, o envelhecimento está associado a uma diminuição no desempenho pulmonar; no entanto, a menos que afetado por doença, o sistema respiratório permanece capaz de manter as trocas gasosas adequadas durante todo tempo de vida (84).

As alterações fisiológicas na função pulmonar nos idosos incluem alterações nos pulmões, caixa torácica, músculos respiratórios e impulsão respiratória, caracterizada por diminuição do recolhimento elástico do pulmão, complacência da parede torácica, força muscular respiratória e resposta à hipoxemia e hipercapnia. Em indivíduos saudáveis, essas alterações são mais

evidentes aos 80 anos de idade, apesar de estarem presentes desde os 50 anos (85).

Os pulmões envelhecidos contêm menos, mas maiores alvéolos, a força muscular é reduzida, e há um aumento da calcificação das articulações intratorácicas; e a contribuição do diafragma para a ventilação é elevada, particularmente durante o exercício e em momentos de estresse. Essas mudanças afetam toda a mecânica do sistema respiratório e, por sua vez, modificam trabalho estático da respiração. O envelhecimento humano experimenta uma redução no trabalho elástico do tecido pulmonar e uma maior calcificação das articulações da caixa torácica que aumentam a rigidez da parede torácica, uma parede torácica mais rígida aumenta o trabalho estático da respiração (86). O principal fator no declínio da função pulmonar com a idade é, então, a perda de elasticidade pulmonar, agravada pelo aumento da rigidez parede torácica e força muscular respiratória reduzida (87).

Nos pulmões senis, há diminuições no número de fibras elásticas, no recuo elástico dos pulmões bem como um aumento na resistência do fluxo de ar, que levam ao aprisionamento aéreo progressivo e causa aumento da complacência do parênquima pulmonar (85). Este aumento da complacência, entretanto, não consegue compensar a diminuição da complacência da caixa torácica. Os bronquíolos tornam-se menos resistentes, facilitando o colapso expiratório. Resultando em dilatação do espaço aéreo, maior colapsibilidade de pequenas vias aéreas e uma redução nos volumes expirados (87).

A diminuição do número de alvéolos, devido à ruptura dos septos interalveolares e conseqüente fusão alveolar, é também evidente, condicionando uma diminuição da superfície total respiratória, aumento do volume residual e da complacência pulmonar. As paredes das vias aéreas tornam-se menos resistentes, predispondo ao colabamento expiratório. Conseqüentemente ocorre dilatação dos bronquíolos respiratórios, ductos e sacos alveolares (83).

Todos estes sinais são consistentes com enfisema ou doença das pequenas vias aéreas e levou à denominação do termo denominado "enfisema senil". A capacidade pulmonar total (CPT) permanece inalterada, uma importante diferenciação entre "enfisema senil" e enfisema real. Isso porque como o recuo elástico do pulmão diminui, a redução da capacidade vital está

associada a um aumento no volume residual e à rigidez da parede torácica (87).

O volume residual, volume que resta nos pulmões após uma expiração profunda, tende a aumentar com a idade. O volume de reserva inspiratória e o volume de reserva expiratória se tornam proporcionalmente menores. A perda na reserva inspiratória e o aumento no volume residual são atribuídos a uma redução nos componentes elásticos do tecido pulmonar, observada com o envelhecimento (83).

A capacidade vital (CV) sofre, geralmente, uma redução de quase 25% ou 40%, o volume expiratório máximo ao primeiro segundo (VEF1) diminui claramente a uma taxa que depende do gênero e da idade e a razão VEF1/CVF (índice de Tiffeneau) cai progressivamente com o aumento da idade, estimando-se 73% aos 65 anos (já que o declínio da capacidade vital forçada (CVF) com a idade e um pouco menor do que o declínio do VEF1). Mais acentuadamente que qualquer outro parâmetro, a ventilação máxima voluntária (VMV) diminui (84).

As alterações fisiológicas do envelhecimento relacionadas à caixa torácica consistem em uma diminuição na complacência dinâmica, que está relacionada calcificação das cartilagens, das articulações costovertebrais e outras mudanças estruturais dentro da caixa torácica e suas articulações, e diminuição dos espaços intervertebrais (85). Os condrócitos se degeneram e as fibras colágenas se espessam, aumentando o depósito de cálcio e a cartilagem torna-se mais rígida. Desaparecem as articulações sinoviais entre o esterno e cartilagens costais, elementos ósseos e cartilagosos se fundem, ocorre um aumento na cifose torácica, o que leva a um prejuízo biomecânico aos músculos respiratórios (83). As alterações estruturais que ocorrem na parede torácica promovem alterações na postura e nos esforços respiratórios de idosos, acarretam redução na força muscular respiratória, ventilação voluntária máxima, volume de reserva inspiratória e expiratória e trocas gasosas (87). As mudanças na forma do tórax também ocorrem como resultado da osteoporose relacionada à idade, podendo resultar em fraturas vertebrais em cunha ou completa (esmagamento), levando a um aumento da cifose dorsal e do diâmetro ântero-posterior (AP) ("peito barril"). Estas modificações da parede torácica não só alteram sua conformidade, mas também modificam a curvatura

do diafragma, com um efeito negativo na geração de força muscular com conseqüente redução nas forças de tração da parede torácica. Todos estes fatores contribuem para a redução nas pressões inspiratória e expiratória máximas e redução da pressão transdiafragmática máxima (Pdi) (88,84).

O idoso utiliza 70% da elasticidade total de sua parede torácica. Assim, a redução na elasticidade, somada às modificações na morfologia torácica, que determinam a configuração do tórax senil, e a hipotrofia dos músculos esqueléticos acessórios da respiração, reduzem a capacidade de expansão da caixa torácica (83).

Além das alterações no parênquima pulmonar e caixa torácica, os músculos respiratórios também sofrem modificações com o envelhecimento. O envelhecimento causa miopatia esquelética que afeta os músculos dos membros e dos músculos inspiratórios. Essas modificações incluem diminuições no tamanho e número de fibras musculares e na capacidade das junções neuromusculares de transmitir impulsos nervosos, perda de neurônios motores periféricos e redução da capacidade de trabalho muscular, que juntos podem reduzir a força muscular (85). Apesar dos músculos inspiratórios serem também "músculos esqueléticos", seus mecanismos estruturais, funcionais e metabólicos, bem como suas propriedades, e resposta a estressores ou inatividade são surpreendentemente diferentes dos músculos dos membros (14).

O processo de envelhecimento também é caracterizado por mudanças no drive respiratório, há uma redução da atividade nervosa central e dos impulsos neuronais para os músculos respiratórios o que diminuem a resposta à hipoxemia e hipercapnia (85).

O diafragma é o principal músculo inspiratório e as anormalidades do diafragma ocorrem mais cedo ou em maior extensão do que nos músculos dos membros. Diminuição da função do músculo diafragma, o principal músculo inspiratório, pode contribuir significativamente para o aumento da suscetibilidade a complicações respiratórias durante o envelhecimento (14).

A sarcopenia, que é a perda específica da força muscular relacionada à idade e da área transversal do músculo, é também observada no músculo diafragma e pode estar na base da maior suscetibilidade a doenças respiratórias observadas clinicamente em indivíduos idosos. Os mecanismos

necessários para manter a permeabilidade das vias aéreas podem ser prejudicados. Os músculos respiratórios, incluindo o diafragma, são importantes para manter a ventilação e, portanto, são altamente ativos ao longo da vida. Além disso, esses músculos são importantes durante comportamentos de força superior e expulsão quase máxima, comportamentos necessários para a remoção das secreções de vias aéreas e durante o comportamento não-ventilatórios. A redução da produção de força do diafragma pode também prejudicar esses outros comportamentos expulsivos não ventilatórios que requerem ativação quase máxima deste músculo e que exigem a geração de pressões intra-abdominais grandes e positivas como a Manobra de Valsalva, vômito e parturição (89).

Reduções na massa muscular respiratória podem também contribuir para uma diminuição da força produzida pela atividade muscular respiratória. Uma redução da atividade eletromiográfica muscular esquelética em até 50% nos indivíduos de 70 anos é atribuído à perda de fibras musculares de contração rápida tipo II (88).

Sendo, portanto, o processo de envelhecimento resultado da interação entre múltiplas influências externas e internas, é necessário distinguir entre os efeitos inerentes ao próprio envelhecimento e os efeitos aditivos de influências externas, que o antecipam ou retardam. Quando é avaliada a função pulmonar do idoso torna-se, assim, necessário discriminar o que é causa do envelhecimento biológico (senescencia), a causa patológica (senilidade), ou determinado por outros fatores não patológico, as tais influências externas, ou se trata de uma associação.

O conhecimento dessas alterações e a identificação dos padrões respiratórios de idosos saudáveis são importantes para detectar e prevenir a disfunção respiratória e contribuir para a elaboração de protocolos de intervenção.

1.2.4 Modelo Animal

A experimentação animal nas pesquisas científicas tem contribuído sobremaneira para o desenvolvimento da ciência e tecnologia, promovendo ao longo dos anos a descoberta de medidas profiláticas e tratamentos de

enfermidades que acometem os seres humanos. Animais de várias espécies têm sido utilizados nos últimos tempos, sendo os camundongos os mais intensamente utilizados e os mais profundamente conhecidos cientificamente.

A idéia de utilização de animais em pesquisas surgiu, principalmente, por questões econômicas. Mesmo com o progresso de métodos alternativos nos últimos anos (estudos *in vitro*, culturas de células, etc.), os modelos animais ainda apresentam como principal vantagem o fornecimento de informações sobre o organismo como um todo, fato que não é conseguido com outros métodos (92).

Estudos realizados em humanos relatam a dificuldade de se dissociar as alterações respiratórias dependentes exclusivamente da idade das alterações determinadas por outras comorbidades, ou por fatores ambientais ou genéticos. Portanto, estudos realizados em animais nascidos e criados em cativeiro para fins científicos podem ser valiosos nesse sentido, uma vez que o histórico clínico desses animais é registrado com riqueza de detalhes e fatores ambientais e genéticos são estritamente controlados (93).

A introdução do camundongo como animal de laboratório deve-se principalmente ao fato de ser pequeno, muito prolífero, ter período de gestação curto, ser de fácil domesticação e manutenção. Logo, tornou-se o mamífero mais usado na experimentação animal. Diversas vias de administração de fármacos podem ser usadas sem dificuldades, inclusive a venosa e a intratecal (intracerebral). Atualmente representam os melhores modelos experimentais de muitas condições patológicas humanas (94).

Na DP modelos animais são essenciais para a compreensão da patologia e dos deficits associados, bem como para o desenvolvimento e teste de agentes terapêuticos potenciais. Além disso, hoje é possível produzir inúmeras alterações moleculares e celulares nos neurônios dopaminérgicos, culminado em modificações comportamentais muito similares às encontradas em pacientes com DP (95).

Embora a etiopatogenia da DP ainda não esteja esclarecida, modelos animais têm demonstrado uma melhor compreensão dos mecanismos celulares e moleculares subjacentes ao processo neurodegenerativo progressivo. Nos anos cinquenta, modelos farmacológicos com base na administração de drogas que destroem a monoamina tiveram um papel

importante demonstrando a relação entre o esgotamento de dopamina e os sintomas motores do Parkinson, bem como a eficácia da terapia com Levodopa. No entanto, a reserpina e modelos haloperidol tinham sérias limitações em imitar a patogênese da DP uma vez que os animais tratados com a droga exibiam depleção da dopamina do estriado transiente não associada com a neurodegeneração típica da substância negra (96).

No entanto, o papel central desempenhado por estes modelos é avaliar a eficácia terapêutica de fármacos em uso clínico. Os chamados modelos baseados na neurotoxina da DP são o mais eficazes em reproduzir a morte irreversível de neurônios dopaminérgicos e o déficit de dopamina no estriado em primatas e roedores. MPTP, 6-OHDA (6-hidroxi-dopamina), e rotenona são até hoje, os compostos mais largamente usados. Eles são particularmente atrativos para a indução de citotoxicidade por mecanismos de estresse oxidativo, como no cérebro de pacientes com DP, mostram a diminuição dos níveis de glutathiona reduzida e modificações oxidativas ao DNA, lipídeos e proteínas (97,98). O 6-OHDA não pode atravessar a barreira hemato-encefálica e deve ser injetado no cérebro através de um procedimento de cirurgia guiada estereotáxica. O 6-OHDA é levado aos neurônios dopaminérgicos devido à sua elevada afinidade como transportador de dopamina. Uma vez dentro dos neurônios, 6-OHDA é facilmente oxidado em oxigênio reativo que levam à inibição da cadeia de transporte de elétrons e estresse oxidativo (99). 6-OHDA unilateral é geralmente injetado na substância negra ou no corpo estriado (degeneração retrógrada). A injeção unilateral permite a avaliação da morte de células neuronais e os parâmetros moleculares no hemisfério da lesão em comparação com o lado contralateral intacto (100).

Dessa forma, utilizando-se modelos animais, é possível ampliar as formas de compreensão da doença a níveis muito detalhados, podendo-se inclusive sugerir novas formas de abordagem terapêutica a serem testadas na clínica.

São referidos na literatura quatro tipos básicos: induzido, espontâneo, negativo e modelo órfão (91). A DP é uma doença exclusiva da espécie humana, não se manifestando espontaneamente em animais. Esse fato indica que essa patologia é somente observada em animais (p.e. macacos ou roedores) através da administração dos agentes neurotóxicos, como a 6-OHDA, metanfetamina, rotenona ou MPTP citados anteriormente (101). O

modelo experimental induzido para DP mais descrito é em ratos e mais recentemente em camundongos. A técnica utilizada é a infusão unilateral de 6-OHDA no feixe medial do prosencéfalo. Durante um curto período, este processo leva à morte de neurónios dopaminérgicos da substância negra, com perda de seus terminais nervosos no estriado, o que modela a patologia de Parkinson (102).

O modelo experimental induzido para DP mais descrito é em camundongos. A técnica utilizada é a infusão unilateral de 6-hydroxydopamine (6-OHDA) no feixe medial do prosencéfalo. Durante um curto período, este processo leva à morte de neurónios dopaminérgicos da substância negra, com perda de seus terminais nervosos no estriado, o que modela a patologia de Parkinson (102).

Primatas não-humanos são nossos parentes mais evolutivos e, como tal, são mais semelhantes aos seres humanos em sua anatomia, embriologia, desenvolvimento fetal, imunologia, bioquímica, interações gênicas, aparelhos sensoriais e função fisiológica e psicológica global do que qualquer outro grupo de animais. Como consequência, pesquisas com primatas é particularmente relevante para a compreensão da saúde humana, doença e terapêutica. A caracterização de envelhecimento em um primata de vida curta abrirá novas possibilidades para a avaliação da saúde no contexto do envelhecimento (103).

Em contraste com muitas outras espécies de animais de laboratório, o uso de primatas não humanos aumentou nos últimos anos e existe atualmente uma escassez substancial de tais animais para uso em pesquisa biomédica. O mico-comum é um pequeno primata nativo do leste do Brasil e tem sido amplamente utilizado como modelo de pesquisa biomédica na América do Norte e na Europa. Primatas do Novo Mundo (platirrinas) representam um grupo diverso de animais abrangendo duas famílias (as Cebidae e Callitrichidae), e pelo menos 76 espécies distintas (104)

O mico-comum é um pequeno primata que oferece recurso valioso como um modelo animal para examinar riscos de doenças, envelhecimento e declínio funcional, devido ao seu menor tempo de vida médio e reprodução mais rápida do que qualquer outro primata antropoide. Com uma vida média de 5 a 7 anos e uma vida útil máxima de 16 ½ anos, os micos são os primatas antropóides de vida mais curta. Eles exibem mudanças relacionadas à idade em patologias

que podem refletir aquelas vistas em humanos, como câncer, amiloidose, diabetes e doença renal crônica (103).

Eles também exibem previsíveis diferenças relacionadas à idade na massa magra, circunferência da panturrilha, albumina circulante, hemoglobina e hematócrito (105).

Todos esses fatores contribuem para tornar o mico-comum um modelo ideal para os estudos do envelhecimento biológico e, em particular, o desenvolvimento de um modelo animal de declínio funcional e extensão de saúde (103).

Além disso, esses animais possuem outras vantagens para utilização científica como maior facilidade de manejo e menores custos de manutenção. Neste estudo, nós propomos utilizar micos criados pela companhia japonesa Clea Japan Inc., cujos viveiros abrigam sujeitos idosos sadios com idade superior à expectativa de vida para a espécie (que é cerca de 12 anos de idade para animais em cativeiro).

2 ESTUDO 1 - Artigo Publicado

A doença de Parkinson (DP) frequentemente apresenta distúrbios respiratórios, particularmente em seus estágios mais avançados. Tais desordens como pneumonia aspirativa é responsável por uma maior mortalidade entre os pacientes com DP do que a própria doença (41). A progressão da doença pode ser dividida em etapas, de acordo com sintomas e gravidade de tais sintomas (28). A maioria das características proeminentes da DP, os chamados sintomas motores, são atribuídos à degeneração de circuitos dopaminérgicos no cérebro interiormente e nos núcleos basais (32). Nos estágios iniciais, os sintomas não motores da PD são atribuídos à atividade interrompida na medula oblonga, nervos entéricos e bulbo olfatório, enquanto nos estágios posteriores, o envolvimento do o córtex pode causar sintomas cognitivos e límbicos (134).

Além de áreas específicas do cérebro, a duração da doença pode estar associado com o grau de degeneração da via nigrostriatal dopaminérgica (113). Estima-se que no momento em que os sintomas motores se apresentam e um diagnóstico de DP pode ser feito, a maioria dos pacientes terá cerca de 60% de

redução na quantidade de neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal (23). É possível que distúrbios respiratórios associados à DP possam ser encenados de maneira semelhante; em outras palavras, um certo padrão de sintomas respiratórios pode surgir em relação à progressão da doença. Nós já relatamos alterações em um modelo de camundongo imitando os estágios iniciais de PD (106). Neste estudo, avaliamos alterações respiratórias em um modelo mais severo de DP. Além disso, observamos os resultados de um desafio de estresse no modelo de DP grave. Um desafio de estresse é o processo de induzir uma resposta fisiológica expondo o animal a um estímulo aversivo (estressante).

2.1 HIPÓTESE:

A primeira hipótese deste estudo seria que a Doença de Parkinson em um estágio mais avançado causaria um enrijecimento da caixa torácica e dos músculos respiratórios com consequente menor mobilidade do compartimento tóraco-abdominal. Como resultado teríamos uma menor mobilidade da caixa torácica, do diafragma e dos ângulos dos seios costofrênicos. A segunda hipótese deste estudo seria que o estresse seria capaz de exacerbar tais alterações respiratória em animais com DP.

2.2 OBJETIVO:

Estudar possíveis alterações na função respiratória de camundongos com estágio avançado de Doença de Parkinson quando submetidos a estresse.

Para tanto, utilizamos métodos minimamente invasivos, como a técnica de cineradiografia desenvolvida por nosso grupo (106,107), que permite o estudo detalhado da função respiratória, batimentos cardíacos, e alterações posturais e esqueléticas em diferentes animais.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Verificar os parâmetros de função respiratória com a severidade dos sintomas motores;

- Testar e analisar os aspectos anatômicos e fisiológicos que marcam a mobilidade diafragmática durante a ventilação;
- Avaliar a influência da Doença de Parkinson nas funções diafragmáticas durante a ventilação em estágio avançado da doença;
- Avaliar a influência da Doença de Parkinson nas funções diafragmáticas quando submetidos a estresse em estágio avançado da doença;
- Analisar, radiologicamente, parâmetros de mobilidade do diafragma e da mobilidade torácica em estágio avançado da doença;
- Definir os aspectos que marcam as características típicas da diminuição da mobilidade diafragmática na Doença de Parkinson.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS:

2.4.1 Animais:

Esta pesquisa foi realizada com camundongos C57BL/6J SPF (“Specific Pathogen Free”) do sexo masculino, adultos com aproximadamente 8 semanas (peso corpóreo inicial de 22 a 25 g), adquiridos da companhia Nihon Clea (Tóquio, Japão).

Os animais foram alojados individualmente em gaiolas de acrílico de 20 cm × 20 cm × 30 cm forradas com material absorvente, com alimentos disponíveis gratuitamente (comida normal) e água. Os animais foram mantidos em sala climatizada ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e em um ciclo de 12 horas escuro / claro. Um total de 36 camundongos foram utilizados e divididos aleatoriamente em dois grupos: experimental (6-OHDA) e controle. Após a cirurgia, 9 animais do grupo 6-OHDA foram excluídos por causa das más condições de saúde. O número total de animais em cada grupo foi 6-OHDA n=9, controle n=18. Todos os animais foram sacrificados após os experimentos por overdose anestésica.

Os procedimentos descritos estão de acordo com as recomendações da “Tokyo Medical and Dental University” para o bem-estar e utilização adequada de animais em pesquisa, e tiveram anuência prévia do seu comitê institucional de ética em pesquisa animal.

Toda a coleta de dados, ou seja, realização da cirurgia, aplicação dos testes comportamentais e a cineradiografia, foram realizadas na Tokyo

Medical and Dental University, no Japão. A análise dos vídeos foi realizada na Universidade de Brasília.

2.4.2 Preparação animal:

Os camundongos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de Ketamine (90-120 mg/kg) e Xylazine (10 mg/kg e suplementado conforme necessário. O nível apropriado da anestesia cirúrgica foi determinado pela ausência de reflexos de retirada ao estímulo de "pinch" da cauda. Os animais foram colocados em um dispositivo esterotático (Narishige, Tóquio, Japão) e receberam duas microinjeções de 6-OHDA ou soluções salinas no corpo estriado do lado esquerdo. As coordenadas foram 1) AP = +1,0, L = -2,1, DV = -2,9; e 2) AP = +0,3, L = -2,3, DV = -2,9; AP: +0,5; L: -2,0 e DV: -3,0mm (relativo ao bregma, sutura sagital e superfície dural) (108).

Todas as soluções foram preparadas no dia da cirurgia e mantidas em frascos sob proteção e armazenados em uma caixa de gelo até o uso. A solução 6-OHDA consistia em 12 µg de cloridrato de 6-OHDA (Sigma-Aldrich, Tóquio, Japão) dissolvido em NaCl a 0,9% com ácido ascórbico a 0,02% em água. A solução salina consistiu em 0,02% de ácido ascórbico e 0,9% de NaCl em água estéril. O volume total injetado de ambas as soluções foi de 4 µL (2 x 2-µL) com o caudal de 0,5 µL/min. As injeções foram feitas através de uma agulha 32G ligada a uma seringa Hamilton 10 µL em uma injeção bomba. A agulha de injeção foi deixada no local por 2 min antes e 2 min após a injeção. Os animais foram monitorados até recuperação da anestesia, depois voltaram para suas gaiolas.

