

LAÍS MARIA CARDOSO CABRAL

**O envolvimento da inflamação mediada pela glia nas
alterações respiratórias observadas em um modelo murino
da Doença de Parkinson**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina Takakura

Versão corrigida.

São Paulo
2023

RESUMO

CABRAL, L. M. C. O envolvimento da inflamação mediada pela glia nas alterações respiratórias observadas em um modelo murino da Doença de Parkinson. 2023. 123 p. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2023.

A Doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela morte dos neurônios dopaminérgicos da porção compacta da Substância Negra (SNc) que promove os sintomas clássicos desta patologia, como tremor e bradicinesia. Apesar destes sintomas diminuírem a qualidade de vida dos pacientes, não são eles os principais responsáveis pelos óbitos associados a DP. As disfunções respiratórias respondem por grande parte das causas de morte desses pacientes e podem ter como causa falhas no controle neural da respiração. Estudos anteriores do nosso laboratório revelaram que ratos submetidos ao modelo experimental da DP induzido por injeções de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) no núcleo caudado-putamen (CPu) apresentaram degeneração em importantes áreas do controle neural respiratório como o complexo de Pre Botzinger (preBotC), o grupamento respiratório ventral rostral (rVRG), o núcleo do trato solitário (NTS) e o núcleo retrotrapezóide (RTN), associada a disfunções na respiração desses animais. Porém, as causas da neurodegeneração bem como das alterações respiratórias não estão estabelecidas nesse modelo, mas acredita-se que a neuroinflamação é uma possível candidata. A partir disto, o objetivo desta tese foi compreender mais detalhadamente a função da inflamação mediada pela glia nas alterações neuroanatômicas e funcionais respiratórias em camundongos submetidos ao modelo da DP induzido por 6-OHDA no CPu. Em um primeiro momento foi feito um estudo ao longo do tempo das alterações respiratórias e anatômicas em que camundongos C57BL/6 receberam injeção bilateral de 6-OHDA (10 µg/µl) ou veículo no CPu e foram submetidos à pletismografia de corpo inteiro 5, 10 ou 20 dias após a indução do modelo da DP. A lesão na SNc foi observada em todos os tempos analisados e está associada ao aumento da densidade astrocitária na região aos 10 e 20 dias e indícios morfológicos de ativação microglial. Foi observada neurodegeneração no preBotC aos 10 e 20 dias e no RTN a partir de 5 dias associada, também, a indícios de ativação da microglia. A partir do 10º dia após a indução do modelo foi encontrada redução da densidade astrocitária no RTN. A frequência respiratória basal foi reduzida a partir de 10 dias

após a indução do modelo e está associada ao aumento nos tempos inspiratório e expiratório. Para melhor compreender o papel da inflamação nestas alterações, os mesmos experimentos foram conduzidos em animais nocaute para o receptor 1 do fator de necrose tumoral alfa (TNFR1^{-/-}) e também em animais tratados com minociclina (45mg/kg). Nestes animais observamos redução do número de neurônios catecolaminérgicos na SNc, porém a neurodegeneração no RTN e no preBotC bem como as alterações respiratórias funcionais foram prevenidas. Estes resultados confirmam que, neste modelo da DP, os déficits respiratórios estão presentes e estão associados a degeneração de importantes áreas envolvidas no controle neural respiratório e que a inflamação, especialmente mediada pelo TNFR1, é fundamental para as alterações respiratórias encontradas neste modelo.

Palavras-chave: Doença de Parkinson. 6-OHDA. Respiração. Células da glia. Inflamação.

ABSTRACT

CABRAL, L. M. C. The involvement of glia-mediated inflammation on respiratory changes observed in a murine model of Parkinson's Disease. 123 p. Thesis (Ph.D. in Pharmacology) – Institute of Biomedical Science, University of São Paulo. 2023.