2.4.3 Testes Comportamentais:

Testes comportamentais foram realizados 2 semanas após a cirurgia. A função motora geral foi avaliada pelos três testes descritos abaixo. Todos os testes comportamentais foram avaliados por um examinador que era "cego" para o grupo de animais a qual pertencia.

Cylinder test: foi examinada a preferência de uso assimétrico das patas durante comportamento exploratório espontâneo, colocando o animal dentro de um cilindro (8 cm de diâmetro x 11 cm de altura) na frente de espelhos verticais que permitem uma visão clara do animal em todos os ângulos. Os animais

foram filmados por 5 min enquanto no cilindro de béquer (Figura 5A). Este teste foi realizado apenas uma vez, para evitar a habituação, e pouco antes da hora de apagar as luzes, quando os animais são mais ativos. O comportamento normal do animal é explorar o novo ambiente, criado dentro do copo, tocando as paredes de vidro com suas patas dianteiras (Figura 5B). O número de contatos de suporte de peso na parede do cilindro feitos pelas patas direitas e esquerdas foi contado.

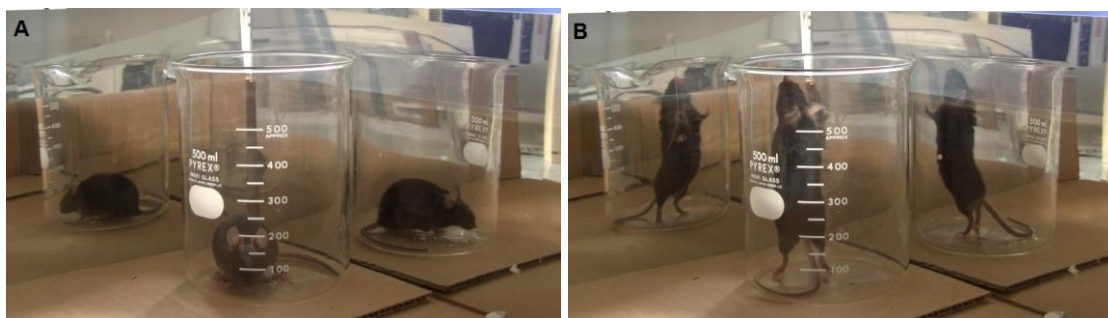


Figura 5. Realização do "Cylinder test": teste utilizado para detectar o uso assimétrico das patas - avalia o grau de severidade da lesão. A) O animal é colocado em um cilindro de vidro com espelhos aos fundos que facilitam a visualização do uso das patas. B) O animal é filmado por 5 minutos, e são contados a quantidade de vezes que o animal tocou o cilindro com cada uma das patas.

Rotation test: este teste é usado para detectar assimetria no uso do patas, déficits cognitivos ou bem-estar geral em camundongos. Os animais foram colocados em compartimentos individuais e filmados por 5 min. O número de voltas que o animal completou em direção a cada lado durante o período de observação foi analisado.

Apomorphine test: este teste avalia a gravidade da lesão e é usado para detectar a assimetria no uso das patas. De maneira semelhante ao Rotation Test descrito acima, os animais foram colocados em compartimentos e filmados 20 min após uma injeção de apomorfina (0,5 mg/kg, i.p., Sigma-Aldrich, Tóquio, Japão). A droga tem o efeito de excitação excessiva da área deficiente em dopamina da lesão neurotóxica, fazendo com que o animal se mova e gire na direção contralateral a injeção de 6-OHDA. Exceto para o teste de apomorfina, todos os outros testes comportamentais foram realizados antes dos registros cineradiográficos dos movimentos respiratórios.

2.4.4 Cinerradiografia

A avaliação da mobilidade do diafragma é também realizada através de cinerradiografia ou videofluoroscopia e diversos estudos têm-se utilizado desta

técnica para avaliação da mobilidade do diafragma após paralisias diafragmáticas ou outras disfunções, principalmente em doenças neurológicas e respiratórias (6,9,12,18).

É uma técnica de diagnóstico em que uma câmera de vidro é usada para filmar o movimento das estruturas internas do corpo, permite uma visualização do movimento durante o ciclo respiratório normal, ou durante a inspiração forçada (6).

É uma imagem funcional que permite uma avaliação mais aprofundada após da elevação e movimentação diafragmática. Na fraqueza de um ou ambos os hemidiafragmas, excursão pode estar reduzida durante uma inspiração profunda. Se a fraqueza é mais grave, o movimento pode ser paradoxal na respiração profunda e até na mesmo durante a respiração tranquila (9).

A análise é simples de se executar e os resultados são facilmente interpretados. Alguns estudos têm demonstrado correlação entre a mobilidade do diafragma e medidas de volumes pulmonares, demonstrando que este tipo de avaliação reflete alterações volumétricas (18).

A cinerradiografia tem sido considerada como o método mais confiável de avaliação quantitativa da amplitude do movimento crânio-caudal do diafragma durante a respiração espontânea (90).

2.4.5 Registros Cinerradiográficos:

Confirmada a presença de parkinsonismo, foram então realizados os registros dos movimentos respiratórios através de vídeos de raios-X em dois planos (lateral e horizontal) sem qualquer restrição aos movimentos corpóreos dos animais (Fig. 6).

Registros cinerradiográficos foram obtidos 2 semanas após a cirurgia. Antes das gravações, os animais foram habituados ao aparelho de cinerradiografia (Micro X-filme, NIC, Fujisawa, Japão) por 5 min durante dois dias consecutivos. Nos dois dias consecutivos seguintes, 6 min de gravações foram feitas para cada animal em cada dia. Os animais foram transferidos para uma gaiola de teste dentro do aparelho, um a um, sem qualquer restrição. As gravações consistiram em um minuto para cada: 1) habituação, 2) observação, 3) primeira rotação, 4) observação, 5) segunda rotação 6) observação. As

medições foram feitas durante os períodos de observação. Desafio de estresse: durante as gravações, a gaiola de teste interna dentro do aparelho foi rodada de forma a provocar um estímulo aversivo nos animais. As rotações consistiram de 60 s de rotação de 1 Hz em torno do centro de massa dos animais. A primeira e segunda rotações foram aplicadas em direção a lados opostos e contrabalançados. As imagens foram obtidas passando um feixe de raios X verticalmente no animal por um tubo de raios X de micro foco (Toshiba Electron Tubes e Devices Co. Ltd., Tóquio). Configurações de energia no tubo de raios X foram mantidos constantes a 70 kV e 0,3 mA para obter emissão de raios X estável. Os fótons de raios-X que passam pelo animal foram convertido em luz visível por um intensificador de imagem de resposta rápida de berílio (Toshiba Electron Tubes e Devices Co., Ltd., E5889BP-P1K).

Esta imagem foi capturada por uma câmera de vídeo digital posicionada embaixo do intensificador de imagem (107). Os vídeos foram gravado a 29 fps e 1920 × 1080 pixels.

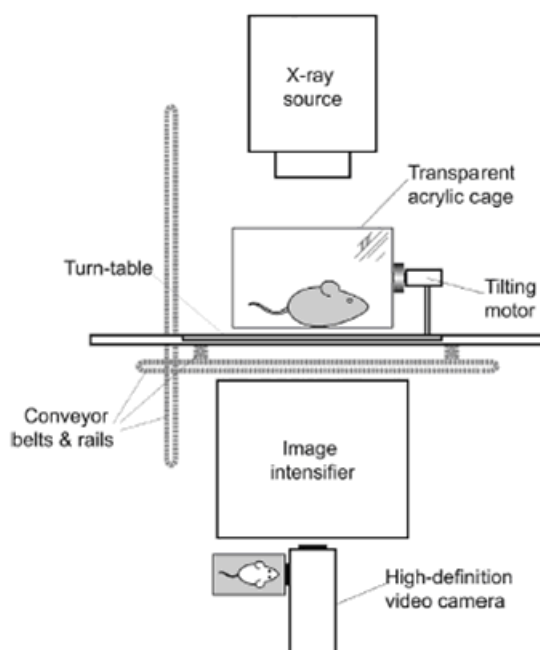


Figura 6. Esquema do aparelho de cineradiografia. Uma vista lateral mostra a gaiola teste mantendo o animal entre a fonte de raios X e o intensificador de imagem. A gaiola de teste pode ser suavemente movida por motores nas três dimensões, girada e inclinada para posicionamento do animal, mesmo quando ele se move na gaiola. Imagens de raios-X foram capturadas em tempo real por uma câmera de vídeo de alta definição.

2.4.6 Movimentos Respiratórios

Foram medidas a frequência respiratória, excursão diafragmática, amplitude do ângulo costofrênico (CPA), e a distância entre os ângulos costofrênicos (CPAs) durante uma respiração tranquila, de maneira semelhante à descrita anteriormente (106).

Cada animal foi registrado duas vezes e cada vídeo teve as medidas mensuradas três vezes em cada período de observação (total de 18 medições/animal). As medições foram feitas por um examinador "cego" que desconhecia os animais que receberam 6-OHDA ou solução salina.

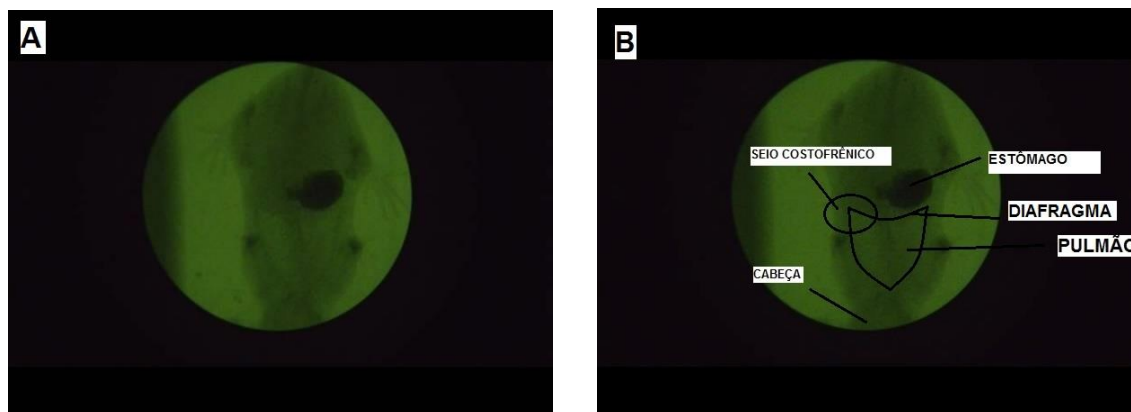


Figura 7. A) imagem radiográfica de alta velocidade visualizada através do programa KINOVEA. B) visualização das estruturas aparentes na imagem radiográfica.

A medida da frequência respiratória foi derivada do número de quadros entre a inspiração máxima e a próxima expiração máxima. Períodos de apnéia, definidos como intervalos ≥ 2 ciclos respiratórios (109), foram excluídos. A altura direita e esquerda da cúpula diafragmática foi medida perpendicularmente entre a linha imaginária conectando o CPA direito e esquerdo e o ponto mais alto a cúpula. A excursão diafragmática foi medida como a diferença da altura da cúpula diafragmática entre a expiração máxima e inspiração máxima (Fig. 8A). O ângulo costofrênico é formado entre perfil do diafragma e da borda da parede torácica, o CPA direito e esquerdo foram medidos durante uma expiração máxima e inspiração máxima nos lados direito e esquerdo do corpo (Fig. 8B). A variação angular foi obtida subtraindo a medida na inspiração máxima pela expiração máxima e isso reflete a mobilidade do todo tórax-abdome. A distância entre os ângulos costofrênicos

foi medida durante uma expiração máxima e inspiração máxima e reflete a mobilidade do tórax. O software Kinovea (<http://www.kinovea.org/>) foi usado para exibição quadro a quadro e medição de imagens de vídeo.

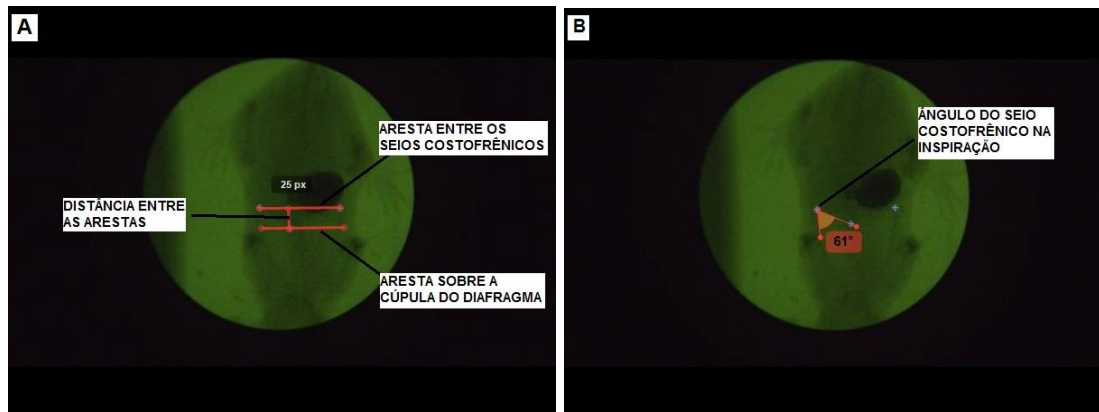


Figura 8. A) imagem radiográfica da distância entre os seios costofrênicos, aresta sobre a cúpula diafragmática e distância entre as arestas. B) visualização do ângulo do seio costofrênico.

2.4.7 Análise estatística:

As diferenças de grupo entre os animais do grupo 6-OHDA e controle foram comparados pelo teste U de Mann-Whitney (não paramétrico não pareado), onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. O Friedman teste (medidas repetidas não paramétricas) foi usado para testar os efeitos da estimulação de stress (sem rotação, 1ª rotação, 2ª rotação) em cada grupo. Quando o teste de Friedman mostrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), comparações post-hoc em pares entre as fases de desafio de estresse: antes (Rotação 0), após a primeira rotação (Rotação 1) e após a segunda rotação (Rotação 2) foram feitas pelo Wilcoxon teste de posto assinado (pareado não paramétrico de dois grupos). Testes post-hoc foram conduzido com uma correção de Bonferroni em que $p \leq 0,01$ foi considerado significativo.

2.5 RESULTADOS

Testes comportamentais indicaram que as lesões produziram um padrão consistente com degeneração nigrostriatal avançada (Fig. 9). No Rotation Test (Fig. 9A), os camundongos 6-OHDA fizeram significativamente mais voltas unilaterais do que os animais do grupo controle ($2,48 \pm 0,91$ (R-L)/min, e $0,08 \pm$

0,19 (RL)/min para camundongos 6-OHDA e controle, respectivamente) ($p < 0,05$). No Apomorphine Test (Fig. 9B), novamente os animais 6-OHDA deram significativamente mais voltas unilaterais, desta vez para o lado oposto ($-3,79 \pm 0,60$ voltas/min e $-0,46 \pm 0,2$ voltas/min em 6-OHDA e controle, respectivamente) ($p < 0,05$). No Cylinder Test (Fig. 9C-D), os camundongos 6-OHDA permaneceram mais imóveis e se elevaram significativamente menos do que os animais controles ($4,87 \pm 1,95$ e $16,40 \pm 2,60$ elevações para 6-OHDA e controles, respectivamente) ($p = 0,01$). No mesmo teste, no entanto, ao contrário do esperado, camundongos 6-OHDA falharam em exibir qualquer preferência de pata e poucas elevações, tocaram as paredes do cilindro com ambas as patas dianteiras indistintamente. Quando a preferência de pata foi analisada, não houve diferença significativa entre os grupos (uso de pata: $59,76 \pm 8,16$ L / (L + R) para 6-OHDA e $49,49 \pm 1,66$ L / (L + R) para controles).

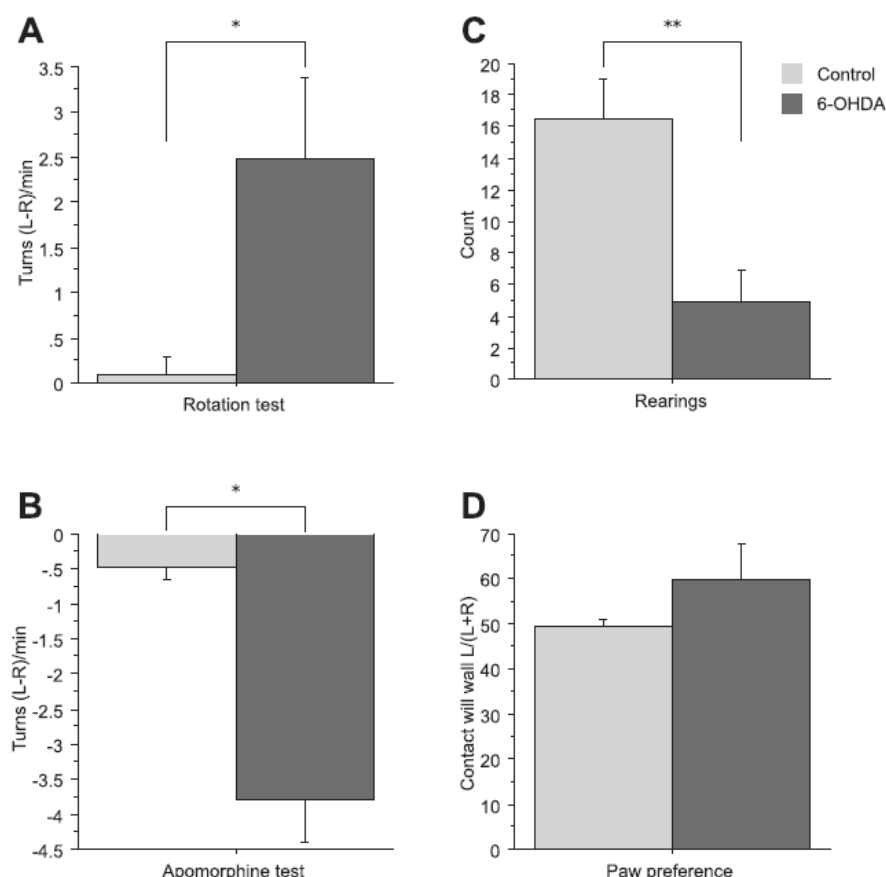


Figura 9. Testes comportamentais. (A) No Rotation Test, os camundongos 6-OHDA apresentaram maiores valores de rotação em direção a apenas um lado (lado esquerdo), enquanto o grupo controle apresentou simetria nas rotações. (B) No Apomorphine Test, os camundongos 6-OHDA mostraram maiores rotações em direção ao lado injetado pela doença (lado direito), enquanto os animais controle eram quase simétricos. (C) No Cylinder Test, as elevações foram muito poucas nos camundongos 6-OHDA em comparação aos controles, demonstrando baixa mobilidade deste grupo. (D) Também no Cylinder Test, a preferência da pata não foi detectada entre os grupos. O asterisco indica $p < 0,05$ e o asterisco duplo indica $p < 0,01$ no teste U de Mann-Whitney.

A distância entre CPAs foi significativamente maior nos camundongos 6-OHDA em relação aos controles ($21,32 \pm 0,18\text{mm}$ e $21,94 \pm 0,29\text{mm}$ na inspiração máxima e $19,07 \pm 0,19\text{mm}$ e $19,82 \pm 0,30\text{mm}$ na expiração máxima, respectivamente) (Fig. 10A). A diferença na distância CPA da inspiração máxima e expiração máxima foi semelhante entre os grupos, em média $2,25 \pm 0,10\text{mm}$ nos camundongos 6-OHDA e $2,11 \pm 0,11\text{ mm}$ no controle.

Quando os diferentes estágios de estimulação de estresse foram analisados, a distância entre CPAs apresentou alteração significativa apenas no grupo controle durante a expiração máxima (Fig. 10B). Nenhuma mudança foi encontrada na inspiração máxima ou na diferença entre inspiração e expiração máximas.

A frequência respiratória total foi significativamente menor em 6-OHDA do que nos animais controle (Fig. 10C), com as médias de $2,65 \pm 0,15\text{ Hz}$ e $3,26 \pm 0,85\text{ Hz}$, respectivamente ($p < 0,01$). Em camundongos 6-OHDA, as médias da frequência respiratória foram $3,14 \pm 0,24\text{ Hz}$ antes da rotação, $2,54 \pm 0,29\text{ Hz}$ após a primeira rotação e $2,26 \pm 0,22$ a segunda rotação. Houve uma diferença significativa na frequência respiratória entre as fases de estimulação de estresse (antes vs. segunda rotação) em camundongos 6-OHDA ($p = 0,01$) (Fig. 10D). Nenhuma diferença foi encontrada no grupo controle após a estimulação do estresse. No grupo de controle, as médias da frequência respiratória foram de $3,26 \pm 0,15\text{ Hz}$ antes da rotação, $3,37 \pm 0,13\text{ Hz}$ após a primeira rotação e $3,16 \pm 0,15$ após a primeira segunda rotação.

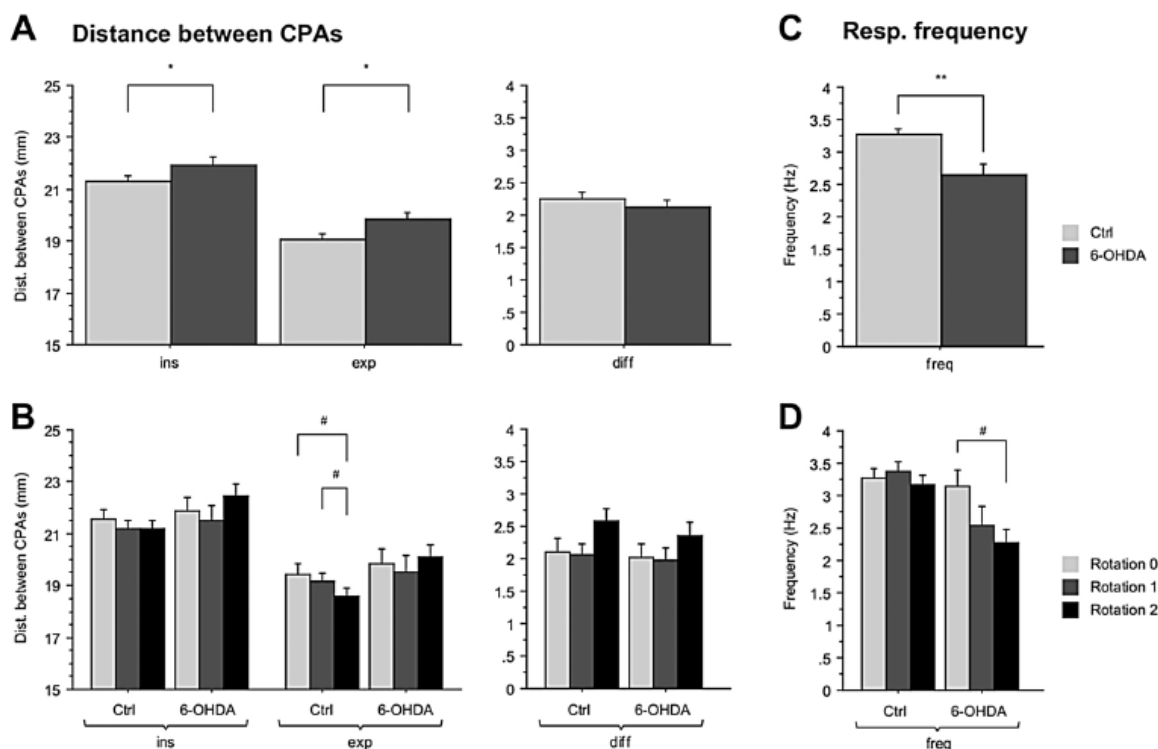


Figura 10. Alterações na distância entre os CPAs (ângulos costofrênicos) e na frequência respiratória durante a respiração. (A) A distância entre os CPAs direito e esquerdo foi significativamente maior em camundongos 6-OHDA, tanto na inspiração máxima (ins) quanto na expiração máxima (exp), mas não na excursão total (diff). (B) A distância entre CPAs diminuiu significativamente após o desafio de estresse na expiração máxima apenas no grupo controle. Fases do desafio de estresse são indicadas como antes do desafio de estresse (Rotação 0), após a primeira rotação (Rotação 1) e após a segunda rotação (Rotação 2). (C) A frequência respiratória em camundongos 6-OHDA foi significativamente reduzida em comparação aos controles. (D) Após o estresse a frequência respiratória diminuiu apenas em camundongos 6-OHDA. O asterisco indica $p < 0,05$ no teste U de Mann-Whitney. O glyph de hash indica $p \leq 0,01$ no teste de classificação de sinais de Wilcoxon.

Os ângulos costofrênicos (CPA) no lado direito não foram significativamente diferentes entre os grupos em qualquer inspiração máxima ($51,51 \pm 0,41^\circ$ e $52,93 \pm 0,70^\circ$) ou expiração máxima ($44,60 \pm 0,42^\circ$ e $45,00 \pm 0,66^\circ$) (Fig. 11A). A diferença angular de inspiração máxima a expiração máxima na CPA direita foi $6,90 \pm 0,43^\circ$ em camundongos 6-OHDA e $7,93 \pm 0,63^\circ$ em controles. O CPA no lado direito não foi alterado significativamente pela estimulação do estresse, como em comparação com os valores basais (Fig. 11B). Resultados semelhantes foram encontrados para CPA esquerda em relação às diferenças totais entre os grupos (Fig. 11C) ou diferenças entre a linha de base e após a estimulação do estresse (Fig. 11D).

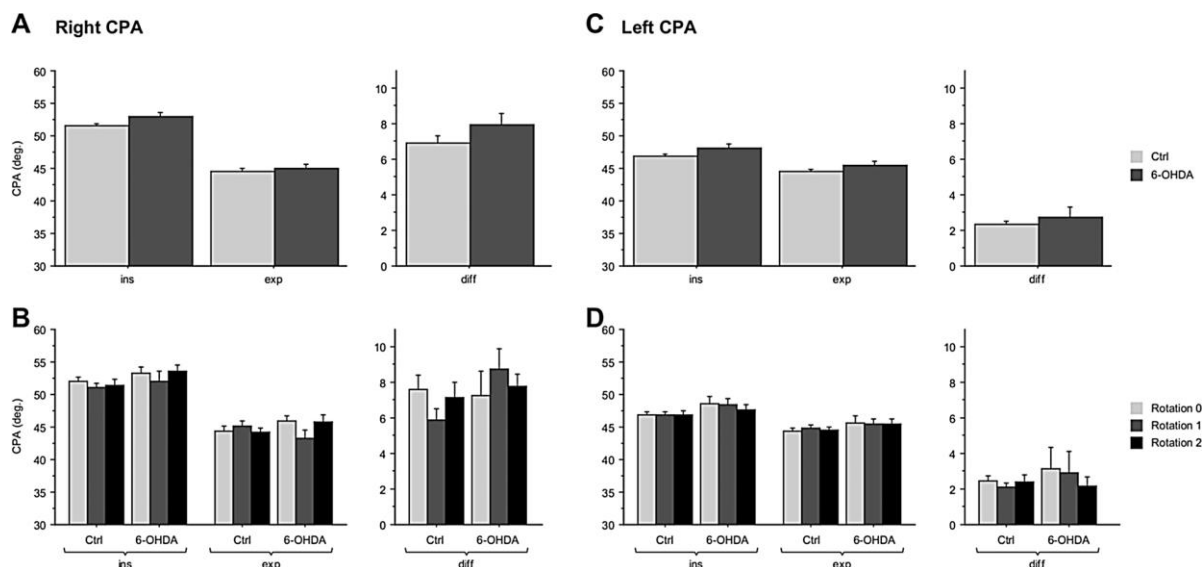


Figura 11. Movimentos dos CPAs durante a respiração. (A) A CPA direita foi semelhante entre os camundongos 6-OHDA e controle durante a expiração e a inspiração. O movimento total calculado como a diferença entre expiração máxima e inspiração máxima foi igualmente similar entre os grupos. (B) O desafio do estresse não causou nenhuma mudança significativa em qualquer um dos grupos. (C) O CPA esquerdo não mostrou diferença entre os grupos. (D) O CPA esquerdo permaneceu inalterado após o desafio de estresse. O CPA teve movimentos de menor amplitude no lado esquerdo em comparação com o lado direito por causa da diferença anatômica normal (posição do coração).

A altura da cúpula diafragmática direita na inspiração máxima foi maior nos camundongos 6-OHDA do que nos controles ($2,45 \pm 0,05$ mm e $2,12 \pm 0,06$ mm, respectivamente) ($p < 0,01$). Uma cúpula superior indica mobilidade reduzida do diafragma. A altura da cúpula direita na expiração máxima foi semelhante entre os grupos: $3,74 \pm 0,12$ mm em camundongos 6-OHDA e $3,77 \pm 0,08$ mm em animais controle (Fig. 12A). Do lado direito, o total excursão do diafragma (diferença na altura da cúpula entre a inspiração e expiração máxima) foi menor em camundongos 6-OHDA do que nos controles ($1,28 \pm 0,09$ mm e $1,65 \pm 0,05$ mm, respectivamente) ($p < 0,01$). A estimulação de estresse não alterou a altura nem a excursão da cúpula diafragmática direita no grupo 6-OHDA ou no grupo controle quando comparado aos valores basais (antes das rotações) (Fig. 12B).

A altura da cúpula esquerda mostrou resultados semelhantes ao lado direito. Na inspiração máxima, os valores foram $1,72 \pm 0,04$ mm em camundongos 6-OHDA e $1,46 \pm 0,04$ mm no controle ($p < 0,01$). Na expiração máxima, os valores foram $2,12 \pm 0,06$ mm em camundongos 6-OHDA e $2,04 \pm 0,05$ mm no grupo controle (diferença não significativa) (Fig. 12C).

A excursão total do diafragma no lado esquerdo foi diferente entre os grupos: $0,39 \pm 0,04$ mm 6-OHDA e $0,57 \pm 0,03$ mm em animais controle

($p < 0,01$). Como no lado direito, a estimulação do estresse não alterou a altura da cúpula nem a excursão da cúpula diafragmática (Fig. 12D) em camundongos 6-OHDA ou controle, em comparação aos valores basais.

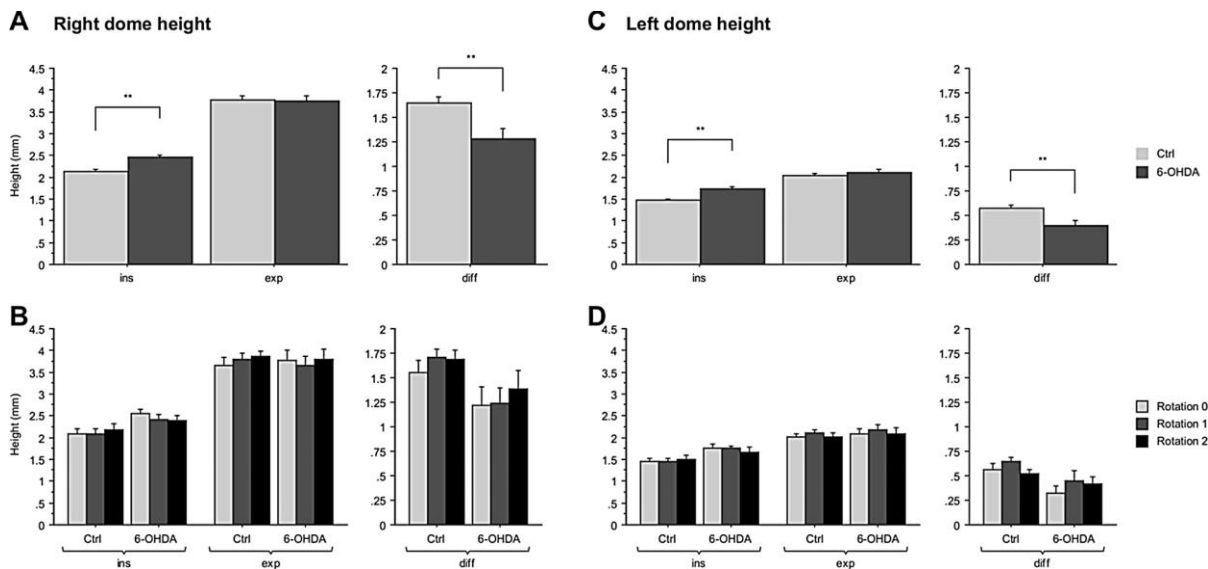


Figura 12. Movimentos da cúpula diafragmática durante a respiração. (A – C) Nos lados direito e esquerdo, a altura da cúpula diafragmática mostrou diferenças significativas entre 6-OHDA e grupos controle. A altura foi mais alta em camundongos 6-OHDA durante a inspiração máxima, indicando contração reduzida do diafragma. A diferença entre as posições de inspiração máxima e expiração máxima indicam amplitude reduzida de movimentos do diafragma. (B – D) O desafio de estresse não causou nenhuma mudança na altura da cúpula diafragmática em nenhum grupo.

2.6 DISCUSSÃO

Neste estudo, medimos os movimentos respiratórios através da cineradiografia em um modelo animal de DP em estágio tardio. Observamos que a amplitude e a frequência dos movimentos do diafragma foram reduzidos nos animais que tiveram a neurotoxina injetada em comparação com camundongos controle. Este resultado pode ser explicado por uma fraqueza do músculo diafragma ou por limitação mecânica dos pulmões, ou uma combinação dos dois. Como tal, os animais em nosso modelo de DP tardia mostraram sinais de disfunção respiratória do tipo obstrutiva. Os animais experimentais e de controle responderam ao desafio de estresse de maneiras marcadamente diferentes, sugerindo uma interação importante entre o sistema dopaminérgico e os mecanismos induzidos pelo estresse nos animais experimentais.

Utilizamos um modelo animal de DP produzido pela injeção unilateralmente da neurotoxina 6-OHDA no estriado. A neurotoxina é tomada por terminais de dopamina ao redor do local da injeção, causando degeneração desses neurônios ao longo de duas a três semanas. A extensão da lesão pode ser estimada pelo desempenho dos animais em testes comportamentais de preferência / negligência lateral, mobilidade geral, e coordenação motora (110,111,112). Neste estudo, o desempenho de camundongos 6-OHDA nos testes de rotação e apomorfina indicaram uma lesão dopaminérgica unilateral com perda neuronal maior que 80% (112). Este nível de degeneração é observada em pacientes de 4 a 5 anos ou mais após o diagnóstico de DP (113), consistente com estágios avançados da doença.

Nos pacientes, a DP é conhecida por causar disfunções respiratórias de ambos os tipos restritivos e obstrutivos, dependendo do grau do distúrbio motor, esquelético e posturais (42). Disfunções obstrutivas são caracterizadas pela redução do valor de pressão expiratória máxima, baixos fluxos expiratórios e aumento do volume residual, resultantes do enfraquecimento dos músculos respiratórios que acompanham a DP (43,114). Disfunções obstrutivas são encontradas em pacientes com DP com maior grau de rigidez e maior grau de bradicinesia (42) e, portanto, pode indicar agravamento da doença.

Independentemente da gravidade da doença, a maioria dos estudos relata em pacientes com DP diminuição na capacidade de expansão e mobilidade do tórax e diminuição da força muscular respiratória (65,115,116,117), mas as alterações na função diafragmática são menos comuns. Um estudo que avaliou cirtometria em pacientes com DP encontrou redução acentuada da complacência da parede torácica, mas novamente sem alterações em relação à força muscular ou à mobilidade diafragmática (56). No presente estudo, encontramos CPA e distância entre CPAs relativamente inalterada e reduzida mobilidade diafragmática em camundongos injetados com 6-OHDA quando comparado aos controles. Esses achados mostram que os animais experimentais desenvolveram um padrão respiratório muito mais torácico do que abdominal, sugerindo o uso de músculos acessórios da respiração para compensar a perda de mobilidade diafragmática.

Esta tendência de compensar a obstrução das vias aéreas utilizando-se a respiração torácica é visto no modelo experimental de Tauopatía (118); um

modelo que engloba doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer. Em nosso estudo anterior (106), observamos em um modelo de DP inicial que os animais experimentais tinham uma CPA reduzida sem alterações na mobilidade diafragmática, caracterizando um tipo restritivo de disfunção respiratória. Portanto, é plausível que essa mudança de disfunção respiratória restritiva para obstrutiva reflète o grau de degeneração nigroestriatal, pelo menos neste modelo animal de DP.

Estudos em animais demonstraram que neurônios dopaminérgicos no tronco cerebral ajudam a regular os centros de controle respiratório durante hipóxia e hipercapnia (119,120), e tanto a super-expressão como a sub-expressão de neurônios dopaminérgicos e receptores de dopamina podem levar a distúrbios no controle de respiração. Camundongos deficientes em Nurr-1, um fator de transcrição necessário para o desenvolvimento de neurônios dopaminérgicos em regiões do tronco cerebral exibem um padrão de respiração irregular com pausas e apnéias e não aumentam a respiração durante a hipóxia (121). Por outro lado, animais que não possuem a proteína transportadora DA, e são, portanto, hiper-dopaminérgicos, também apresentam diminuição da frequência respiratória durante a normóxia e volume corrente normal durante hipóxia (122).

Apesar dos complexos controles modulatórios mediados pela dopamina, receptores D1 têm efeito excitatório (119,123,124) e D2 / D4 têm efeito inibidor sobre a excitabilidade dos neurônios respiratórios, o efeito D1 (excitatório) parece ser dominante (120). Em uma condição de deficiência de dopamina, como no caso da DP, são esperados uma redução da função e uma resposta reduzida do sistema respiratório.

Neste estudo, os animais que receberam injeção de 6-OHDA mostraram sinais de disfunção respiratória do tipo obstrutiva. A atividade dos motoneurônios hipoglossais é um dos principais mecanismos responsáveis pela manutenção da patência das vias aéreas durante a preparação para a inspiração (125,126). Esta atividade é impulsionada por pré-motoneurônios dentro núcleo pontino Kolliker-Fuse (KF) (125), que enviam projeções através do feixe do prosencéfalo medial até o estriado (127). Portanto, é possível que a degeneração nigroestriatal, que é típica da DP e mimetizada no modelo

experimental 6-OHDA, pode prejudicar a atividade dos neurônios no KF e, assim, causar sintomas respiratórios obstrutivos (128,129).

Da mesma forma, em um modelo para Tauopatia, no camundongo transgênico Tau-P301L, a doença parece ocorrer particularmente dentro do KF, e da mesma forma, o fenótipo mostrou disfunção laríngea, resultando em distúrbio no controle das vias aéreas durante o ciclo respiratório (118,130).

A DP é bem conhecida por causar disfunções respiratórias, mas ao mesmo tempo essas disfunções tendem a ser mascaradas pela bradicinesia e pelo sedentarismo nos pacientes (131). Por outro lado, fortes mecanismos compensatórios parecem permitir uma normal função respiratória na DP em estágios iniciais da doença, incluindo a capacidade para exercícios aeróbicos regulares (65,43). No entanto, pacientes com DP podem desenvolver disfunção autonômica cardiovascular, particularmente nos estágios tardios / avançados da doença (132), o que poderia impor limitações à fisioterapia e ao treinamento físico. Neste estudo testamos o efeito de um estressor leve (rotação concêntrica da gaiola de teste) nos movimentos respiratórios de nossos animais; como resultado, os camundongos 6-OHDA responderam com uma queda inesperada de cerca de 28% na frequência respiratória. A ativação do receptor D1 previne a depressão no consumo de opióides nos centros de controle respiratório bulbar (119), a diminuição da frequência respiratória pode ter sido causada, pelo menos em parte, por opióides endógenos liberados em resposta à exposição aguda ao estresse.

Camundongos do grupo controle não mostraram nenhuma alteração na frequência respiratória, mas apresentaram uma pequena, mas significativa diminuição na distância entre CPA na expiração, o que indica uma expiração ligeiramente mais vigorosa depois do estresse. Este efeito não foi observado em camundongos 6-OHDA, indicando ou uma menor responsividade respiratória dirigida autonomicamente ao estresse ou um padrão respiratório já predominantemente torácico em repouso.

2.7 LIMITAÇÕES

Como em outros modelos animais, o modelo usado neste estudo reproduz apenas parte da complexa síndrome humana chamada Doença de

Parkinson (133). Nosso modelo simula a degeneração nigroestriatal que causa a maioria dos sintomas motores que caracterizam a DP, e o grau de degeneração nigroestriatal causada pela injeção de neurotoxina está intimamente associada com a gravidade dos sintomas motores em animais experimentais (110,112).

Da mesma forma, a gravidade dos sintomas motores tem sido associada com a progressão da DP em pacientes humanos (32). No entanto, características da DP relacionadas com a degeneração em outras partes do cérebro, como de fato é o caso com a DP tardia (113, 134), pode não ter sido reproduzido no presente modelo. Além disso, deve-se notar que, embora os camundongos C57BL / 6J estejam propensos à apnéias (109), devido a limitações técnicas, os períodos de apnéia foram excluídos neste estudo. Mais estudos são necessários para abordar a questão específica da apnéia na DP.

2.8 CONCLUSÃO

A degeneração nigrostriatal causada pela injeção de 6-OHDA no estriado produziu alterações nos movimentos respiratórios sugestivos de distúrbio respiratório do tipo obstrutivo. A diminuição da mobilidade diafragmática com respiração torácica compensatória pode ser uma característica encontrada na DP em estágios mais avançados da doença. O estresse agudo induziu uma diminuição inesperada na frequência respiratória que pode estar relacionada à responsividade autonômica bem como a liberação de opióides endógenos.

Os potenciais benefícios do treinamento muscular respiratório devem superar os riscos a curto prazo do estresse em pacientes com DP avançada.

3 ESTUDO 2 - MANUSCRITO

O envelhecimento das populações é um fenômeno crescente em todo o mundo. Relatórios da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que a expectativa de vida tem aumentado numa proporção inferior ao do período de vida saudável. Ou seja, embora as pessoas idosas estejam ficando mais numerosas, os idosos de hoje não são claramente mais saudáveis em comparação ao que seus pais foram. Ainda segundo a OMS, doenças

respiratórias estão entre as principais causas de incapacidade em pessoas com idade acima de 60 anos (75). Portanto, mais estudos são necessários para um melhor entendimento das alterações fisiológicas causadas pelo envelhecimento, e de como esses processos podem ser retardados ou remediados. O processo de envelhecimento, ou senescência, produz uma série de alterações fisiológicas que afetam o sistema respiratório. Dentre essas alterações, nós podemos destacar: 1) a responsividade autonômica ao estresse, por determinar a adaptabilidade do indivíduo ao esforço físico e psicológico, e a demandas ambientais como o frio e o calor; e 2) a sensibilidade e magnitude do reflexo de tosse, por determinar a vulnerabilidade do sistema respiratório a substâncias nocivas, infecções e engasgamento (119).

Os efeitos do envelhecimento no sistema respiratório são muitos, diversos, complexos e muitas vezes interativos. Existe uma variabilidade considerável o que pode ser definido como função respiratória normal em idosos, e às vezes pode ser difícil distingui-lo das comorbidades relacionada à idade (85).

3.1 HIPÓTESE

A hipótese deste estudo seria que o envelhecimento causaria um enrijecimento e fraqueza da caixa torácica e dos músculos respiratórios, aumentaria o trabalho elástico da parede torácica o que causaria uma menor mobilidade do compartimento tóraco-abdominal nos animais mais velhos, e isso coexistiria com pulmões mais complacentes. Como resultado teríamos uma menor mobilidade da caixa torácica, do diafragma e dos ângulos dos seios costofrênicos.

3.2 OBJETIVO:

Estudar possíveis alterações na função respiratória de micos idosos (i.e., aqueles com idade superior a 10 anos) em comparação com sujeitos adultos jovens (com idades entre 1 e 3 anos).

Para tanto, utilizamos métodos minimamente invasivos, como a técnica de cineradiografia desenvolvida por nosso grupo (106,107), que permite o estudo

detalhado da mecânica respiratória, batimentos cardíacos, e alterações posturais e esqueléticas em diferentes animais.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Associar os parâmetros de função respiratória à senescência;
- Testar e analisar os aspectos anatômicos e fisiológicos que marcam a mobilidade diafragmática durante a ventilação;
- Avaliar a influência da senescência nas funções diafragmáticas durante a ventilação;
- Analisar, radiologicamente, parâmetros de mobilidade do diafragma e da mobilidade torácica em sujeitos idosos e jovens;

3.4 MATERIAL E MÉTODOS:

3.4.1 Animais:

Micos sadios com idade superior a 10 anos foram selecionados para este estudo (n = 14). Um grupo correspondente de adultos jovens (grupo controle, idades entre 1 e 3 anos, n = 2) foi usado para comparação de resultados. Os animais selecionados foram transferidos para um viveiro temporário num laboratório situado no mesmo complexo onde se encontram os viveiros permanentes. Realizamos primeiramente exames físicos e registros morfométricos, como peso, temperatura retal, comprimento do corpo, comprimento das pernas acima e abaixo do joelho, circunferência abdominal, e circunferências proximal, medial e distal de coxa e panturrilha, conforme descrito em estudo anterior (103). Em seguida, coletamos amostras de saliva por mastigação estimulada de cotonete (Fig. 13). As amostras foram acondicionadas em tubos Eppendorf e armazenadas a -80 graus C para análise bioquímica posterior. A dosagem de cortisol salivar será usada como uma variável de responsividade ao estresse de manipulação (etapa ainda em andamento).