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease characterized by the death of dopaminergic neurons in the compact portion of the Substantia Nigra (SNc) which promotes the classic symptoms of this pathology, such as tremor and bradykinesia. Although these symptoms reduce the quality of life of patients, they are not the main cause of deaths associated with PD. Respiratory disorders are responsible for most of the causes of death in these patients and may be caused by failures in the neural control of breathing. Previous studies from our laboratory revealed that rats submitted to the experimental model of PD induced by 6-hydroxydopamine (6-OHDA) injections in the caudate-putamen nucleus (CPu) showed degeneration in important areas of respiratory control such as the Pre Botzinger complex (preBotC), the rostral ventral respiratory group (rVRG), the nucleus of tractus solitarius (NTS) and the retrotrapezoid nucleus (RTN), associated with respiratory dysfunctions. However, the causes of neurodegeneration as well as respiratory changes are not established in this model, but it is believed that neuroinflammation is a possible candidate. Based on this, the aim of this thesis was to understand the role of glia-mediated inflammation in neuroanatomical and respiratory functional changes in mice submitted to the PD model induced by 6-OHDA in CPu. First, a time-course study of respiratory and anatomical changes was conducted in which C57BL/6 mice received bilateral injection of 6-OHDA (10 µg/µl) or vehicle into the CPu and were submitted to whole-body plethysmography 5, 10 or 20 days after the PD model induction. SNc lesion was observed at all times analyzed and is associated with increased astrocytic density at 10 and 20 days as well as morphological evidence of microglial activation. Neurodegeneration was observed in the preBotC at 10 and 20 days and in the RTN after 5 days, also associated with evidence of microglia activation. From the 10th day after the PD model induction, a reduction in astrocytic density was found in the RTN. Basal respiratory frequency was reduced from 10 days after PD model induction and is associated with increased inspiratory and expiratory times. To understand the role of inflammation in these alterations, the same experiments were conducted in knockout animals for tumor necrosis factor receptor 1 alpha (TNFR1^{-/-}) and also in

animals treated with minocycline (45mg/kg). In these animals, we observed a reduction in the number of catecholaminergic neurons in the SNc, but neurodegeneration in RTN and preBotC, as well as functional respiratory alterations, were prevented. These results confirm that, in this PD model, respiratory deficits are present and are associated with degeneration of important areas involved in neural control of breathing and that inflammation, especially mediated by TNFR1, is fundamental for the respiratory changes found in this model.

Kew-words: Parkinson's Disease. 6-OHDA. Breathing. Glial cells. Inflammation.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Doença de Parkinson

Na literatura, a primeira descrição dos sintomas relacionados à Doença de Parkinson (DP) encontra-se no ensaio elaborado pelo médico James Parkinson em 1817, intitulado de “An Essay on the Shaking Palsy” em que ele descreve esta patologia como uma síndrome neurológica que promove tremor em repouso, lentidão de movimentos e, em alguns casos, ausência de movimentos voluntários (BLUM et al., 2001; GOETZ, 2011; PARKINSON, 2002). O médico acompanhou 6 casos clínicos e observou que a DP apresenta progressão muito lenta, já que em um dos casos estudados, decorreram 11 anos entre o início dos sintomas e uma condição mais grave da doença em que o paciente apresentava tremores intensos e dificuldade de executar tarefas simples do dia-a-dia (AQUINO et al., 2022; PARKINSON, 2002). Somente após aproximadamente 50 anos, em 1872, essa condição descrita por Parkinson como uma “paralisia agitante” foi renomeada, sendo chamada de DP por Jean-Martin Charcot (PRZEDBORSKI, 2017). Porém, até aquele momento, as características anatomopatológicas da doença ainda eram desconhecidas. Em 1919, Trétiakoff foi o primeiro pesquisador a reportar alterações anatômicas nos encéfalos de pacientes portadores da DP, quando observou uma despigmentação macroscópica em uma região do encéfalo chamada de Substância Negra (SN). Já por microscopia, observou uma redução do número de neurônios nesta região associada à presença de precipitados protéicos intracitoplasmáticos constituídos, principalmente, por ubiquitina, sinucleína e parkina, que em conjunto são chamados de corpos de Lewy (GRAZIA SPILLANTINI et al., 1998; LEES; HARDY; REVESZ, 2009; PRZEDBORSKI, 2017).