Figura 13. Coleta de amostras de saliva dos animais

Os procedimentos descritos estão de acordo com as recomendações da “Tokyo Medical and Dental University” para o bem-estar e utilização adequada de animais em pesquisa, e tiveram anuência prévia do seu comitê institucional de ética em pesquisa animal.

Toda a coleta de dados foi realizada na companhia Clea Japan, no Japão. A análise dos vídeos foi realizada na Universidade de Brasília.

3.4.2 Registro Cinerradiográficos:

Foram medidas a frequência respiratória, excursão diafragmática, amplitude do ângulo costofrênico (CPA), e a distância entre os ângulos costofrênicos (CPAs) durante uma respiração tranquila, de maneira semelhante à descrita anteriormente (106).

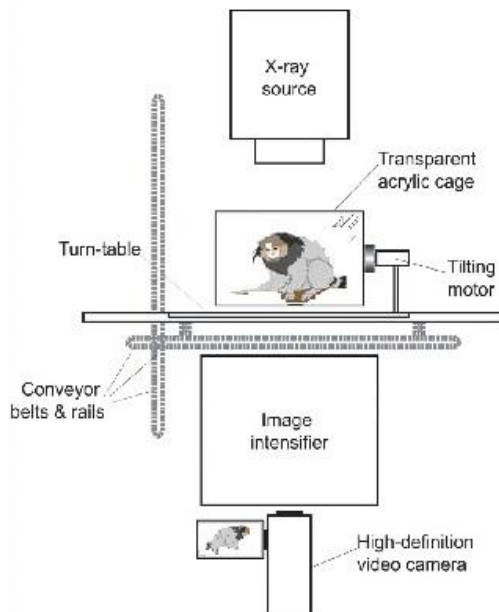


Figura 14. Esquema do aparelho de cineradiografia. Uma vista lateral mostra a gaiola teste mantendo o animal entre a fonte de raios X e o intensificador de imagem. A gaiola de teste pode ser movida por motores nas três dimensões, girada e inclinada para posicionamento do animal, mesmo quando ele se move na gaiola. Imagens de raios-X foram capturadas em tempo real por uma câmera de vídeo de alta definição.

Os registros cinerradiográficos foram repetidos uma vez/dia, por 3 dias consecutivos. Para cada registro, os sujeitos foram capturados um de cada vez, colocados numa caixa transporte e levados até uma sala de experimento. O animal foi transferido para o aparato de raio-X “dual-beam microfocus” e filmado durante 5 minutos (Fig. 14). Ao final de cada sessão o sujeito foi levado de volta ao seu viveiro temporário (via caixa-transporte).



Figura 15. Caixa acrílica colocada dentro aparato de raio-x para filmagem do animal com rede plástica internamente para conter os movimentos do animal e mantê-lo em posição vertical durante os 5 minutos de filmagem.

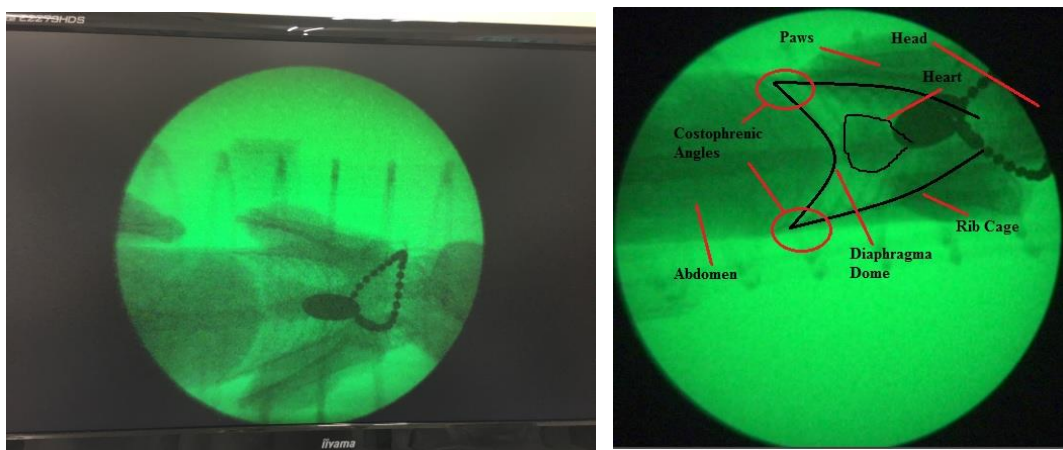


Figura 16. A) imagem radiográfica de alta velocidade visualizada através do programa KINOVEA. B) visualização das estruturas aparentes na imagem radiográfica

A medida da frequência respiratória foi derivada do número de quadros entre a inspiração máxima e a próxima expiração máxima. A altura direita e esquerda da cúpula diafragmática foi medida perpendicularmente entre a linha imaginária conectando o CPA direito e esquerdo e o ponto mais alto a cúpula. A excursão diafragmática foi medida como a diferença a altura da cúpula diafragmática entre a expiração máxima e inspiração máxima. O ângulo costofrênico é formado entre perfil do diafragma e da borda da parede torácica, o CPA direito e esquerdo foram medidos durante uma expiração máxima e inspiração máxima nos lados direito e esquerdo do corpo. A variação angular foi obtida subtraindo a medida na inspiração máxima pela expiração máxima e isso reflete a mobilidade do todo tórax-abdome. A distância entre os ângulos costofrênicos foi medida durante uma expiração máxima e inspiração máxima e reflete a mobilidade do tórax. O software Kinovea (<http://www.kinovea.org/>) foi usado para exibição quadro a quadro e medição de imagens de vídeo.

Todos os procedimentos realizados nos micos foram minimamente invasivos e de efeito transitório e rápido. Ao final de todos os experimentos, os sujeitos foram devolvidos à companhia Clea Japan, e retornados aos seus viveiros de moradia.

3.4.3 Análise estatística

As diferenças de grupo entre os animais do grupo idoso e controle foram comparados pelo teste U de Mann-Whitney (não-paramétrico não-pareado), onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3.5 RESULTADOS

Parâmetros de função ventilatória foram mensurados em três respirações consecutivas para cada um dos três dias de avaliação, resultando em nove mensurações de cada variável para cada animal experimental e foram expressados em mediana e intervalo interquartil (IIQ). Dezesesseis micos sadios foram utilizados, 14 com idade de 14.14 ± 3.33 anos (média \pm desvio padrão) compuseram o grupo idoso e 2 com idade média de 2.00 ± 0.0 anos o grupo de micos jovens.

A amplitude do ângulo do seio costofrênico direito durante a inspiração apresentou mediana de 37.335° (IIQ 3.330) no grupo jovem e mediana de 37.330° (IIQ 2.670) no grupo idoso. Durante a expiração a amplitude do ângulo do seio costofrênico direito apresentou mediana de 28.000° (IIQ 3.000) no grupo jovem e mediana de 29.670° (IIQ 2.670) no grupo idoso. A diferença na amplitude do ângulo do seio costofrênico direito entre a inspiração e a expiração (Diff) apresentou mediana de 8.335° (IIQ 1.330) no grupo jovem e mediana de 7.500° (IIQ 2.000) no grupo idoso. Todos os resultados da amplitude do ângulo do seio costofrênico direito não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Fig. 17).

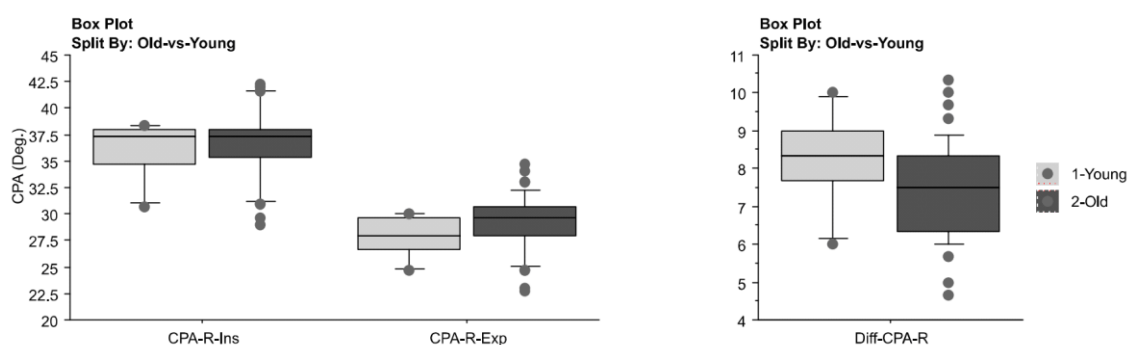


Figura 17. Resultados da CPA direita. Amplitude do ângulo do seio costofrênico direito foi semelhante em ambos os grupos etários na inspiração (Ins) e na expiração (Exp), assim como a diferença na amplitude desse ângulo entre inspiração e expiração (Diff).

A amplitude do ângulo do seio costofrênico esquerdo durante a inspiração apresentou mediana de 36.670° (IIQ 1.340) no grupo jovem e mediana de 37.330° (IIQ 3.340) no grupo idoso. Durante a expiração a amplitude do ângulo do seio costofrênico esquerdo apresentou mediana de 28.830° (IIQ 2.340) no

grupo jovem e mediana de 30.165° (IIQ 4.000) no grupo idoso. A diferença na amplitude do ângulo do seio costofrênico esquerdo entre a inspiração e a expiração (Diff) apresentou mediana de 7.835° (IIQ 0.330) no grupo jovem e mediana de 7.330° (IIQ 2.670) no grupo idoso. Todos os resultados da amplitude do ângulo do seio costofrênico esquerdo não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Fig. 18).

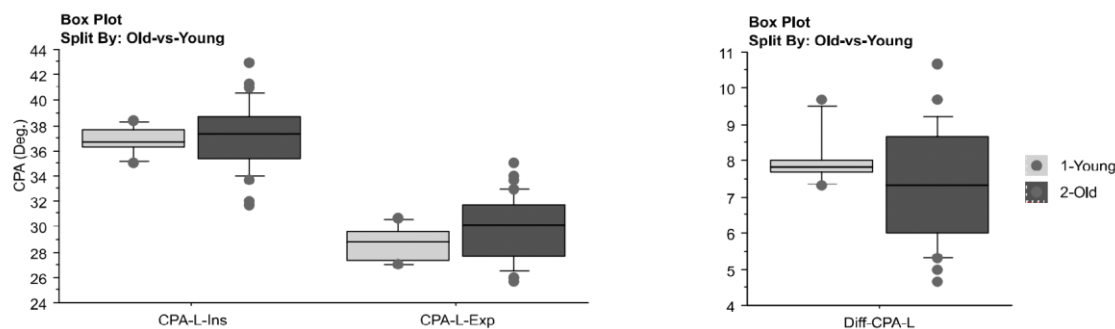


Figura 18. Resultados da CPA esquerda. Amplitude do ângulo do seio costofrênico esquerdo foi semelhante em ambos os grupos etários na inspiração (Ins) e na expiração (Exp), assim como a diferença na amplitude desse ângulo entre inspiração e expiração (Diff).

A distância entre os seios costofrênicos, i.e., a amplitude transversal da caixa torácica, durante a inspiração apresentou mediana de 37.820 mm (IIQ 2.800) no grupo jovem e mediana de 38.265 mm (IIQ 5.890) no grupo idoso. Durante a expiração a distância entre os seios costofrênicos apresentou mediana de 33.895 mm (IIQ 1.270) no grupo jovem e mediana de 35.380 mm (IIQ 4.890) no grupo idoso. A diferença na distância entre os seios costofrênicos entre a inspiração e a expiração (Diff) apresentou mediana de 3.630 mm (IIQ 1.030) no grupo jovem e mediana de 3.025 mm (IIQ 0.970) no grupo idoso. Todos os resultados da distância entre os seios costofrênicos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Fig. 19).

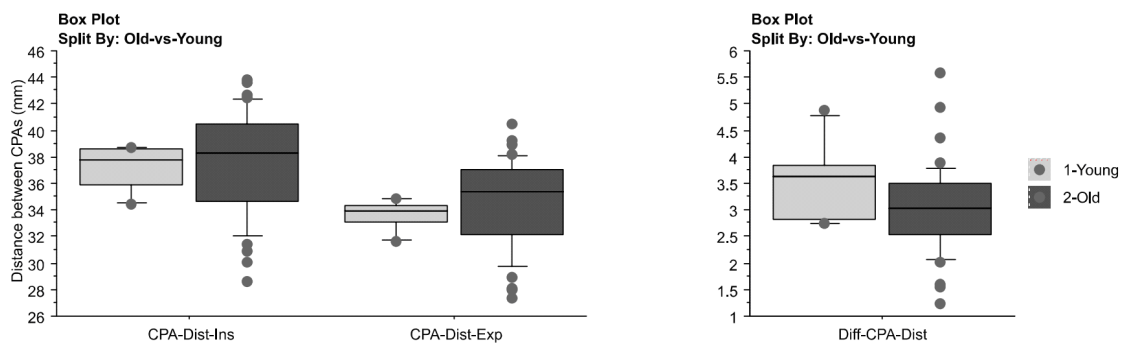


Figura 19. Resultados da distância entre os seios costofrênicos. A amplitude transversal da caixa torácica foi semelhante tanto em indivíduos idosos quanto jovens.

A altura da cúpula diafragmática durante a inspiração apresentou mediana de 16.345 mm (IIQ 2.070) no grupo jovem e mediana de 14.200 mm (IIQ 3.430) no grupo idoso. Durante a expiração a altura da cúpula diafragmática apresentou mediana de 19.855 mm (IIQ 1.760) no grupo jovem e mediana de 16.785 mm (IIQ 3.850) no grupo idoso. A diferença na altura da cúpula diafragmática entre a inspiração e a expiração (Diff) apresentou mediana de 3.495 mm (IIQ 0.780) no grupo jovem e mediana de 2.670 mm (IIQ 0.760) no grupo idoso. Todos os resultados encontrados para a altura da cúpula diafragmática foram estatisticamente significativos, com indivíduos jovens mostrando altura do diafragma maior que os idosos tanto na inspiração quanto na expiração, e também na diferença entre a inspiração e expiração (Fig. 20).

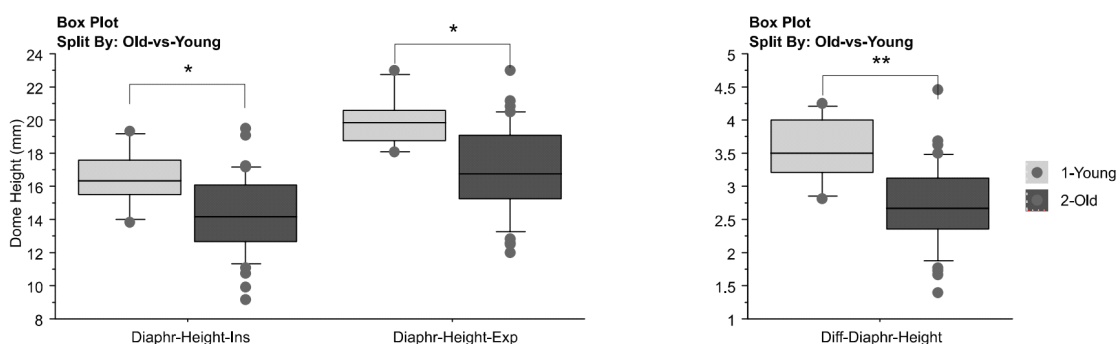


Figura 20. Resultados do deslocamento diafragmático. Diferenças significativas foram encontradas na altura da cúpula diafragmática, com indivíduos jovens mostrando altura maior que os idosos tanto na inspiração quanto na expiração. A diferença na altura da cúpula diafragmática entre inspiração e expiração também foi significativamente maior em indivíduos jovens quando comparados a idosos.

A frequência respiratória medida em bpm (respirações por minuto) apresentou mediana de 57.855 (IIQ 21.680) no grupo jovem e mediana de

61.710 (IIQ 13.500) no grupo idoso não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Fig. 21).

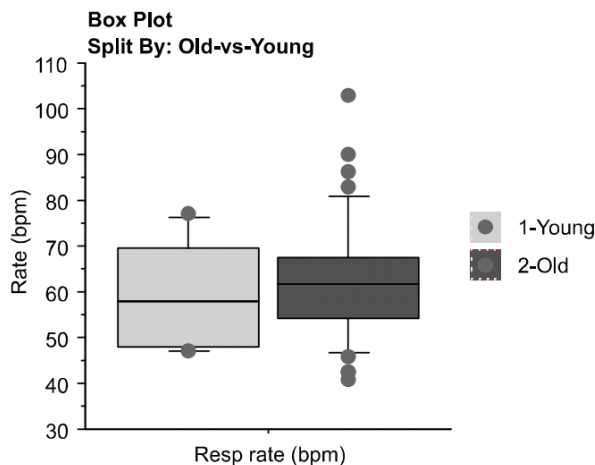


Figura 21. Resultados da FR. A frequência respiratória, medida em respirações por minuto (bpm, breaths per minute) mostrou-se semelhante entre grupos.

3.6 DISCUSSÃO

O sistema respiratório humano está constantemente sendo exposto a uma variedade de poluentes. Por isso torna-se muito difícil diferenciar nos estudos em humanos o que é realmente impacto do envelhecimento normal e o que é consequência da exposição à poluentes. Fumaça de tabaco no ambiente e partículas de poluição têm efeitos mensuráveis e bem documentados sobre os sintomas respiratórios e doenças respiratória nos idosos (85). Há também em humanos que se considerar efeitos genéticos e habituais/ocupacionais, os quais podem precipitar alterações de longo prazo no sistema respiratório porém sem relação direta com o processo de envelhecimento (83).

Em nosso estudo, medimos os movimentos respiratórios através da cinerradiografia em micos saudáveis idosos e jovens. Todos os animais foram nascidos e criados em cativeiro, mantidos em ambiente fechado e limpo, com iluminação, temperatura e umidade controladas, ciclos claro/escuro regulares, alimentados regularmente sem restrição e com ração específica para a espécie.

Nós encontramos que a distância entre os seios costofrênicos, medida da amplitude transversal da caixa torácica, que reflete a mobilidade da caixa torácica, não apresentou diferença significativa em seus valores entre os grupos estudados. A diminuição da complacência com o passar dos anos está relacionada às calcificações das cartilagens costais, das junções costochondrais e doença degenerativa das articulações da coluna dorsal. Diversos estudos relatam resultados significativos de diminuição da complacência torácica através da avaliação da pressão transpulmonar, evidenciando que sujeitos com uma menor complacência pulmonar apresentam um maior volume residual, sugerindo como impedimento para completar o esvaziamento dos pulmões uma parede torácica rígida (135,136). Além disso, a redução da capacidade vital forçada (CVF) também se mostra alterada, refletindo alterações na expansibilidade torácica, já que este é um índice da capacidade de distensão do sistema toracopulmonar e, também, resultado da força muscular respiratória (78).

Os valores de amplitude dos seios costofrênicos direito e esquerdo, durante a inspiração e expiração, que também refletem a movimentação do compartimento toracoabdominal, não apresentaram valores estatisticamente significativos entre os grupos estudados em nosso estudo. Xie et al. (137) avaliou a radiografia torácica de Macacos *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*), avaliando se a idade e sexo podem afetar os parâmetros da radiografia torácica desta espécie e encontraram que não houve diferenças estatisticamente significativas associadas ao sexo nem à idade observadas em relação aos ângulos costofrênicos bilaterais. Além de demonstrar que o uso de parâmetros radiográficos torácicos em primatas podem ser úteis na prática veterinária e na investigação envolvendo modelos de primatas não humanos de distúrbios respiratórios ou cardiovasculares.

Podemos hipotetizar que o grupo idoso apresentou diminuição da mobilidade da caixa torácica, mas a perda de força não foi suficiente para evitar a compensação do distúrbio de mobilidade torácica, ou que o grupo idoso possa ter desenvolvido uma estratégia compensatória, que compensou com sucesso o distúrbio, embora tenham diminuído força muscular respiratória e mobilidade torácica.

Os valores de altura diafragmática e diferença na amplitude diafragmática em nosso estudo apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados. Em idosos é comum encontrar uma diminuição significativa na força muscular do diafragma (138,139). E esta perda de força reflete em uma menor capacidade de gerar uma força expulsiva desobstrutiva maior para manter a permeabilidade das vias aéreas (89).

Explicação provável para redução da força diafragmática com a idade está relacionada à atrofia muscular com o avançar da idade e a diminuição das fibras de contração rápida, responsáveis por gerar tensões de pico mais altas. Este declínio da força diafragmática relacionado à idade pode predispor indivíduos mais velhos à fadiga diafragmática e insuficiência ventilatória, com aumento da carga ventilatória no sistema respiratório (22).

Outro fator responsável pela diminuição da força do diafragma é a presença de sarcopenia. Os dois principais componentes da sarcopenia já foram investigados no músculo diafragma: a força geradora de força do músculo diafragma e a área transversal específica do tipo das fibras musculares desse músculo. A capacidade de geração de força (isto é, força específica máxima) é menor com perda de força significativa, o que acaba por impactar a capacidade de realizar comportamentos não ventilatórios relacionados à desobstrução das vias aéreas (140,141). Além disso, há perda do tamanho das fibras musculares das fibras musculares do tipo IIx e / ou IIb, mas não das fibras musculares diafragmáticas tipo I e IIa (142). Espera-se que esta extensão da sarcopenia prejudique significativamente a capacidade do músculo diafragma de realizar uma ampla gama de comportamentos na velhice e limite a capacidade de manter as vias aéreas limpas o que pode contribuir para as complicações respiratórias.

Estudos que avaliaram a dinâmica toracoabdominal observaram um predomínio do compartimento abdominal em adultos idosos em condições basais na posição supina (143,144). Assim como uma maior movimentação do compartimento abdominal do que da caixa torácica entre adultos jovens e idosos (85). Esses resultados podem ter ocorrido já que alterações na complacência da caixa torácica tendem para uma maior contribuição para a respiração com uso do diafragma e músculos abdominais e uma contribuição menor dos músculos torácicos. Essas observações ajudam a confirmar a ação

fisiológica do diafragma e músculos abdominais como principais músculos inspiratórios e expiratórios e explicaria os resultados encontrados em nosso estudo, com alteração maior na mobilidade do diafragma em relação à caixa torácica. Nos pulmões senis, como já comentado anteriormente, ocorre uma diminuição no número de fibras elásticas, no recuo elástico dos pulmões que tendem a levar o pulmão a um aprisionamento aéreo progressivo que causa aumento da complacência do parênquima pulmonar (85). Como resultado temos uma dilatação do espaço aéreo, uma redução nos volumes expirados aumento do volume residual e da complacência pulmonar (87), caracterizando um padrão obstrutivo de alteração pulmonar, comumente encontrado em indivíduos idosos.