Atualmente, sabe-se que a DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum no mundo, sendo a Doença de Alzheimer a primeira. Estima-se que a prevalência da DP varia de 1 a 2 casos a cada 1000 indivíduos na população de modo geral. Já a incidência na população mais jovem, com idade abaixo dos 50 anos, é rara e aumenta consideravelmente com a idade, tendo seu pico na faixa dos 80 anos. Estudos epidemiológicos estimam que aproximadamente 2 a 3% da população acima de 60 anos possua a doença, sendo, então, o envelhecimento um importante fator de risco a ser considerado (ASCHERIO; SCHWARZSCHILD, 2016; POEWE et al., 2017). No Brasil, segundo uma estimativa realizada pelo Instituto Brasileiro de

Geografia e Estatística (IBGE), em 2010 aproximadamente 200.000 indivíduos eram portadores da DP. Com o aumento da expectativa de vida da população brasileira nos próximos anos, as projeções são de que esse número aumentará 441% em 2060, chegando a 881.457 pacientes portadores da DP neste ano (IBGE, 2013). Além disso, sabe-se que a DP atinge todas as classes econômicas e etnias, sendo universalmente distribuída (WHO, 2006). Fatores ambientais também devem ser considerados como fatores de risco para o desenvolvimento da DP: indivíduos que sofreram trauma craniano ou que se expõem constantemente a pesticidas possuem maior risco de desenvolver a DP, enquanto que fumantes ou consumidores de altas doses de cafeína apresentam risco menor (AQUINO et al., 2022; ASCHERIO; SCHWARZSCHILD, 2016). A razão da incidência em homens/mulheres varia entre 1.3 e 2.0 demonstrando que apesar de atingir ambos os sexos, a DP parece afetar um pouco mais os homens (ASCHERIO; SCHWARZSCHILD, 2016). Isso por que, segundo alguns estudos, as propriedades antioxidantes do hormônio estrogênio promoveriam um efeito protetor contra a DP em mulheres, porém esta informação ainda é controversa já que estudos caso-controle mostram resultados conflitantes acerca do papel do hormônio feminino no desenvolvimento desta patologia (AQUINO et al., 2022; RAGONESE et al., 2004; SAUNDERS-PULLMAN, 2003). Outro fator de risco amplamente estudado é a mutação genética, já que aproximadamente 20% dos pacientes portadores da DP relatam possuir algum parente próximo que também é portador da doença. Os genes mais estudados são o PINK1 - responsável por codificar proteínas que protegem contra a disfunção mitocondrial que ocorre nos neurônios em condições de estresse oxidativo - e o VPS35 – que codifica uma subunidade de um complexo envolvido no transporte retrógrado de proteínas do complexo de Golgi (AQUINO et al., 2022; ASCHERIO; SCHWARZSCHILD, 2016). Por fim, mais recentemente vem-se discutindo que disfunções no eixo intestino-cérebro também seriam um fator desencadeante da DP. Em 2019, um estudo publicado demonstrou que a injeção de α -sinucleína no estômago de camundongos promoveu um modelo da DP com disfunções motoras e degeneração em núcleos do tronco encefálico, dependentes do nervo vago, de forma muito parecida com a história natural desta doença (KIM et al., 2019). Assim, as variações presentes na população acerca dos fatores de risco da DP dificultam o entendimento pleno da sua etiopatogenia, sendo isto um grande desafio a ser elucidado pela ciência (AQUINO et al., 2022).

A DP é uma doença crônica, progressiva e idiopática que tem como característica patológica crucial a perda de neurônios dopaminérgicos localizados na porção compacta da SN (SNc), principalmente na região que se projeta para os núcleos caudado-putamen (CPu) presentes no estriado, levando, então, à redução da oferta de dopamina na via nigroestriatal (KALIA; LANG, 2015). A dopamina é um neurotransmissor que exerce uma importante função no mecanismo de recompensa e de regulação dos movimentos no cérebro. Sua síntese, assim como a de outras catecolaminas como a norepinefrina e epinefrina, tem como enzima limitante a tirosina hidroxilase (TH) que converte o aminoácido L-tirosina em L- dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Esta é a primeira catecolamina produzida pela cadeia de síntese das catecolaminas e, posteriormente, é convertida, pela ação da enzima dopa descarboxilase, à dopamina (JUÁREZ OLGUÍN et al., 2016).