Além disso, a maioria dos músculos abdominais se insere nas costelas e a caixa torácica inferior faz parte da parede abdominal em sua zona de aposição. Portanto, as propriedades elásticas dos dois compartimentos da parede torácica podem depender um do outro, de tal forma que o enrijecimento do gradil costal seria capaz de causar uma aparente diminuição na complacência abdominal e mobilidade diafragmática.

A frequência respiratória, em nosso estudo, não apresentou alterações significativas entre os grupos estudados. Normalmente idosos durante um padrão ventilatório normal respiram com um volume minuto similar à de indivíduos jovens, porém com um volume corrente menor e uma frequência respiratória levemente maior. Estudos que avaliaram diversos parâmetros respiratórios em adultos jovens e idosos também não encontram diferença significativa nos valores de FR (143,145,146). Mesmo estudos que compararam grupos idosos com grupos de indivíduos mais idosos (acima de 75 anos) apresentaram resultados semelhantes ao nosso estudo (85).

Apesar da limitação relacionada ao pequeno tamanho da amostra, os resultados do presente estudo podem contribuir para melhorar o conhecimento sobre o padrão respiratório de adultos e idosos avaliados em condições normais.

3.7 CONCLUSÃO

Diferenças discretas no movimento toracoabdominal foram encontrados entre os animais adultos jovens e idosos, sendo o movimento diafragmático mais afetado que o movimento torácico, sugerindo que o envelhecimento no sistema respiratório não causou impacto significativo sobre os padrões respiratórios da amostra. Por outro lado, os resultados atuais mostram que o processo de envelhecimento produz redução significativa da força dos músculos inspiratórios e do movimento toracoabdominal. Estudos com um número maior de sujeitos são necessários para confirmar os efeitos do processo de envelhecimento na função respiratória.

4 REFERÊNCIAS

1. Powers SK, Howley ET. Fisiologia do exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho. São Paulo: Manole; 2000.
2. Souza, LC de. Fisioterapia intensiva. São Paulo: Atheneu; 2009.
3. Maish MS. The diaphragm. Surg Clin North Am, 2010; 90(5):955-68. doi: 10.1016/j.suc.2010.07.005.
4. Scanlan CL, Wilkins RL, Stoller JK. Fundamentos da Terapia Respiratória de Egan. 7ed. São Paulo: Manole; 2000.
5. Kampanji AI. Fisiologia Articular- Esquemas comentados de mecânica humana. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
6. Roberts HC. Imaging the Diaphragm. Thorac Surg Clin, 2009; 19 p.431–450 doi:10.1016/j.thorsurg.2009.08.008.
7. Levitzky MG. Fisiologia Pulmonar. 6ed. São Paulo: Manole, 2004.
8. Azeredo CAC. Fisioterapia Respiratória Moderna. 4ed. São Paulo: Manole; 2002.
9. Nason LK, Walker CM, McNeeley MF, Burivong W, Fligner CL, Godwin JD. Imaging of the diaphragm: anatomy and function. Radiographics, 2012; Mar-Apr;32(2):E51-70. doi: 10.1148/rg.322115127.
10. Carvalho M. Fisioterapia Respiratória: Fundamentos e Contribuições. 5ed. São Paulo: Revinter, 2001.

11. Ashutosh K, Gilbert R, Auchincloss JH Jr, Peppi D. Asynchronous Breathing Movements in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. *Chest*, 1975; May;67(5):553-7. <https://doi.org/10.1378/chest.67.5.553>
12. McCool FD, Tzelepis GE. Dysfunction of the diaphragm. *N Engl J Med*, 2012 Mar 8;366(10):932-42. doi: 10.1056/NEJMra1007236.
13. Harper CJ, Shahgholi L, Cieslak K, Hellyer NJ, Strommen JA, Boon AJ. Variability in Diaphragm Motion During Normal Breathing, Assessed With B-Mode Ultrasound. *J Orthop Sports Phys Ther*, 2013 Dec; 43(12):927–931. doi: 10.2519/jospt.2013.4931
14. Kelley RC, Ferreira LF. Diaphragm abnormalities in heart failure and aging: mechanisms and integration of cardiovascular and respiratory pathophysiology. *Heart Fail Rev.*, 2017 March ; 22(2): 191–207. doi:10.1007/s10741-016-9549-4
15. Pryor JA, Webber BA. *Fisioterapia para Problemas Respiratórios e Cardíacos*. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
16. Scanlan CL, Wilkins RL, Stoller JK. *Fundamentos da Terapia Respiratória de Egan*. 7ed. São Paulo: Manole, 2000.
17. Drake RL, Vogl AW, Mitchell A. *Gray's: Anatomia para estudantes*. 2ed. Churchill-Livingstone: Elsevier, 2010.
18. Kharma, N. Dysfunction of the diaphragm: imaging as a diagnostic tool. *Curr Opin Pulm Med*, 2013 Jul; 19(4):394-98. doi:10.1097/MCP.0b013e3283621b49
19. Tamaki A, Matsuo Y, Yanagihara T, Abe K. Influence of thoracoabdominal movement on pulmonary function in patients with Parkinson's Disease: comparison with healthy subjects. *Neurorehabil Neural Repair*, 2000; 14(1):43-47. <https://doi.org/10.1177/154596830001400105>
20. Schulz GM, Grant MK. Effects of speech therapy and pharmacologic and surgical treatments on voice and speech in Parkinson's disease: a review of the literature. *J Commun Disord*, 2000 Jan-Feb; 33(1):59-88.
21. Normando VMF, Brito MVH, Araújo JR FA, Albuquerque BCM. Repercussões do pneumoperitônio na amplitude da excursão diafragmática em suínos. *J Bras Pneumol*, 2006; 32(1):16-22.
22. Greising SM, Ottenheijm CAC, O'Halloran KD, Barreiro E. Diaphragm plasticity in aging and disease: therapies for muscle weakness go from strength to strength. *J Appl Physiol*, 2018 Aug 1;125(2):243-253. doi:10.1152/jappphysiol.01059.2017.

23. Souza CFM, Almeida HCP, Sousa JB, Costa PH, Silveira YSS, Bezerra JCL. A Doença de Parkinson e o Processo de Envelhecimento Motor: Uma Revisão de Literatura. *Rev Neurocienc*, 2011;19(4):718-723.
24. Massano J. Doença de Parkinson: Atualização Clínica. *Acta Med Port*, 2011; 24(S4): 827-834.
25. Fahn S. Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann NY Acad Sci*, 2003 991:1-14.
26. Pereira D, Garrett C. Factores de risco da doença de Parkinson um estudo epidemiológico. *Acta Med Port*, 2010; 23:15-24.
27. Elbaz A, Bower JH, Maraganore DM, et al. Risk tables for parkinsonism and Parkinson's disease. *J. Clin. Epidemiol*, 2002. 55(1): 25–31.
28. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RAI, Jansen Steur ENH, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging*, 2003. 24, 197–211.
29. Lent R. Cem bilhões de neurônios? Conceitos fundamentais de neurociências. 2 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2010.
30. O'sullivan SB, Schmitz TJ. *Fisioterapia: avaliação e tratamento*. 4 ed. Barueri, SP: Manole, 2004.
31. Teive HAG. Etiopatogenia da doença de Parkinson. *Rev Neurocienc*, 2005;13:201-14.
32. Kalia VL, Lang AE. Parkinson's disease. *Lancet*, 2015. 386, 896–912. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3).
33. Moreira CS, Martins KFC, Neri VC, Araújo PG. Doença de Parkinson: como diagnosticar e tratar. *Revista Científica da FMC*, 2007. Vol. 2, nº 2.
34. Rowland, LP. *Tratado de Neurologia*. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
35. Braga A, Xavier AL, Machado RP. Benefícios do treinamento resistido na reabilitação da marcha e equilíbrio nos portadores da doença de Parkinson. *Revista da Pós-Graduação da Universidade Gama Filho*, 2002. Goiânia.
36. Duthie EH, Katz PR. *Geriatría Prática*. 3 ed. Rio de Janeiro: Ed. Revinter; 2002.
37. Stokes M. *Neurologia para fisioterapeuta*. São Paulo: Premier, 2000.
38. Meireles J, Massano J. Cognitive impairment and dementia in Parkinson's disease: clinical features, diagnosis, and management. *Front Neurol* 2012;3:88.

39. Goulart FRP, Barbosa CM, Silva CM, Teixeira-Salmela L, Cardoso F. O impacto de um programa de atividade física na qualidade de vida de pacientes com doença de Parkinson. *Rev bras Fisioter*, 2005; 9(1):49-55.
40. Nicholson G, Pereira AC, Hall GM. Parkinson's disease and anaesthesia. *Br J Anaesth*, 2002; 89(6):904-916.
41. Mehanna R, Jankovic J. Respiratory problems in neurologic movement disorders. *Park. Relat. Disord.*, 2010; 16, 628–638.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreldis.2010.07.004>.
42. Sabaté M, González I, Ruperez F, Rodríguez M. Obstructive and restrictive pulmonary dysfunctions in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.*, 1996; 138, 114–119. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-510X\(96\)00003-2](http://dx.doi.org/10.1016/0022-510X(96)00003-2).
43. Haas BM, Trew M, Castle PC. Effects of respiratory muscle weakness on daily living function, quality of life, activity levels and exercise capacity in mild to moderate Parkinson's disease. *Austr J Physical Med and Rehab*, 2004; 83(8):601-07.
44. Cardoso SR, Pereira JS. Distúrbio respiratório na doença de Parkinson. *Fisiot Brasil*, 2000; 1(1):23-6.
45. Wang Y, Shao W-b, Gao L, Lu J, Gu H, et al. Abnormal Pulmonary Function and Respiratory Muscle Strength Findings in Chinese Patients with Parkinson's Disease and Multiple System Atrophy – Comparison with Normal Elderly. *PLoS ONE*. 2014; 9(12):116-123.
46. De Bruin PFC, De Bruin VMS, Lees AJ, Pride N. Effects of treatment on airway dynamics and respiratory muscle strength in Parkinson's disease. *Am Rev Resp Disease*, 1993; 148:1576-80.
47. Bogaard JM, Hovestadt A, Meerwaldt JVD. Maximal expiratory and inspiratory flow-volume curves in Parkinson's disease. *Am Rev Resp Disease*, 1989; (139):610-04.
48. Vincken, WG et al. Involvement of upper-airway muscles in extrapyramidal disorders: a cause of airflow limitation. *N Engl J Med*, 1984; 311(7):438-42.
49. Frazão M, Cabral E, Lima I, Resqueti V, Florêncio R, Aliverti A, Fregonezi G. Assessment of the acute effects of different PEP levels on respiratory pattern and operational volumes in patients with Parkinson's disease. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 2014; 198:42–47.
50. De Pandis MF, Starace A, Stefanelli F, et al. Modification of respiratory function parameters in patients with severe Parkinson's disease. *Neurol Sci.*, 2002;23(Suppl 2):S69–S70.

51. Pal PK, Sathyaprabha TN, Tuhina P, Thennarasu K. Pattern of subclinical pulmonary dysfunctions in Parkinson's disease and the effect of levodopa. *Mov Disord.*, 2007;22:420-4.
52. Polatli M, Akyol A, Cildag O, Bayulkem K. Pulmonary function tests in Parkinson's disease. *Eur J Neurol*, 2001. 8:341–345.
53. Brown LK. Respiratory dysfunction in Parkinson's disease. *Clin Chest Med*, 1994; 15:715-727.
54. Shaheen HA, Ali MA, Elzaher MAA. Parkinson's Disease and Pulmonary Dysfunction. *Egypt J. Neurol. Psychiat. Neurosurg.* 2009; 46(1):129-140.
55. Izquierdo-Alonso J, Jiménez-Jiménez F, Cabrera-Valdivia F, Mansilla-Lesmes M. Airway dysfunction in patients with Parkinson's disease. *Lung*, 1994; 172:47-55.
56. Cardoso SR, Pereira JS. Análise da função respiratória na Doença de Parkinson. *Arq Neuropsiquiatr*, 2002; 60(1):91-95.
57. Parreira VF, Guedes LU, Quintão DG, Silveira EP, Tomich GM, Sampaio RF, et al. Padrão respiratório em pacientes portadores da doença de Parkinson e em idosos assintomáticos. *Acta Fisiátrica*, 2003; 10(2):61-66.
58. Sathyaprabha TN, Kapavarapu PK, Pal PK, Thennarasu K, Raju TR. Pulmonary functions in Parkinson's disease. *Indian J Chest Dis Allied Sci*, 2005; 47(4):251-57.
59. Bonjorni LA, Jamami M, Di Lorenzo VAP, Pessoa BV. Influência da doença de Parkinson em capacidade física, função pulmonar e índice de massa magra corporal. *Fisioter Mov.*, 2012 out/dez;25(4):727-36.
60. Mikaelee H, Yazdchi M, Ansarin K, Arami M. Pulmonary Function Tests Abnormalities in Parkinson Disease. *The Internet Journal of Pulmonary Medicine*, 2006 Volume 8 Number 2.
61. Owolabi LF, Nagoda M, Babashani M. Pulmonary function tests in patients with Parkinson's disease: A case-control study. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 2016;19(6): 695-699.
62. Cardoso F, Dabien-Haddad L, Ribeiro A, Camargos S, Amaral S, Sulmonetti N. Função respiratória em doença de Parkinson - Pacientes não expostos a Levodopa. *Arq Neuropsiquiatr*, 1998; 26(Supl I):07.
63. Ferreira FV, Cielo CA, Trevisan ME. Força muscular respiratória, postura corporal, intensidade vocal e tempos máximos de fonação na Doença de Parkinson. *Rev. CEFAC*, 2012 Mar-Abr; 14(2):361-368.

64. Easdown LJ, Tessler MJ, Minuk J. Upper airway involvement in Parkinson's disease resulting in postoperative respiratory failure. *Can J Anaesth*, 1995; 42:344-347.
65. Canning CG, Alison JA, Allen NE, Groeller H. Parkinson's disease: an investigation of exercise capacity, respiratory function, and gait. *Arch Phys Med Rehabil*, 1997; 78(2):199-207.
66. Silverman EP, Sapienza CM, Saleem A, et al. Tutorial on maximum inspiratory and expiratory mouth pressures in individuals with idiopathic Parkinson disease (IPD) and the preliminary results of an expiratory muscle strength training program. *NeuroRehabilitation*, 2006;21:71-79.
67. Petit JM, Delhez L. Electrical activity of the diaphragm in Parkinson's disease. *Arch Int Physiol Biochim*, 1961; 69: 413-17.
68. Estenne M, Hubert M, De Troyer A. Respiratory muscle involvement in Parkinson's disease. *New Eng J Med*, 1984; 311(2):1515-17.
69. Finlay JM, Zigmond MJ. The effects of stress on central dopaminergic neurons: possible clinical implications. *Neurochem Res*, 1997; 22:1387–1394. [PubMed: 9355111].
70. Metz GA, Jadavji NM, Smith LK. Modulation of motor function by stress: a novel concept of the effects of stress and corticosterone on behavior. *Eur J Neurosci*, 2005; 22:1190–1200. [PubMed:16176362].
71. Keefe KA, Stricker EM, Zigmond MJ, Abercrombie ED. Environmental stress increases extracellular dopamine in striatum of 6-hydroxydopamine-treated rats: in vivo microdialysis studies. *Brain Res*, 1990; 527:350–353. [PubMed: 2123730].
72. Hemmerle AM, Herman JP, Seroogya KB. Stress, Depression and Parkinson's Disease *Exp Neurol*, 2012 January; 233(1):79–86. doi:10.1016/j.expneurol.2011.09.035.
73. Smith AD, Castro SL, Zigmond MJ. Stress-induced Parkinson's disease: a working hypothesis. *Physiol Behav*, 2002; 77:527–531. [PubMed: 12526994].
74. Snyder AM, Stricker EM, Zigmond MJ. Stress-induced neurological impairments in an animal model of parkinsonism. *Ann Neurol*, 1985;18:544–51.
75. Smith LK, Nafisa M, Jadavji KL, Colwell S, Katrina Perehudoff and Gerlinde A. Metz. Stress accelerates neural degeneration and exaggerates motor symptoms in a rat model of Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience*, 2008; 27:2133–2146. doi:10.1111/j.1460-568.2008.06177.x
76. Treves TA, Rabey JM, Korczyn AD. Case-control study, with use of temporal approach, for evaluation of risk factors for Parkinson's disease. *Movement Dis*, 1990; 5 (Suppl. 1), 11.

77. Schwab RS, Zieper I. Effects of mood, motivation, stress and alertness on the performance in Parkinson's disease. *Psychiat Neurol*, 1965; 345–357.
78. Ruivo S, Viana P, Martins C, Baeta C. Efeito do envelhecimento cronológico na função pulmonar: Comparação da função respiratória entre adultos e idosos saudáveis. *Rev Port Pneumol*, 2009 Ago; 15(4): 629-653.
79. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2013). *World Population Prospects: The 2012 Revision, DVD Edition*. In: Téllez JP, Herrera S, Benito S, Giraldo BF. *Analysis of the Breathing Pattern in Elderly Patients Using the Hurst Exponent Applied to the Respiratory Flow Signal** *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2014; 2014:3422-5. doi: 10.1109/EMBC.2014.6944358.
80. Téllez JP, Herrera S, Benito S, Giraldo BF. *Analysis of the Breathing Pattern in Elderly Patients Using the Hurst Exponent Applied to the Respiratory Flow Signal** *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2014; 2014:3422-5. doi: 10.1109/EMBC.2014.6944358.
81. Janssens JP, Krause KH. Pneumonia in the very old. *Lancet Infect Dis*, 2004 4, 112–124.
82. Elliott JE, Omar TS, Mantilla CB, Sieck GC. Diaphragm muscle sarcopenia in Fischer 344 and Brown Norway rats. *Exp Physiol*, 2016. Jul 1;101(7):883-94. doi: 10.1113/EP085703.
83. Ide MR. Estudo Comparativo dos efeitos de um protocolo de cinesioterapia respiratória desenvolvido em dois diferentes meios, aquático e terrestre, na função respiratória em idosos. *Dissertação [Fisiopatologia Experimental] - Faculdade de Medicina da USP*; 2004.
84. Janssens JP, Pache JC, Nicod LP. Physiological changes in respiratory function associated with ageing. *Eur Respir J*, 1999 Jan;13(1):197-205.
85. Britto RR, Zampa CC, de Oliveira TA, Prado LF, Parreira VF. Effects of the aging process on respiratory function. *Gerontology*, 2009;55(5):505-10. doi: 10.1159/000235853.
86. Chaunchaiyakul R, Groeller H, Clarke JR, Taylor NA. The impact of aging and habitual physical activity on static respiratory work at rest and during exercise. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004. 287: L1098–L1106.
87. Dyer C. The interaction of ageing and lung disease. *Chron Respir Dis*, 2012 Feb;9(1):63-7. doi: 10.1177/1479972311433766.
88. Sprung J, Gajic O, Warner DO. Review article: age related alterations in respiratory function - anesthetic considerations. *Can J Anaesth*, 2006 Dec;53(12):1244-57.

89. Khurram OU, Fogarty MJ, Sarrafian TL, Bhatt A, Mantilla CB, Sieck GC. Impact of aging on diaphragm muscle function in male and female Fischer 344 rats. *Physiol Rep*, 2018. 6 (13), e13786, <https://doi.org/10.14814/phy2.13786>.
90. Yamaguti WPS, Paulin E, Shibao S, Kodaira S, Chammass MC, Carvalho CRF. Avaliação ultra-sonográfica da mobilidade do diafragma em diferentes posturas em sujeitos saudáveis. *J Bras Pneumol*, 2007; 33(4):407-13.
91. Salén JCW. Animal models: principles and problems. In: Rollin BE, Kesel ML. *The experimental animal in biomedical research: care, husbandry and well-being: an overview by species*. 3ed. Boston: CRC Press; 1995.
92. Snitkoff, GG. Testes biológicos. In: Gennaro AR. *Remington: a ciência e a prática da farmácia*. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.556-68.
93. Zeleznik J. Normative aging of the respiratory system. *Clinics in Geriatric Medicine*, 2003. 19(1),1–18. doi:10.1016/s0749-0690(02)00063-0.
94. Santos BF. Criação e manejo de camundongos. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. *Animais de laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002 p.115-8.
95. Fleming SM, Schallert T, Ciucci MR. Cranial and related sensorimotor impairments in rodent models of Parkinson's disease. *Behav Brain Res*, 2012 Jun; 231(2):317– 22. doi: 10.1016/j.bbr.2012.02.034.
96. Tieu K. A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2011 Sep; 1(1):a009316.
97. Pearce RK, Owen A, Daniel S, Jenner P, Marsden CD. Alterations in the distribution of glutathione in the substantia nigra in Parkinson's disease. *J Neural Transm*, 1997; 104:661-77.
98. Floor E, Wetzel MG. Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. *J Neurochem*, 1998; 70:268-75.
99. Mazzi EA, Reams RR, Soliman KF. The role of oxidative stress, impaired glycolysis and mitochondrial respiratory redox failure in the cytotoxic effects of 6-hydroxydopamine in vitro. *Brain Res*, 2004; 1004:29-44.
100. Ribeiro FM, Camargos ERS, Souza LC, Teixeira AL. Animal models of neurodegenerative diseases. *Rev Bras Psiquiatr* 2013; 35(Suppl 2):S82–S91.
101. Gerlach M, Riederer P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J Neural Transm* 1996; 103:987-1041.

102. Fulceri F, Biagioni F, Lenzi P, Falleni A, Gesi M, Ruggieri S, et al. Nigrostriatal damage with 6-OHDA: Validation of routinely applied procedures. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006; 1074: 344–348.
103. Ross CN, Davis K, Dobek G, and Tardif SD. Aging Phenotypes of Common Marmosets (*Callithrix jacchus*), *Journal of Aging Research*, vol. 2012, Article ID 567143, 6 pages, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/567143>.
104. Mansfield K. Marmoset models commonly used in biomedical research. *Comp Med*. 2003 Aug;53(4):383-92.
105. Tardif SD, Mansfield KG, Ratnam R, Ross CN, Ziegler TE. The marmoset as a model of aging and age-related diseases. *ILAR Journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 2011; 52(1), 54–65. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>. Secreted.
106. de Campos PS, Hasegawa K, Kumei Y, Zeredo JL. Cineradiographic analysis of respiratory movements in a mouse model for early Parkinson's disease. *Respir. Physiol. Neurobiol*, 2015. 218, 40–45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2015.07.002>.
107. Hasegawa K, de Campos P, Zeredo JL, Kumei Y. Cineradiographic analysis of mouse postural response to alteration of gravity and jerk (gravity deceleration rate). *Life*, 2014.4, 174–188. <http://dx.doi.org/10.3390/life4020174>.
108. Paxinos G and Franklin, KBJ. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4 ed San Diego: Academic Press, 2012.
109. Stettner GM, Zanella S, Hilaire G, Dutschmann M. 8-OH-DPAT suppresses spontaneous central apneas in the C57BL/6J mouse strain. *Respir. Physiol. Neurobiol*, 2008. 161, 10–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2007.11.001>.
110. Francardo V, Recchia A, Popovic N, Andersson D, Nissbrandt H, Cenci MA. Impact of the lesion procedure on the profiles of motor impairment and molecular responsiveness to L-DOPA in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis*, 2011. 42, 327–340. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2011.01.024>.
111. Heuer A, Smith GA, Lelos MJ, Lane EL, Dunnett SB. Unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesions in mice I: motor impairments identify extent of dopamine depletion at three different lesion sites. *Behav Brain Res*, 2012. 228, 30–43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2011.11.027>.
112. Iancu R, Mohapel P, Brundin P, Paul G. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. *Behav. Brain Res.*, 2005. 162, 1–10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2005.02.023>.
113. Kordower JH, Olanow CW, Dodiya HB, Chu Y, Beach TG, Adler CH, Halliday GM, Bartus RT. Disease duration and the integrity of the nigrostriatal

system in Parkinson's disease. *Brain*, 2013. 136, 2419–2431.
<http://dx.doi.org/10.1093/brain/awt192>.

114. Saleem AF, Sapienza CM, Okun MS. Respiratory muscle strength training: treatment and response duration in a patient with early idiopathic Parkinson's disease. *Neuro Rehabil*, 2005. 20, 323–333.

115. Pitts T, Bolser D, Rosenbek J, Troche M, Okun MS, Sapienza C. Impact of expiratory muscle strength training on voluntary cough and swallow function in Parkinson disease. *Chest*, 2009. 135, 1301–1308.
<http://dx.doi.org/10.1378/chest.08-1389>.

116. Protas EJ, Stanley RK, Jankovic J, MacNeill B. Cardiovascular and metabolic responses to upper- and lower-extremity exercise in men with idiopathic Parkinson's disease. *Phys. Ther.*, 1996. 76, 34–40.

117. Vercueil L, Linard JP, Wuyam B, Pollak P, Benchetrit G. Breathing pattern in patients with Parkinson's disease. *Respir. Physiol.*, 1999. 118, 163–172. [http://dx.doi.org/10.1016/S0034-5687\(99\)00075-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0034-5687(99)00075-4).

118. Dutschmann M, Menuet C, Stettner GM, Gestreau C, Borghgraef P, Devijver H, Gielis L, Hilaire G, Van Leuven F. Upper airway dysfunction of Tau-P301L mice correlates with tauopathy in midbrain and ponto-medullary brainstem nuclei. *J. Neurosci.*, 2010. 30, 1810–1821.
<http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5261-09.2010>.

119. Lalley PM. Opioidergic and dopaminergic modulation of respiration. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 2008. 164, 160–167.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2008.02.004>.

120. Lalley PM, Mifflin SW. Opposing effects on the phrenic motor pathway attributed to dopamine-D1 and -D3/D2 receptor activation. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 2012. 181, 183–193. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2012.03.008>.

121. Nsegbe E, Wallén-Mackenzie Å, Dauger S, Roux JC, Shvarev Y, Lagercrantz H, Perlmann T, Herlenius E. Congenital hypoventilation and impaired hypoxic response in Nurr1 mutant mice. *J. Physiol.*, 2004. 556, 43–59.
<http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2003.058560>.

122. Vincent SG, Waddell AE, Caron MG, Walker JKL, Fisher JT. A murine model of hyperdopaminergic state displays altered respiratory control. *FASEB J*, 2007. 21, 1463–1471. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.06-7248com>.

123. Lalley PM. Dopamine1 receptor agonists reverse opioid respiratory network depression, increase CO₂ reactivity. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 2004. 139, 247–262. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2003.10.007>.

124. Lalley PM. D1/D2-dopamine receptor agonist dihydrexidine stimulates inspiratory motor output and depresses medullary expiratory neurons. *Am. J.*

Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 2009. 296, R1829–R1836.
<http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00057.2009>.

125. Bautista TG, Dutschmann M. Inhibition of the pontine Kölliker-Fuse nucleus abolishes eupneic inspiratory hypoglossal motor discharge in rat. *Neuroscience*, 2014. 267, 22–29.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.02.027>.

126. Leiter JC, St.-John WM. Phrenic, vagal and hypoglossal activities in rat: preinspiratory, inspiratory, expiratory components. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 2004; 142, 115–126. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2004.06.008>.

127. Vertes RP. A lectin horseradish peroxidase study of the origin of ascending fibers in the medial forebrain bundle of the rat. The lower brainstem. *Neuroscience*, 1984; 11. [http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522\(84\)90051-4](http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522(84)90051-4).

128. Andrzejewski K, Budzińska K, Kaczyńska K. Phrenic and hypoglossal nerve activity during respiratory response to hypoxia in 6-OHDA unilateral model of Parkinson's disease. *Life Sci*, 2017; 180, 143–150.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2017.05.020>.

129. Budzinska K, Andrzejewski K. Respiratory activity in the 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease in the rat. *Acta Neurobiol. Exp*, 2014; (Wars.) 74, 67–81.

130. Menuet C, Borghgraef P, Voituren N, Gestreau C, Gielis L, Devijver H, Dutschmann M, Van Leuven F, Hilaire G. Isoflurane anesthesia precipitates tauopathy and upper airways dysfunction in pre-symptomatic Tau.P301L mice: possible implication for neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Dis.*, 2012; 46, 234–243. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2012.01.012>.

131. Siderowf A, Stern MB. Premotor Parkinson's disease: clinical features, detection, and prospects for treatment. *Ann. Neurol.*, 2008; 64 (Suppl. 2), S139–47. <http://dx.doi.org/10.1002/ana.21462>.

132. Iodice V, Low DA, Vichayanrat E, Mathias CJ. Cardiovascular autonomic dysfunction in MSA and Parkinson's disease: similarities and differences. *J. Neurol. Sci.*, 2011; 310, 133–138.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2011.07.014>.

133. Bezard E, Przedborski S. A tale on animal models of Parkinson's disease. *Mov. Disord.*, 2011; 26, 993–1002.
<http://dx.doi.org/10.1002/mds.23696>.

134. Tolosa E, Pont-Sunyer C. Progress in defining the premotor phase of Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.*, 2011; 310, 4–8.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2011.05.027>.

135. Mittman C, Edelman NH, Norris AH, Shock NW. Relationship between chest wall and pulmonary compliance and age. *J Appl Physiol*, 1965; 20: 1211±1216. <https://doi.org/10.1152/jappl.1965.20.6.1211>.
136. Estenne M, Yernault JC, De Troyer A. Rib cage and diaphragm-abdomen compliance in humans: effects of age and posture. *J Appl Physiol*, 1985 Dec;59(6):1842-8. <https://doi.org/10.1152/jappl.1985.59.6.1842>.
137. Xie L, Zhou Q, Liu S, Wu Q, Ji Y, et al. Normal Thoracic Radiographic Appearance of the Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*). *PLoS ONE*, 2014; 9(1): e84599. doi:10.1371/journal.pone.0084599.
138. Tolep K, Higgins N, Muza S, Criner G, Kelsen SG. Comparison of diaphragm strength between healthy adult elderly and young men. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995; 152:677–682. doi:10.1164/ajrccm.152.2.7633725
139. Polkey MI, Harris ML, Hughes PD, Hamnegård CH, Lyons D, Green M, Moxham J. The contractile properties of the elderly human diaphragm. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997; May;155(5):1560-4. doi:10.1164/ajrccm.155.5.9154857
140. Greising SM, Mantilla CB, Gorman BA, Ermilov LG, Sieck GC. Diaphragm muscle sarcopenia in aging mice. *Exp Gerontol*, 2013; Sep;48(9):881-7. doi:10.1016/j.exger.2013.06.001.
141. Greising SM, Mantilla CB, Medina-Martínez JS, Stowe JM, Sieck GC. Functional impact of diaphragm muscle sarcopenia in both male and female mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015; Jul 1;309(1):L46-52. doi:10.1152/ajplung.00064.2015.
142. Greising SM, Medina-Martínez JS, Vasdev AK, Sieck GC, Mantilla CB. Analysis of muscle fiber clustering in the diaphragm muscle of sarcopenic mice. *Muscle Nerve*, 2015; Jul;52(1):76-82. doi:10.1002/mus.24641.
143. Tobin MJ, Chadha TS, Jenouri G, Birch SJ, Gazeroglu HB, Sackner MA. Breathing patterns. 1. Normal subjects. *Chest*, 1983;84(2):202-5. doi:10.1378/chest.84.2.202
144. Verschakelen JA, Demedts MG. Normal thoracoabdominal motions. Influence of sex, age, posture, and breath size. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995;151(2 Pt 1):399-405. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.151.2.7842198>
145. Parreira VF, Bueno CJ, França DC, Vieira DS, Pereira DR, Britto RR. Breathing pattern and thoracoabdominal motion in healthy individuals: influence of age and sex. *Rev Bras Fisioter*, 2010;14(5):411-6. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-35552010000500010>.
146. Britto RR, Vieira DSR, Rodrigues JM, Prado LF, Parreira VF. Comparison of respiratory pattern between adults and elderly healthies. *Braz J Phys Ther*, 2005; 9: 281–287.

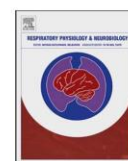
ANEXO 1

Respiratory Physiology & Neurobiology 251 (2018) 50–56



Contents lists available at ScienceDirect

Respiratory Physiology & Neurobiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/resphysiol

Analysis of respiratory movements in a mouse model of late Parkinson's disease submitted to stress

P.S. de Campos^a, L.R.S.M. Kawamura^a, K. Hasegawa^b, Y. Kumei^c, J.L. Zeredo^{a,*}^a Graduate Program in Health Science and Technology, University of Brasilia, Brasilia, Brazil^b JAXA/Institute of Space and Astronautical Science, Sagami-hara, Japan^c Department of Hard Tissue Engineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

ARTICLE INFO

Keywords:

Respiration
Diaphragm
Radiography
Disease models
Behavior
Animal

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is known to cause tremor and rigidity, but other symptoms such as respiratory and autonomic dysfunctions are a major cause of disability and mortality in patients. In this study, we examined respiratory movements by using cineradiography on a murine model of late/advanced PD. Under surgical anesthesia, C57BL/6J mice received an injection of either 6-OHDA or vehicle solution to the right striatum. Two weeks after surgery, the animals had their respiratory movements recorded by video X-ray without any restraint. During recordings the animals were submitted to a mild acute-stress challenge. Behavioral tests were performed to assess the severity of the 6-OHDA lesion. As a result, behavioral tests confirmed severe motor impairments in 6-OHDA mice as compared to controls. 6-OHDA mice showed a predominantly thoracic respiratory pattern with reduced diaphragmatic excursion, and reduced respiratory frequency after stress. These results suggest that advanced nigrostriatal degeneration may cause respiratory alterations with the features of obstructive-type respiratory disorders.

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) often displays respiratory disorders, particularly at its later stages. Such disorders as aspiration pneumonia account for a greater mortality among PD patients than PD itself (Hoehn and Yahr, 1967; Mehanna and Jankovic, 2010). The progression of the disease can be divided in stages according to specific symptoms and severity of such symptoms (Braak et al., 2003). The most prominent features of PD, the so-called motor symptoms, are attributed to the degeneration of dopaminergic circuits in the mid-brain and basal nuclei (Kalia and Lang, 2015). At earlier stages, non-motor symptoms of PD are attributed to disrupted activity in the medulla, enteric nervous system, and olfactory bulb, whereas at later stages, involvement of the cortex may cause cognitive and limbic symptoms (Tolosa et al., 2006). In addition to specific areas of the brain, the duration of the disease can be associated with the degree of degeneration of the dopaminergic nigrostriatal pathway (Kordower et al., 2013). It is estimated that at the time when motor symptoms present themselves and a diagnosis of PD can be made, most patients will have about a 60% reduction in the population of dopamine neurons in the nigrostriatal pathway (Jankovic and Sherer, 2014). It is possible that respiratory disorders associated

with PD can be staged in a similar manner; in other words, a certain pattern of respiratory symptoms may emerge in relation to the progression of the disease. We have previously reported respiratory changes in a mouse model mimicking the initial stages of PD (de Campos et al., 2015). In this study we looked for respiratory changes in a more severe model of PD. In addition, we report the results of a stress challenge on the severe PD model. A stress challenge is the process of inducing a physiological response by exposing an animal to an aversive (i.e. stressful) stimulus.

2. Material and methods

The methods described here were reviewed and approved by the institutional animal welfare committee (Approval no. 0140089C). All animal experiments complied with the ARRIVE guidelines and were carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines.

2.1. Animals

Wild-type male C57BL/6J mice (Nihon Clea, Tokyo, Japan) were

Abbreviations: 6-OHDA, 6-hydroxydopamine; PD, Parkinson's disease; CPA, costophrenic angle

* Corresponding author at: Graduate Program in Health Science and Technology, University of Brasilia, Centro Metropolitan, Conjunto A, Lote 1, Brasilia, DF 72220-900, Brazil.

E-mail address: jlzeredo@unb.br (J.L. Zeredo).

<https://doi.org/10.1016/j.resp.2018.02.012>

Received 29 December 2017; Received in revised form 8 February 2018; Accepted 18 February 2018

Available online 23 February 2018

1569-9048/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

used. The animals weighed 22–25 g (aged 8 weeks) at the beginning of experiments. The animals were housed individually in 20 cm × 20 cm × 30 cm acrylic cages lined with absorbing bedding material, with freely available food (standard chow) and water. The animals were kept in a temperature-controlled room (23 ± 1°C) and in a 12-h dark/light cycle (lights on at 8:00). A total of 36 mice were randomly and equally divided into experimental (6-OHDA) and control groups. After surgery 9 animals in the 6-OHDA group were excluded because of poor health conditions. The total number of animals in each group was 6-OHDA n = 9, control n = 18. All animals were humanely killed after the experiments by aesthetic overdose.

2.2. Surgical procedures

Animals were anesthetized with a mixture of ketamine (90–120 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), and supplemented as needed. Throughout the surgery, appropriate surgical level of anesthesia was verified by the lack of withdrawal reflexes from a pinch stimulus applied to the tail. The animals were then placed on a stereotaxic apparatus (Narishige, Tokyo, Japan) and received two microinjections of either 6-OHDA or saline solutions into the striatum on the left side. The coordinates were 1) AP = +1.0, L = -2.1, DV = -2.9; and 2) AP = +0.3, L = -2.3, DV = -2.9; AP: +0.5; L: -2.0 and DV: -3.0 mm (relative to bregma, sagittal suture, and dural surface) (Paxinos and Franklin, 2008). All solutions were prepared on the day of the surgery and kept in light-protected vials and stored in an ice box until use. 6-OHDA solution consisted of 12 µg 6-OHDA hydrochloride (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan) dissolved in 0.9% NaCl with 0.02% ascorbic acid in sterile water. Saline solution consisted of 0.02% ascorbic acid and 0.9% NaCl in sterile water. The total injected volume of either solution was 4 µL (2 × 2-µL) with the flow rate of 0.5 µL/min. Injections were made through a 32G needle attached to a 10 µL Hamilton syringe on an injection pump. The injection needle was left in place for 2 min before and 2 min after the injection. The animals were monitored until recovered from anesthesia, then returned to their home cages.

2.3. Behavioral tests

Behavioral tests were carried out 2 weeks after surgery. General motor function was assessed by the three tests described below. All behavioral tests were scored by an examiner who was blind to the animals group assignment.

Cylinder test: asymmetric paw preference in spontaneous exploratory behavior was examined by placing the mouse inside a glass beaker (8 cm diameter × 11 cm height) in front of vertical mirrors as to allow for a clear view of the mouse from all angles. The mice were filmed for 5 min while in the beaker. This test was performed only once, to avoid habituation, and just before lights-off time, when the animals are most active. The normal animal behavior is to explore the new environment by rearing inside the beaker, touching the glass walls with its forepaws. The number of weight-bearing wall contacts made by the right and left forepaws was counted.

Rotation test: this test is used to detect asymmetry in the use of the paws, cognitive deficits, or general welfare in mice. The animals were placed in individual compartments and filmed for 5 min. The number of turns that the mouse completed toward each side during the observation period were analyzed.

Apomorphine test: this test evaluates the severity of the injury and is used to detect the asymmetry in the use of the paws. In a manner similar to the above Rotation test, the animals were placed in individual compartments and filmed 20 min after an injection of apomorphine (0.5 mg/kg, i.p., Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan). The drug has the effect of over-exciting the dopamine-deficient area of the neurotoxic lesion, causing the animal to move and turn in the direction contralateral to the injection of 6-OHDA. Except for the apomorphine test, all other behavioral tests were performed before the cineradiographic recordings

of respiratory movements.

2.4. Cineradiographic recordings and stress challenge

Cineradiographic recordings were obtained 2 weeks after surgery. Before the recordings, the animals were habituated to the cineradiographic apparatus (Micro X-movie, NIC, Fujisawa, Japan) for 5 min during two consecutive days. On the following two consecutive days, 6-min movie recordings were made from each mouse on each day. The animals were transferred to a test cage inside the apparatus, one by one, without any restraint. Recordings consisted of one-minute of each: 1) habituation, 2) observation, 3) first rotation, 4) observation, 5) second rotation 6) observation. Measurements were made during the periods of observation. Stress challenge: during the recordings, the test cage inside the apparatus was rotated in order to provoke an aversive stimulus to the mice. Rotations consisted of 60 s of 1 Hz rotation around the animals center of mass. First and second rotations were applied toward opposing sides and counterbalanced. Images were obtained by passing an X-ray beam vertically onto the mouse by a micro-focus X-ray tube (Toshiba Electron Tubes and Devices Co. Ltd., Tokyo). Power settings on the X-ray tube were kept constant at 70 kV and 0.3 mA to obtain stable X-ray emission. The X-ray photons passing through mouse were converted into visible light by a beryllium fast-response image-intensifier (Toshiba Electron Tubes and Devices Co., Ltd., E5889BP-P1K). This image was then captured by a digital video camera positioned underneath the image intensifier (Hasegawa et al., 2014). Videos were recorded at 29 fps and 1920 × 1080 pixels.

2.5. Respiratory movements

We measured respiratory frequency, diaphragmatic excursion, amplitude of the costophrenic angle (CPA), and the distance between the CPAs during quiet respiration (Fig. 1), in a manner similar to that described before (de Campos et al., 2015). Each animal was recorded twice and each video was measured three times at each observation period (total 18 measurements/animal). Measurements were made by an examiner who was blind to whether the mice had received 6-OHDA or saline injection.

Measurement of respiratory frequency was derived from the number of frames between maximum inspiration and the next maximum expiration. Periods of apnea, defined as intervals ≥ 2 respiratory cycles

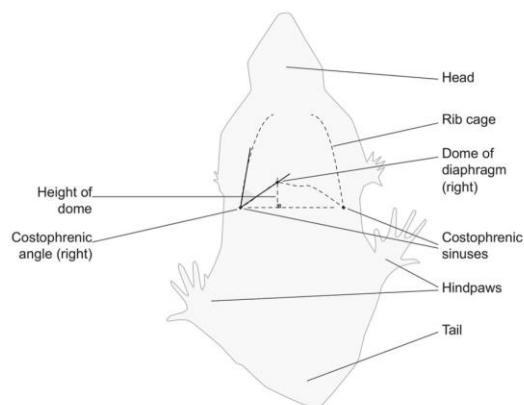


Fig. 1. Respiratory measurements. Measurements were made over the cineradiographic images of the mice in the horizontal plane. Video-still images were selected at the points of maximum inspiration and maximum expiration during quiet respiration. Measurements included linear (height of diaphragmatic dome and distance between costophrenic angles), angular (the costophrenic angles), and temporal (respiratory frequency) variables.

(Stettner et al., 2008), were excluded. The right and left height of the diaphragmatic dome was measured perpendicularly between the imaginary line connecting the right and left CPA and the highest point on the dome. Diaphragmatic excursion was measured as the difference in the height of the diaphragmatic dome between maximum expiration and maximum inspiration. The costophrenic angle is formed between diaphragm profile and the edge of the chest wall, the right and left CPA was measured during a maximum expiration and maximum inspiration on the right and left sides of the body. The angular variation was obtained by subtracting the measurement on maximum inspiration by that on maximum expiration and this reflects the mobility of the whole thorax-abdomen. The distance between the costophrenic angles was measured during a maximum expiration and maximum inspiration and reflects the mobility of the thorax. The software Kinovea (<http://www.kinovea.org/>) was used for frame-by-frame display and measurement of video images.

2.6. Statistical analysis

Group differences between 6-OHDA and control group animals were compared by the Mann-Whitney *U* test (nonparametric unpaired), where $p < 0.05$ was considered statistically significant. The Friedman test (nonparametric repeated measures) was used to test the effects of the stress stimulation (no rotation, 1st rotation, 2nd rotation) in each group. When the Friedman test showed a statistically significant difference ($p < 0.05$), post-hoc pairwise comparisons between phases of the stress challenge: before (Rotation 0), after first rotation (Rotation 1), and after second rotation (Rotation 2) were done by the Wilcoxon signed rank test (nonparametric paired two-group). Post-hoc tests were conducted with a Bonferroni correction whereby $p \leq 0.01$ was considered significant.