A dopamina na via nigroestriatal regula os movimentos por meio de sua ação sobre os receptores dopaminérgicos pós-sinápticos presentes nos neurônios estriatais (KORCHOUNOV; MEYER; KRASNIANSKI, 2010; SMITH; VILLALBA, 2008). Um déficit em sua produção, como o que ocorre na DP, leva, portanto, a uma perda do equilíbrio e após aproximadamente a perda de 60% dos neurônios dopaminérgicos da SNc e de 80% dos níveis de dopamina no estriado aparecem os sintomas motores da DP (OBESO et al., 2000). Dentre esses sintomas pode-se citar o aumento da rigidez muscular, a bradicinesia (lentidão dos movimentos), o tremor em repouso e a instabilidade postural. Todas essas alterações estão relacionadas à perda de neurônios dopaminérgicos da SNc e, conseqüentemente, à redução da liberação de dopamina na via nigroestriatal (AGID, 1991).

Além dos sintomas clássicos relacionados ao movimento, os pacientes portadores da DP apresentam sintomas não-motores da doença, que também haviam sido descritos por James Parkinson em 1817. Alguns deles aparecem anteriormente aos sintomas motores da DP, em um estágio da doença chamado de período pré-motor ou podrômico que antecede até 20 anos o diagnóstico clínico. Estes sintomas incluem hiposmia, constipação, distúrbios do sono REM e depressão e tendem a se agravar nos estágios mais avançados da doença. Nos primeiros anos que sucedem o diagnóstico clínico, os pacientes passam a apresentar de forma mais expressiva sintomas como dor e fadiga até que, nos estágios mais avançados da DP a hipotensão ortostática e demência tornam-se altamente prevalentes (JAIN; GOLDSTEIN, 2012; LEES; HARDY; REVESZ, 2009; PFEIFFER, 2016).

Disfunções respiratórias são sintomas da DP não relacionados ao movimento que surgem cronicamente e se agravam nos estágios finais da doença, tornando-se responsáveis por mais de 70% dos óbitos dos pacientes. Essas disfunções podem ser classificadas como obstrutivas, restritivas, funcionais ou centrais quando há acometimento do controle neural da respiração no tronco encefálico (IZQUIERDO-ALONSO et al., 1994; MEHANNA; JANKOVIC, 2010; MEYER, 2009; NÓBREGA; RODRIGUES; MELO, 2008; SABATÉ et al., 1996).

Apesar dos grandes avanços obtidos com o progresso dos estudos sobre a DP, ainda faltam informações sobre sua etiopatogenia e não existe cura já que os tratamentos disponíveis atualmente, como a Levodopa e o Pramipexol, visam apenas a diminuição ou retardo dos sintomas clássicos associados à doença (LEES; HARDY; REVESZ, 2009; S et al., 2004).

É, então, de grande importância que novos estudos, como este, sejam direcionados para a investigação dos sintomas não clássicos da DP, em especial para a origem e desenvolvimento dos déficits respiratórios bem como formas de preveni-los e/ou tratá-los visando o aumento da qualidade e expectativa de vida dos pacientes portadores da DP.

1.2 Modelos animais da Doença de Parkinson

Na ciência, os modelos experimentais são grandes aliados dos pesquisadores pois permitem mimetizar as características fisiopatológicas e/ou comportamentais das doenças humanas. Os modelos de estudo da DP baseiam-se principalmente na administração de toxinas que promovem a lesão da via nigroestriatal em roedores e primatas, sendo elas: 1) A 6-hidroxidopamina (6-OHDA) administrada diretamente em locais específicos do sistema nervoso central (SNC); 2) Contaminantes da heroína sintética - 1-metil-4-fenil-1, 2, 3,6-tetrahidropiridina (MPTP) administrados cronicamente de forma endovenosa; 3) Herbicidas e pesticidas como a rotenona, paraquat e maneb; 4) Metais, como o manganês. Mais recentemente, com a descoberta de fatores genéticos relacionados à predisposição a esta doença, foram propostos os modelos transgênicos da DP, como os animais com mutação na proteína α -sinucleína, de forma a buscar uma alternativa aos modelos experimentais que preconizam a administração de neurotoxinas. O modelo deve ser escolhido com

base nas perguntas de cada estudo já que cada um possui diferentes indicações e limitações (BLANDINI; ARMENTERO, 2012; EMBORG, 2004).