3. Results

Behavioral tests indicated that the lesions produced a pattern consistent with advanced nigrostriatal degeneration (Fig. 2). In the rotation test (Fig. 2A), 6-OHDA mice made significantly more one-sided turns than control mice (2.48 ± 0.91 (R-L)/min, and 0.08 ± 0.19 (R-L)/min for 6-OHDA and control mice, respectively) ($p < 0.05$). In the apomorphine test (Fig. 2B), again 6-OHDA mice significantly more one-sided turns, this time towards the opposite side (-3.79 ± 0.60 turns/min, and -0.46 ± 0.2 turns/min, in 6-OHDA and control, respectively) ($p < 0.05$). In the cylinder test (Fig. 2C–D), 6-OHDA mice remained mostly immobile and reared significantly less than controls (4.87 ± 1.95 and 16.40 ± 2.60 rearings for 6-OHDA and controls, respectively) ($p = 0.01$). In the same test, however, contrary to expected, 6-OHDA mice failed to display any paw-preference, and in the few instances of rearing, they touched the cylinder walls with both forepaws indistinctly. When paw preference was analyzed, there was no significant difference between groups (paw use: 59.76 ± 8.16 L/(L + R) for 6-OHDA, and 49.49 ± 1.66 L/(L + R) for controls).

The distance between CPAs was significantly greater in 6-OHDA mice as compared to controls (21.32 ± 0.18 mm and 21.94 ± 0.29 mm at maximum inspiration, and 19.07 ± 0.19 mm and 19.82 ± 0.30 mm at maximum expiration, respectively) (Fig. 3A). The difference in CPA distance from maximum inspiration to maximum expiration was similar between groups, in average 2.25 ± 0.10 mm and in 6-OHDA mice and 2.11 ± 0.11 mm. When the different stages of stress stimulation were analyzed, the distance between CPAs changed significantly only in the control group at maximum expiration (Fig. 3B). No changes were found at maximum inspiration or in the difference between maximum inspiration and expiration.

The total respiratory frequency was significantly lower in 6-OHDA than in control mice (Fig. 3C), with the averages of 2.65 ± 0.15 Hz and 3.26 ± 0.85 Hz, respectively ($p < 0.01$). In 6-OHDA mice, the averages of the respiratory frequency were 3.14 ± 0.24 Hz before

rotation, 2.54 ± 0.29 Hz after the first rotation, and 2.26 ± 0.22 after the second rotation. There was a significant difference in respiratory frequency between phases of stress stimulation (before vs. second rotation) in 6-OHDA mice ($p = 0.01$) (Fig. 3D). No difference was found in control group after stress stimulation. In the control group, the averages of respiratory frequency were 3.26 ± 0.15 Hz before rotation, 3.37 ± 0.13 Hz after the first rotation, and 3.16 ± 0.15 after the second rotation.

The costophrenic angles (CPA) on the right side were not significantly different between groups at either maximum inspiration ($51.51 \pm 0.41^\circ$ and $52.93 \pm 0.70^\circ$) or maximum expiration ($44.60 \pm 0.42^\circ$ and $45.00 \pm 0.66^\circ$) (Fig. 4A). The angular difference from maximum inspiration to maximum expiration in the right CPA was $6.90 \pm 0.43^\circ$ in 6-OHDA mice and $7.93 \pm 0.63^\circ$ in controls. The CPA on the right side was not changed significantly by stress stimulation, as compared to baseline values (Fig. 4B). Similar results were found for the left CPA regarding the total differences between groups (Fig. 4C) or differences between baseline and after stress stimulation (Fig. 4D).

The right-dome height at maximum inspiration was higher in 6-OHDA mice than in controls (2.45 ± 0.05 mm, and 2.12 ± 0.06 mm, respectively) ($p < 0.01$). A higher dome indicates reduced mobility of the diaphragm. Right-dome height at maximum expiration was similar between groups: 3.74 ± 0.12 mm in 6-OHDA mice and 3.77 ± 0.08 mm in control mice (Fig. 5A). On the right side, the total diaphragm excursion (difference in dome height between maximum inspiration and maximum expiration) was shorter in 6-OHDA mice than in controls (1.28 ± 0.09 mm, and 1.65 ± 0.05 mm, respectively) ($p < 0.01$). Stress stimulation did not alter the right-dome height or dome excursion (Fig. 5B) in either 6-OHDA or control group as compared to baseline (before rotations). The left-dome height showed results similar to right side. At maximum inspiration, the values were 1.72 ± 0.04 mm in 6-OHDA mice and 1.46 ± 0.04 mm in control mice ($p < 0.01$). At maximum expiration, the values were 2.12 ± 0.06 mm in 6-OHDA mice and 2.04 ± 0.05 mm in control mice (difference not significant) (Fig. 5C). The total diaphragm excursion on the left side was different between groups: 0.39 ± 0.04 mm in 6-OHDA and 0.57 ± 0.03 mm in control mice ($p < 0.01$). As in the right side, stress stimulation did not alter the dome height or dome excursion (Fig. 5D) in either 6-OHDA or control mice as compared to baseline.

4. Discussion

In this study, we measured respiratory movements through cineradiography in an animal model of late PD. We observed that the movements of the diaphragm were reduced in amplitude and frequency in neurotoxin-injected mice as compared to control mice. This finding may be explained by either a weakness of the diaphragm or mechanical limitation of the lungs, or a combination of the two. As such, animals in our model of late PD showed signs of an obstructive type of respiratory dysfunction. Experimental and control animals responded to a stress challenge in markedly different ways, suggesting an important interaction between the dopaminergic system and stress-induced mechanisms in the experimental animals.

We used an animal model of PD that is produced by injecting the neurotoxin 6-OHDA into the striatum unilaterally. The neurotoxin is taken up by dopamine terminals around the injection site, causing the degeneration of these neurons over the course of two to three weeks. The extension of the lesion can be estimated by the animals performance in behavioral tests of side preference/neglect, general mobility, and motor coordination (Francardo et al., 2011; Heuer et al., 2012; Iancu et al., 2005). In this study, the performance of 6-OHDA mice in the rotation and apomorphine tests indicated a unilateral striatal dopaminergic neuronal loss greater than 80% (Iancu et al., 2005). This level of degeneration is observed in patients 4–5 years or more post-diagnosis (Kordower et al., 2013), consistent with advanced stages of the disease.

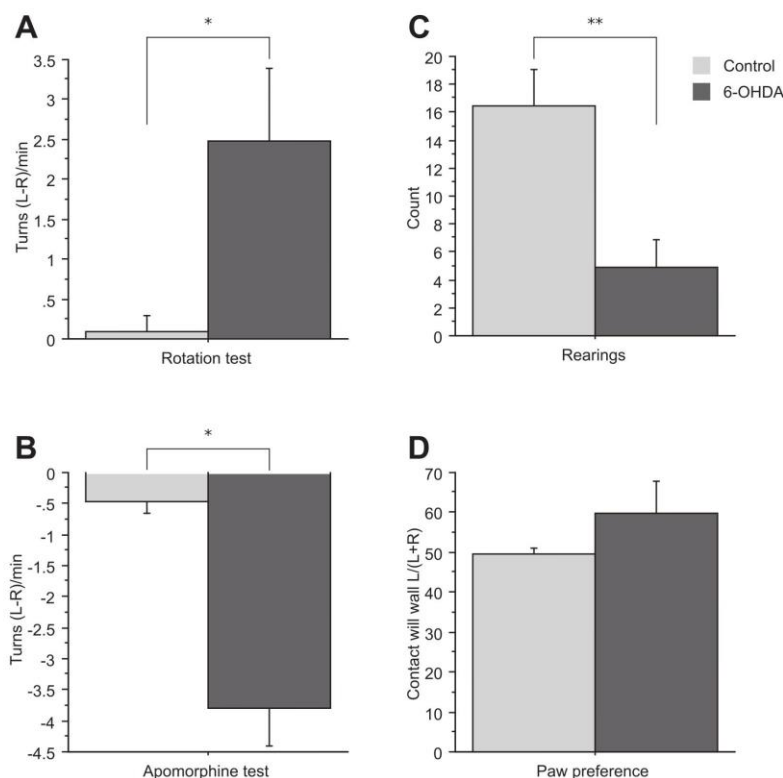


Fig. 2. Behavioral tests. (A) In the rotation test, 6-OHDA mice showed higher values of rotation toward only one side (left side), while control group presented symmetry in the rotations. (B) In the apomorphine test, 6-OHDA mice showed higher rotations toward the injected by the disease (right side) while control mice were almost symmetrical. (C) In the cylinder test, rearings were very few in 6-OHDA mice as compared to controls, demonstrating low mobility of this group. (D) Also in the cylinder test, paw preference was not detected between groups. Asterisk indicates $p < 0.05$ and double asterisk indicates $p < 0.01$ in the Mann-Whitney U test.

In patients, PD is known to cause respiratory dysfunctions of both obstructive and restrictive types, depending on the degree of motor, skeletal, and postural disturbances (Sabaté et al., 1996). Obstructive dysfunctions are characterized by reduction in the maximum expiratory pressure, lower expiratory flows and increased residual volume, all resulting from the weakening of respiratory muscles that accompany PD (Haas et al., 2004; Saleem et al., 2005). Obstructive dysfunctions are found in PD patients with a higher degree of rigidity and a higher degree of bradykinesia (Sabaté et al., 1996), and therefore may indicate worsening of the disease.

Regardless of the severity of the disease, most studies report in PD patients decreased expandability and mobility of the thorax, and decreased respiratory-muscle strength (Canning et al., 1997; Pitts et al., 2009; Protas et al., 1996; Vercueil et al., 1999), but changes in diaphragmatic function are less common. One study that evaluated thoracic cirtometry in PD patients found markedly reduced thoracic wall compliance, but again no changes in relation to muscle force or diaphragmatic mobility (Cardoso and Pereira, 2002). In the present study, we found a relatively unchanged CPA and distance between CPAs, and reduced diaphragmatic mobility in 6-OHDA-injected mice as compared to controls. These findings show that the experimental animals developed a breathing pattern that was much more thoracic than abdominal, suggesting the use of accessory muscles to compensate for the loss of diaphragmatic mobility. This tendency to compensate for airway obstruction by relying on thoracic breathing is seen in the mouse model of tauopathy (Dutschmann et al., 2010); a model which encompasses

neurodegenerative diseases such as Parkinson's and Alzheimer's. In our previous study (de Campos et al., 2015), we observed in a model of early/initial PD that the experimental animals had a reduced CPA without changes in diaphragmatic mobility, featuring a restrictive type of respiratory dysfunction. Therefore, it is plausible that this change from restrictive to obstructive respiratory dysfunction reflects the degree of nigrostriatal degeneration, at least in this animal model of PD. Animal studies have demonstrated that dopaminergic neurons in the brainstem help to regulate respiratory control centers in response to hypoxia and hypercapnia (Lalley, 2008; Lalley and Mifflin, 2012), and both overexpression as well as sub-expression dopaminergic neurons and dopamine receptors can lead to disturbances in the control of breathing. Mice deficient in Nurr-1, a transcription factor required for the development of dopaminergic neurons in the brainstem respiratory regions exhibit an irregular breathing pattern with pauses and long apneas and fail to increase breathing during hypoxia (Nsegbe et al., 2004). On the other hand, animals that lack the DA transporter protein, and are therefore hyper-dopaminergic, also exhibit decreased respiratory frequency during normoxia and normal tidal volume during hypoxia (Vincent et al., 2007). Despite the complex modulatory controls mediated by dopamine, D1 receptors having an excitatory effect (Lalley, 2009, 2008, 2004) and D2/D4 having an inhibitory (Pan et al., 2008) effect on respiratory neuron excitability, the D1 effect (excitatory) seems to be dominant (Lalley and Mifflin, 2012). In a condition of dopamine deficiency, as in the case of PD, reduced function and reduced responsiveness of the respiratory system are expected.

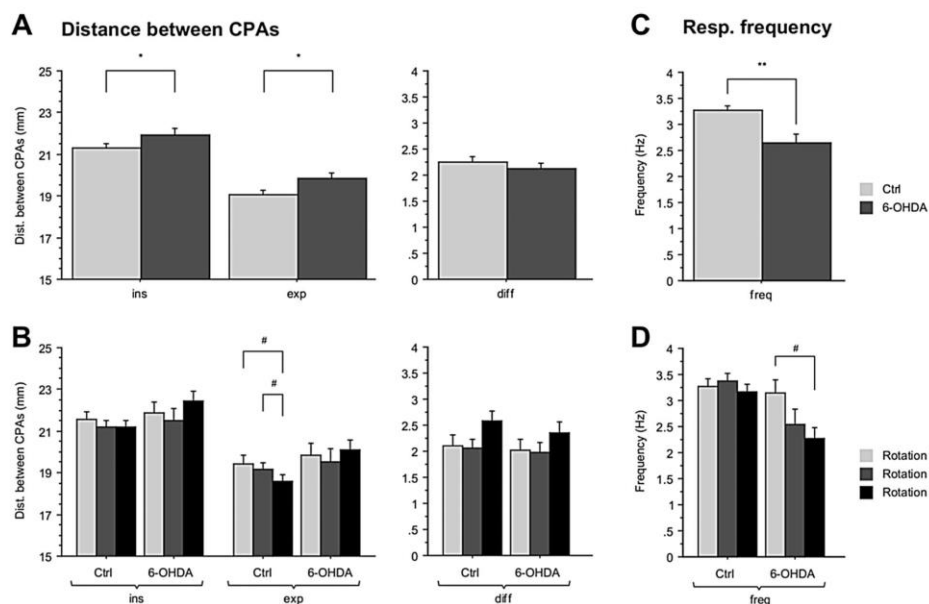


Fig. 3. Changes in the distance between CPAs (costophrenic angles) and in respiratory frequency during respiration. (A) The distance between the right and left CPAs was significantly larger in 6-OHDA mice, both at maximum inspiration (ins) and maximum expiration (exp), but not in the total excursion (diff). (B) The distance between CPAs decreased significantly after the stress challenge at maximum expiration in the control group only. Phases of the stress challenge are indicated as before stress challenge (Rotation 0), after first rotation (Rotation 1), and after second rotation (Rotation 2). (C) The respiratory frequency in 6-OHDA mice was significantly reduced as compared to controls. (D) After stress challenge the respiratory frequency decreased in 6-OHDA mice only. Asterisk indicates $p < 0.05$ in the Mann-Whitney U test. Hash glyph indicates $p \leq 0.01$ in the Wilcoxon signed rank test.

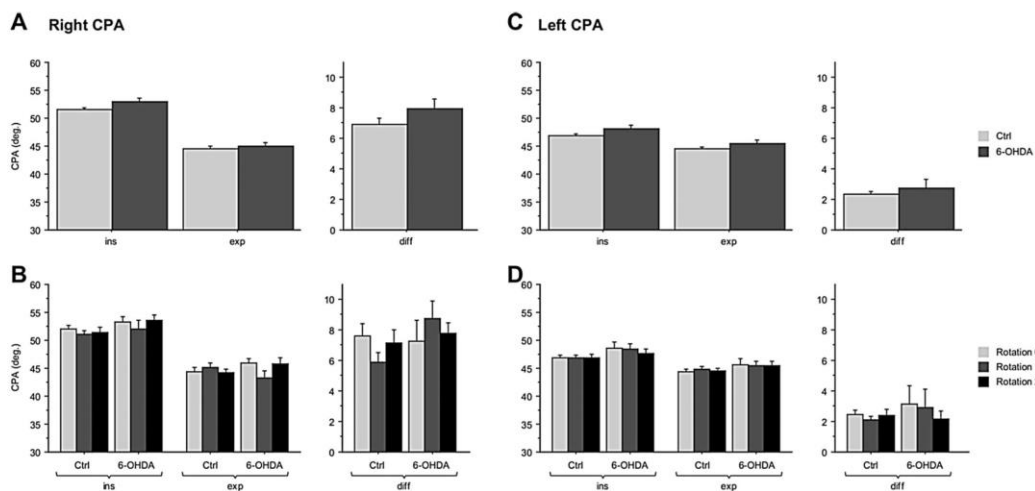


Fig. 4. Movements of the CPAs during respiration. (A) The right CPA was similar between 6-OHDA and control mice during both expiration and inspiration. The total movement, calculated as the difference between maximum expiration and maximum inspiration was likewise similar between groups. (B) The stress challenge did not cause any significant change in either group. (C) The left CPA did not show any difference between groups. (D) The left CPA remained unchanged after the stress challenge. The CPA had movements of smaller amplitude in the left side as compared to the right side because of normal anatomic difference (position of the heart).

In this study, 6-OHDA-injected animals showed signs of obstructive respiratory dysfunction. Hypoglossal motoneuron activity is one of the major mechanisms responsible for the maintenance of airway patency in preparation for inspiration (Bautista and Dutschmann, 2014; Leiter and St.-John, 2004). This activity is driven by pre-motoneurons within the pontine Kolliker-Fuse nucleus (KF) (Bautista and Dutschmann,

2014), which sends projections through the medial forebrain bundle into the striatum (Vertes, 1984). Therefore it is possible that the nigrostriatal degeneration, which is typical of PD and mimicked in the 6-OHDA model, may impair the activity of neurons in the KF and thus cause obstructive respiratory symptoms (Andrzejewski et al., 2017; Budzinska and Andrzejewski, 2014). Similarly, in a model for

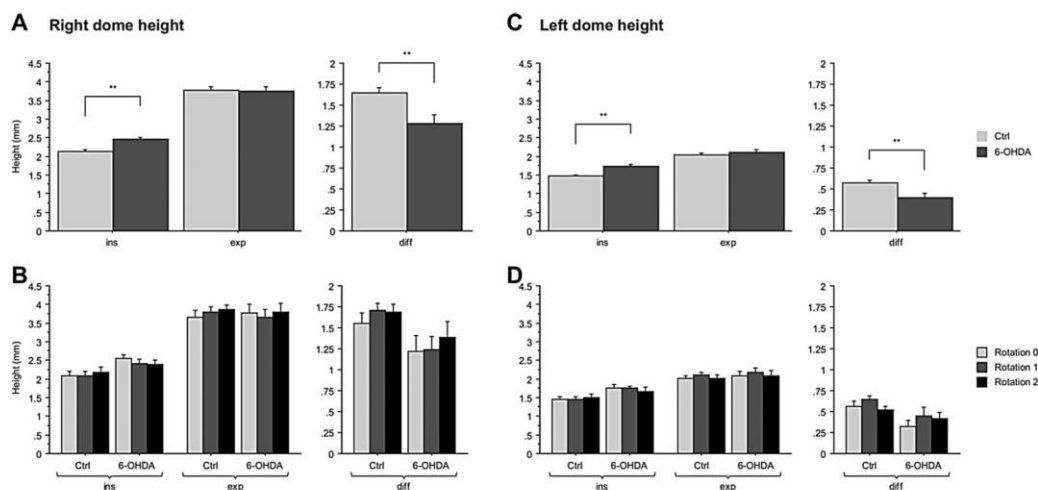


Fig. 5. Movements of the diaphragmatic dome during respiration. (A–C) On both right and left sides, the height of the diaphragmatic dome showed significant differences between 6-OHDA and control groups. The height was taller in 6-OHDA mice during maximum inspiration, indicating reduced contraction of the diaphragm. The difference between the positions of maximum inspiration and maximum expiration indicates reduced amplitude of movements of the diaphragm. (B–D) The stress challenge did not cause any change in diaphragmatic dome height in either group.

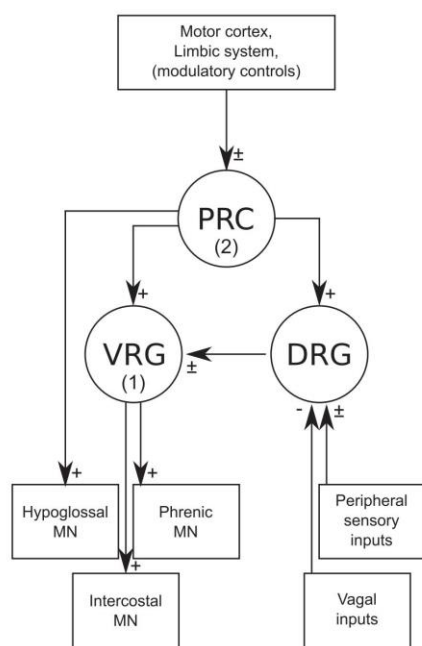


Fig. 6. Summary of neural controls of respiration. Putative mechanisms for the respiratory symptoms observed in 6-OHDA mice are (1) reduced dopaminergic stimulation of the VRG, causing a decrease in the frequency and depth of respiration, and (2) PRG dysfunction, causing a decrease in hypoglossal MN discharge and a decrease in airway patency. Abbreviations: PRC, pontine respiratory group; VRG, ventral respiratory group; DRG, dorsal respiratory group; MN, motoneuron.

taopathy, the Tau-P301L transgenic mouse, the disease was found to occur particularly within the KF, and likewise, the phenotype showed laryngeal dysfunction resulting in disturbed airway control across the respiratory cycle (Dutschmann et al., 2010; Menuet et al., 2012). Fig. 6

shows the basic neural mechanisms for the control of respiration and points out the possible sites affected by the 6-OHDA injection in mice.

PD is well known to cause respiratory dysfunctions, but at the same time these dysfunctions tend to be masked by bradykinesia and sedentarism in patients (Siderowf and Stern, 2008). On the other hand, robust compensatory mechanisms seem to enable normal respiratory function in early/mild PD, including the capacity for regular aerobic exercise (Canning et al., 1997; Haas et al., 2004). Nevertheless, PD patients may develop cardiovascular autonomic dysfunction, particularly at late/advanced stages of the disease (Iodice et al., 2011), which could pose limitations to physical therapy and exercise training. In this study we tested the effect of a mild stressor (concentric rotation of the test cage) on the respiratory movements of our animals; as a result, 6-OHDA mice responded with an unexpected drop of about 28% in the respiratory frequency. D1 receptor activation prevents opioid-driven depression on the bulbar respiratory control centers (Lalley, 2008), thus the decrease in respiratory frequency may have been caused, at least in part, by endogenous opioids released in response to acute stress exposure. Control mice did not show any change in respiratory frequency, but showed a small but significant decrease in the distance between CPA at expiration, which indicates a slightly more forceful expiration after stress. This effect was not observed in 6-OHDA mice, indicating either lower autonomically driven respiratory responsiveness to stress or an already predominantly thoracic breathing pattern at rest.

5. Limitations

As in other animal models, the model used here reproduces only in part the complex human-syndrome called PD (Bezard and Przedborski, 2011). Our model simulates the nigrostriatal degeneration that causes most of the motor symptoms that characterize PD, and the degree of nigrostriatal degeneration caused by neurotoxin injection is closely associated with the severity of motor symptoms in experimental animals (Francardo et al., 2011; Iancu et al., 2005). Likewise, the severity of motor symptoms has been associated with the progression of PD in human patients (Kalia and Lang, 2015). Nevertheless, features of PD related to degeneration in other parts of the brain, as indeed is the case with late PD (Kordower et al., 2013; Tolosa and Pont-Sunyer, 2011), may not have been reproduced in the present model. In addition, it

should be noted that although C57BL/6J mice are prone to central apneas (Stettner et al., 2008), due to technical limitations the periods of apnea were excluded in this study. Further studies are needed to address the specific issue of apnea in PD.

6. Conclusions

Nigrostriatal degeneration caused by 6-OHDA injection into the striatum produced changes in respiratory movements suggestive of an obstructive type of respiratory dysfunction. Reduced diaphragmatic movement with compensatory thoracic breathing may be a characteristic of late/advanced PD. Acute-stress induced an unexpected decrease in the respiratory frequency that may be related autonomic responsiveness as well as to the release of endogenous opioids. Potential benefits of respiratory muscle-training must outweigh the short-term risks of additional stress in patients with advanced PD.

Acknowledgements

This work was financially supported by a grants from JSPS (Japan) to Y. Kumei (24300190), J.L.Zeredo (23593021), and K. Hasegawa (23659885). P.S. de Campos presented a partial version of this study at the 40th Annual Meeting of the Japanese Neuroscience Society, for which she received travel support from FAPDF (Brazil). We thank Dr. Kasia Inoue at TMDU Division of Biochemistry for technical support during the experiments, and Mr. Yanakise from Nihon Clea Co. for assistance with the experimental animals.

References

- Andrzejewski, K., Budzińska, K., Kaczyńska, K., 2017. Phrenic and hypoglossal nerve activity during respiratory response to hypoxia in 6-OHDA unilateral model of Parkinson's disease. *Life Sci.* 180, 143–150. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2017.05.020>.
- Bautista, T.G., Dutschmann, M., 2014. Inhibition of the pontine Kölliker-Fuse nucleus abolishes eupneic inspiratory hypoglossal motor discharge in rat. *Neuroscience* 267, 22–29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.02.027>.
- Bezard, E., Przedborski, S., 2011. A tale on animal models of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 26, 993–1002. <http://dx.doi.org/10.1002/mds.23696>.
- Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., de Vos, R.A.L., Jansen Steur, E.N.H., Braak, E., 2003. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 24, 197–211.
- Budzinska, K., Andrzejewski, K., 2014. Respiratory activity in the 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease in the rat. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars.)* 74, 67–81.
- Canning, C.G., Alison, J.A., Allen, N.E., Groeller, H., 1997. Parkinson's disease: an investigation of exercise capacity, respiratory function, and gait. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 78, 199–207. [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-9993\(97\)90264-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-9993(97)90264-1).
- Cardoso, S.R.X., Pereira, J.S., 2002. Análise da função respiratória na doença de Parkinson. *Arq. Neuropsiquiatr.* 60, 91–95. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-282X2002000100016>.
- de Campos, P.S., Hasegawa, K., Kumei, Y., Zeredo, J.L., 2015. Cineradiographic analysis of respiratory movements in a mouse model for early Parkinson's disease. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 218, 40–45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2015.07.002>.
- Dutschmann, M., Menuet, C., Stettner, G.M., Gestreau, C., Borghgraef, P., Devijver, H., Gielis, L., Hilaire, G., Van Leuven, F., 2010. Upper airway dysfunction of Tau-P301L mice correlates with tauopathy in midbrain and ponto-medullary brainstem nuclei. *J. Neurosci.* 30, 1810–1821. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5261-09.2010>.
- Francardo, V., Recchia, A., Popovic, N., Andersson, D., Nissbrandt, H., Cenci, M.A., 2011. Impact of the lesion procedure on the profiles of motor impairment and molecular responsiveness to L-DOPA in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 42, 327–340. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2011.01.024>.
- Haas, B.M., Trew, M., Castle, P.C., 2004. Effects of respiratory muscle weakness on daily living function, quality of life, activity levels, and exercise capacity in mild to moderate Parkinson's disease. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 83, 601–607. <https://doi.org/10.1002/2060-200408000-00004> [pii].
- Hasegawa, K., de Campos, P., Zeredo, J.L., Kumei, Y., 2014. Cineradiographic analysis of mouse postural response to alteration of gravity and jerk (gravity deceleration rate). *Life* 4, 174–188. <http://dx.doi.org/10.3390/life4020174>.
- Heuer, A., Smith, G.A., Lelos, M.J., Lane, E.L., Dunnett, S.B., 2012. Unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesions in mice I: motor impairments identify extent of dopamine depletion at three different lesion sites. *Behav. Brain Res.* 228, 30–43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2011.11.027>.
- Hoehn, M.M., Yahr, M.D., 1967. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 17, 427–442. <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.17.5.427>.
- Iancu, R., Mohapel, P., Brundin, P., Paul, G., 2005. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. *Behav. Brain Res.* 162, 1–10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2005.02.023>.
- Iodice, V., Low, D.A., Vichayanrat, E., Mathias, C.J., 2011. Cardiovascular autonomic dysfunction in MSA and Parkinson's disease: similarities and differences. *J. Neurol. Sci.* 310, 133–138. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2011.07.014>.
- Jankovic, J., Sherer, T., 2014. The future of research in Parkinson disease. *JAMA Neurol.* 71, 1351–1352. <http://dx.doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.1717>.
- Kalia, V.L., Lang, A.E., 2015. Parkinson's disease. *Lancet* 386, 896–912. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3).
- Kordower, J.H., Olanow, C.W., Dodiya, H.B., Chu, Y., Beach, T.G., Adler, C.H., Halliday, G.M., Bartus, R.T., 2013. Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson's disease. *Brain* 136, 2419–2431. <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awt192>.
- Lalley, P.M., Mifflin, S.W., 2012. Opposing effects on the phrenic motor pathway attributed to dopamine-D1 and -D3/D2 receptor activation. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 181, 183–193. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2012.03.008>.
- Lalley, P.M., 2004. Dopamine1 receptor agonists reverse opioid respiratory network depression, increase CO2 reactivity. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 139, 247–262. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2003.10.007>.
- Lalley, P.M., 2008. Opioidergic and dopaminergic modulation of respiration. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 164, 160–167. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2008.02.004>.
- Lalley, P.M., 2009. D1/D2-dopamine receptor agonist dihydroxidine stimulates inspiratory motor output and depresses medullary expiratory neurons. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296, R1829–R1836. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00057.2009>.
- Leiter, J.C., St.-John, W.M., 2004. Phrenic, vagal and hypoglossal activities in rat: pre-inspiratory, inspiratory, expiratory components. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 142, 115–126. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2004.06.008>.
- Mehanna, R., Jankovic, J., 2010. Respiratory problems in neurologic movement disorders. *Park. Relat. Disord.* 16, 628–638. <http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreldis.2010.07.004>.
- Menuet, C., Borghgraef, P., Voituren, N., Gestreau, C., Gielis, L., Devijver, H., Dutschmann, M., Van Leuven, F., Hilaire, G., 2012. Isoflurane anesthesia precipitates tauopathy and upper airways dysfunction in pre-symptomatic Tau.P301L mice: possible implication for neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Dis.* 46, 234–243. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2012.01.012>.
- Nesge, E., Wallén-Mackenzie, Å., Dauger, S., Roux, J.C., Shvarev, Y., Lagerrantz, H., Perlmann, T., Herlenius, E., 2004. Congenital hypoventilation and impaired hypoxic response in Nurr1 mutant mice. *J. Physiol.* 556, 43–59. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2003.058560>.
- Pan, B., Hillard, C.J., Liu, Q., 2008. D2 dopamine receptor activation facilitates endocannabinoid-mediated long-term synaptic depression of GABAergic synaptic transmission in midbrain dopamine neurons via cAMP-protein kinase A signaling. *J. Neurosci.* 28, 14018–14030. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4035-08.2008>.
- Pitts, T., Bolser, D., Rosenbek, J., Troche, M., Okun, M.S., Sapienza, C., 2009. Impact of expiratory muscle strength training on voluntary cough and swallow function in Parkinson disease. *Chest* 135, 1301–1308. <http://dx.doi.org/10.1378/chest.08-1389>.
- Protas, E.J., Stanley, R.K., Jankovic, J., MacNeill, B., 1996. Cardiovascular and metabolic responses to upper- and lower-extremity exercise in men with idiopathic Parkinson's disease. *Phys. Ther.* 76, 34–40.
- Sabaté, M., González, L., Ruperez, F., Rodríguez, M., 1996. Obstructive and restrictive pulmonary dysfunctions in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 138, 114–119. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-510X\(96\)00003-2](http://dx.doi.org/10.1016/0022-510X(96)00003-2).
- Saleem, A.F., Sapienza, C.M., Okun, M.S., 2005. Respiratory muscle strength training: treatment and response duration in a patient with early idiopathic Parkinson's disease. *Neuro Rehabil.* 20, 323–333.
- Siderowf, A., Stern, M.B., 2008. Premotor Parkinson's disease: clinical features, detection, and prospects for treatment. *Ann. Neurol.* 64 (Suppl. 2), S139–47. <http://dx.doi.org/10.1002/ana.21462>.
- Stettner, G.M., Zanella, S., Hilaire, G., Dutschmann, M., 2008. 8-OH-DPAT suppresses spontaneous central apneas in the C57BL/6J mouse strain. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 161, 10–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2007.11.001>.
- Tolosa, E., Pont-Sunyer, C., 2011. Progress in defining the premotor phase of Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 310, 4–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2011.05.027>.
- Tolosa, E., Wenning, G., Poewe, W., 2006. The diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet. Neurol.* 5, 75–86. [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(05\)70285-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(05)70285-4).
- Vercueil, L., Linard, J.P., Wuyam, B., Pollak, P., Benchetrit, G., 1999. Breathing pattern in patients with Parkinson's disease. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 118, 163–172. [http://dx.doi.org/10.1016/S0034-5687\(99\)00075-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0034-5687(99)00075-4).
- Vertes, R.P., 1984. A lectin horseradish peroxidase study of the origin of ascending fibers in the medial forebrain bundle of the rat. The lower brainstem. *Neuroscience* 11. [http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522\(84\)90051-4](http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522(84)90051-4).
- Vincent, S.G., Waddell, A.E., Caron, M.G., Walker, J.K.L., Fisher, J.T., 2007. A murine model of hyperdopaminergic state displays altered respiratory control. *FASEB J.* 21, 1463–1471. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.06-7248com>.

ANEXO 2

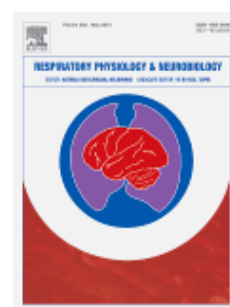


RESPIRATORY PHYSIOLOGY & NEUROBIOLOGY

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

●	Description	p.1
●	Audience	p.1
●	Impact Factor	p.1
●	Abstracting and Indexing	p.2
●	Editorial Board	p.2
●	Guide for Authors	p.4



ISSN: 1569-9048

DESCRIPTION

Respiratory Physiology & Neurobiology publishes original articles and invited reviews concerning **physiology** and **pathophysiology** of **respiration** in its broadest sense. Although a special focus is on topics in **neurobiology**, high quality papers in respiratory **molecular** and **cellular biology** are also welcome, as are high-quality papers in traditional areas, such as mechanics of breathing; gas exchange and acid-base balance; respiration at rest and exercise; respiration in unusual conditions, like high or low pressure or changes of temperature, low ambient oxygen; embryonic and adult respiration; comparative respiratory physiology. Papers on clinical aspects, articles on original methods, as well as theoretical papers are also considered as long as they foster the understanding of **respiratory physiology** and pathophysiology.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our [Support Center](#)

AUDIENCE

Researchers in respiratory-, pulmonary- and circulatory physiology, and neurobiology

IMPACT FACTOR

2017: 1.792 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2018

ABSTRACTING AND INDEXING

MEDLINE®
 BIOSIS
 Chemical Abstracts
 Current Contents/Life Sciences
 EMBASE
 Elsevier BIOBASE/Current Awareness in Biological Sciences
 PASCAL/INIST-CNRS
 Science Citation Index
 ADONIS

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

Mathias Dutschmann, Florey Neuroscience Institute, University of Melbourne, Victoria, Australia

Associate Editor

Yu Ru Kou, Department & Institute of Physiology, National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan

Founding Editor

Pierre Dejours

Honorary Editor

Peter Scheid, Institut für Physiologie, Ruhr-Universität Bochum, Germany

Editorial Board

Andrea Aliverti, Milano, Italy
Harold Bell, Hershey, Pennsylvania, USA
Dale Bergren, Omaha, Nebraska, USA
J.E. Butler, Sydney, Australia
James Butler
John Carroll
Thomas Dick, Cleveland, Ohio, USA
James Duffin, Toronto, Ontario, Canada
Jeffrey Fredberg, Boston, Massachusetts, USA
Ralph Fregosi, Tucson, Arizona, USA
Constancio Gonzalez, Valladolid, Spain
Zoltán Hantos, Szeged, Hungary
Craig Harms, Manhattan, Kansas, USA
Andrew Jones, Exeter, UK
David Katz, Cleveland, Ohio, USA
Michael Khoo, Los Angeles, California, USA
Greg King
Hirosuke Kobayashi, Sagamihara-Shi, Japan
Ichiro Kuwahira
Lu-Yuan Lee, Lexington, Kentucky, USA
James Leiter, Lebanon, New Hampshire, USA
Stephen Loring, Boston, Massachusetts, USA
Jason Mateika, Detroit, Michigan, USA
Bill Milsom, Vancouver, British Columbia, Canada
Norman Morris, Southport, Queensland, Australia
Jacopo Mortola, Québec, Quebec, Canada
Paul Pilowsky, Sydney, New South Wales, Australia
David Poole, Manhattan, Kansas, USA
Gary Sieck, Rochester, Minnesota, USA
Thomas Similowski, Paris, France
Christina Spengler, Zurich, Switzerland
Michael Stickland, Edmonton, Alberta, Canada
Kingman P. Strohl, Cleveland, Ohio, USA
Bradley Thach, St. Louis, Missouri, USA
Bradley Udem, Baltimore, Maryland, USA
Eric Verin, CHU de Rouen, France
Ioannis Vogiatzis, Athens, Greece
Stuart Wilson, Dundee, Scotland, UK

Kazuhiro Yamaguchi, Shinjuku-Ku, Japan
Jerry Yu, Louisville, Kentucky, USA
Gerald S. Zavorsky, Atlanta, Georgia, USA
Carlos Mantilla, Rochester, Minnesota, USA
Mark Bellingham, Brisbane, Queensland, Australia
Ganesh Kumar, Chicago, Illinois, USA

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Respiratory Physiology & Neurobiology publishes original articles and invited reviews concerning the field of respiration in its broadest sense. Although a special focus is on topics in neurobiology, high quality papers in respiratory molecular and cellular biology are also welcome, as are high quality papers in traditional areas, such as mechanics of breathing; gas exchange in lungs, gills, skin, and tissues; acid-base balance; respiration at rest and exercise; respiration in normal and unusual conditions, like high or low pressure or changes of temperature, low ambient oxygen; embryonic and adult respiration; comparative respiratory physiology. Papers on clinical aspects, articles on original methods, as well as theoretical papers are also considered as long as they foster the understanding of respiratory physiology.

1. The manuscript must contain the following sections, each starting on a new page: Title page
Abstract
Main text
References
Figure legends (if any)
2. The following items must be uploaded as separate files and in this sequence: Cover letter
Abstract (in addition to the Abstract contained in the main text file)
Rebuttal Notes (only for revised manuscripts)
Highlights
Graphical Abstract (optional)
Manuscript Figures (if any)
Tables (if any)

All figures must be prepared with all component panels in the same layout as in which they are to be printed.

Types of paper

Original Research Articles submitted to *Respir. Physiol. Neurobiol.* should deal with original research which has not been published previously, nor is being considered for publication elsewhere.

Short communications provide a rapid publication for short, concise papers dealing with original material within the scope of the journal. Short communications should not exceed 4 printed pages (about 8 manuscript pages), including up to 2 Figures, 1 Table and up to 10 References. Style of the manuscripts must otherwise conform with that of Original Research Articles (see below) and must, in particular, have an Abstract. The e-mail, telephone and fax number of the corresponding author must be given on the title page.

Frontiers Reviews are state-of-the-art reviews, prepared on invitation.

Book reviews are also prepared on invitation.

Letters to the Editor should only be submitted after consultation with the Editor

Commentaries are invited by the Editor, but all reviewers are encouraged to propose any accepted manuscript for a formal Commentary.

Contact details for submission

Papers should be submitted via the journal's Elsevier Editorial System site .

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
 - Full postal address
-

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
 - All figures (include relevant captions)
 - All tables (including titles, description, footnotes)
 - Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
 - Indicate clearly if color should be used for any figures in print
- Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable)
Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

Submission items

After entering the above information, you will be requested in a final step to upload the appropriate submission items. The following files must be uploaded when submitting a manuscript (* indicates mandatory files): *Cover letter *Abstract *Manuscript *Rebuttal notes (for revised manuscripts only) Figure(s) Table(s) Permission note(s) (if applicable) Supplementary material (optional) Other Cover Letter

Manuscripts submitted must be accompanied by a cover letter. It must state (a) that the work is original in that it has not been published before or submitted for publication elsewhere, and will not be submitted elsewhere before a decision has been taken as to its acceptability by *Respir. Physiol. Neurobiol.*; (b) that each author meets the criteria for authorship above and assumes the corresponding responsibility.

Abstract

Upload a separate file containing the Abstract. (The Abstract must also be part of the manuscript text file).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association \(Declaration of Helsinki\)](#) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex and gender](#) should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent

applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.
- The Author is entitled to post the [accepted manuscript](#) in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The [published journal article](#) cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peer-reviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below.

Gold open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is **USD 3000**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their

institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more.](#)

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Referees

Four potential referees must be indicated with names and email addresses. Indicate in the field Reason why a given referee is appropriate for reviewing your manuscript. Opposed reviewers can be entered on a separate site.

PREPARATION

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review.](#)

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article Structure

The text must be clear and concise, conforming to accepted standards of English style and usage. Non-native English speakers may be advised to seek professional help with the language (see Language Polishing, below). Manuscripts must be double spaced throughout with wide margins. Pages should be numbered in the following order: -Title page (separate page): Full title, not to exceed 100 characters and spaces; list of authors, marking corresponding author; laboratory of origin with full postal address (if more than one, indicate each author's affiliation by superscript a,b...); phone, fax numbers and e-mail of corresponding author; present address of authors and e-mail address, if applicable. -Abstract

page (separate page): Abstract not exceeding 160 words stating what was done, what was found, and what was concluded. References in the Abstract should give authors, year, journal, volume, and inclusive pages, e.g. Parisian et. al., *Respir. Physiol. Neurobiol.* 142: 127-143, 2004.

-Text pages (starting on a new page). The Introduction should introduce the problem and should present a brief yet comprehensive account of its history, quoting the relevant and important papers in the area. The Methods should be complete, but should resort to earlier publications if possible.

The Results should clearly document the main findings, which should be critically discussed in the Discussion. Repetition among these sections should be avoided. All headings/subheadings must be numbered, like 1., 2. etc/1.1, 1.2 etc.

-Acknowledgements. If present, should list (a) other contributors for whom authorship is not justified, e.g. technical help; (b) financial and material support. -References (starting on a new page) must be typed double spaced (for style, see below). -Figure legends - Figures and Tables (on separate pages; for style, see below). Nomenclature Standard nomenclature should be used throughout; unfamiliar or new terms, arbitrary abbreviations and trade names should be defined when first used, independently in the Abstract and in the main text. Unnecessary abbreviations and symbols are to be avoided.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are a short collection of bullet points that convey the core findings of the article. Highlights are optional and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Abstract not exceeding 160 words stating what was done, what was found, and what was concluded. References in the Abstract should give authors, year, journal, volume, and inclusive pages, e.g. Parisian et. al., *Respir. Physiol. Neurobiol.* 142: 127-143, 2004.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature

Standard nomenclature should be used throughout; unfamiliar or new terms, arbitrary abbreviations and trade names should be defined when first used, independently in the Abstract and in the main text. Unnecessary abbreviations and symbols are to be avoided.

Units and Symbols

[Symbols and Units click for pdf](#)

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

Upload each table separately and indicate the appropriate Table number in the Description box.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#).

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/respiratory-physiology-and-neurobiology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
 2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
 3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.
-

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999)... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon.* 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

All publications cited in the text should be presented in a list of references typed on separate pages, following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and publication dates are exactly the same in the text as in the reference list and vice versa. References to manuscripts which have not yet been accepted should not be listed in the reference list; refer to them in the text as "unpublished", listing names and initials of all authors. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed - if necessary - by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989)". If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and all co-authors should be mentioned. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on authors' names, and chronologically per author. References in the list must not be numbered. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1998a, 1998b, etc. The following are examples for the style of referencing:

Fencel, V., (1986). Acid-base balance in cerebral fluids. In: Cherniack, N.S., Widdicombe, J.G. (Eds.). *Handbook of Physiology, Section 3: The Respiratory System, Vol. II: Control of Breathing, part 1*. American Physiological Society, Washington, DC, pp. 115-140. Dejours, P., 1988. Respiration in Water and Air. Adaptations - regulation - evolution. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford. Kindig, C.A., Sexton, W.L., Fedde, M.R., Poole, D.C., 1998. Skeletal muscle microcirculatory structure and hemodynamics in diabetes. *Respir. Physiol.* 111, 163-175. *Respiratory Physiology & Neurobiology* should be referred to as *Respir. Physiol. Neurobiol.* Please note that the reference style in EndNote and RefMan which the journal uses is *Comp. Biochem. Physiol.*

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum

size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

MethodsX

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. MethodsX, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the [MethodsX website](#). Please use [this template](#) to prepare your MethodsX article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

Online Submission

Authors are requested to submit their manuscripts electronically, by using the EESubmit submission tool (EES) at <http://ees.elsevier.com/respnb/>.

After registration, authors will be asked to upload their article and associated artwork. The submission tool will generate a PDF file to be used for the reviewing process. The submission tool generates an automatic reply which incorporates the manuscript number for future correspondence.

Information to be entered into EES

Before uploading the necessary data files (see below), EES requests, step-by-step, to enter the following information:

Article Type: to be chosen from drop-down menu. For types, see above.

Title: The title must be entered into a special field.

Authors: All authors must be listed, in the sequence of the manuscript, with names and email address. The corresponding author must be registered in EES.

Classifications: These are selected from an online list and identify the scientific area of the manuscript.

Suggested referees: Four potential referees must be indicated with names and email addresses. Indicate in the field Reason why a given referee is appropriate for reviewing your manuscript. Opposed reviewers can be entered on a separate site.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).