Neste trabalho o modelo escolhido foi o da 6-OHDA. Seus efeitos foram primeiramente descritos há mais de 40 anos quando Porter e colaboradores descobriram que essa neurotoxina catecolaminérgica causava longa e eficiente depleção de norepinefrina nos nervos simpáticos que inervam o coração (BLANDINI; ARMENTERO; MARTIGNONI, 2008; KOSTRZEWA; JACOBOWITZ, 1974). Este análogo hidroxilado da dopamina não atravessa a barreira hematoencefálica, por isso deve ser injetado diretamente no local em que se deseja o efeito (BLANDINI; ARMENTERO, 2012; BLANDINI; ARMENTERO; MARTIGNONI, 2008). Ele é comumente utilizado como modelo de denervação cardíaca e induz a perda da atividade simpática em roedores (ARBAB, 1996; PORTER; TOTARO; BURCIN, 1965; PORTER; TOTARO; STONE, 1963; RAFFEL et al., 2006), macacos (GOLDSTEIN, 2003) e cachorros (GAUTHIER; NADEAU; DE CHAMPLAIN, 1972; GOLDSTEIN et al., 1991). Na literatura, existe a descrição de pelo menos três locais no SNC em que a 6-OHDA pode ser injetada para induzir um modelo de DP: 1) Diretamente na SNc, 2) No feixe prosencefálico medial ou 3) Na porção centro-lateral dos núcleos caudado-putâmen (CPu) (KONDO et al., 2004; TILLERSON et al., 2002). Os dois primeiros modelos geram uma resposta mais agressiva e mimetizam uma fase mais avançada da doença (DEUMENS; BLOKLAND; PRICKAERTS, 2002). Utilizamos, então, a injeção bilateral de 6-OHDA na porção centro-lateral do CPu, o qual é o modelo que melhor se aproxima do quadro de perda neuronal progressiva encontrada na DP em humanos. A partir de sua injeção, essa toxina é captada pelos terminais dos neurônios dopaminérgicos da SNc que se projetam para o CPu, promovendo a destruição retrógrada desses neurônios. Uma vez captada pelos transportadores de dopamina na fenda sináptica, a 6-OHDA promove disfunção mitocondrial (pela inibição dos Complexos I e IV mitocondriais) que leva a alterações da homeostase de cálcio (Ca^{2+}) e produção de radicais livres como H_2O_2 e superóxido nos neurônios dopaminérgicos da SNc (BLUM et al., 2001). Esses eventos levam ao estresse oxidativo (BLUM et al., 2001) e, conseqüentemente, morte desses neurônios por apoptose induzida por caspase 3 (TANAKA; OGAWA; ASANUMA, 2006; VAREŠLIJA et al., 2020). Já foi demonstrado, também, que o estresse oxidativo promove neuroinflamação local associada ao recrutamento de microglia e de respostas imunológicas desencadeadas

pela ativação do gene fator nuclear kappa B (NFκ-B) (BRIDGET MARTINEZ, 2018; GUO et al., 2018).

A escolha do presente modelo é justificada pelo fato de que trabalhos anteriores permitiram o estudo de sintomas da DP que não são relacionados ao movimento, como ansiedade, depressão, disfunção do trato gastrointestinal e disfunções cardiorrespiratórias, sem provocar alterações motoras severas que poderiam comprometer os resultados obtidos (CABRAL et al., 2020; DEUMENS; BLOKLAND; PRICKAERTS, 2002; FALQUETTO et al., 2017; FERNANDES-JUNIOR et al., 2018; LIMA et al., 2018; MCDOWELL; CHESSELET, 2012; OLIVEIRA et al., 2017, 2018, 2019; TILLERSON et al., 2002; TUPPY et al., 2015). Além disso, o uso da 6-OHDA é indicado para o estudo de possíveis tratamentos neuroprotetores principalmente quando injetada no CPu, como é o caso deste trabalho, pois permite a obtenção de uma maior janela temporal entre o momento da injeção da toxina e a neurodegeneração se comparado a outros locais de injeção que promovem morte neuronal mais rápida e severa. Assim, o tratamento terá maior tempo para agir aumentando as chances de detectar a neuroproteção (EMBORG, 2004).

1.3 O Controle Neural da Respiração

A respiração é um processo complexo amplamente coordenado por um conjunto de núcleos compartimentalizados localizados no bulbo e na ponte (**Figura 1**) (TOOR et al., 2019). Em repouso, a respiração eupneica é composta pela inspiração, fase em que há recrutamento e contração de músculos como o diafragma e os intercostais externos, e a expiração ou pós-inspiração, um processo passivo em que essa musculatura relaxa. Em situações onde é observado um aumento da demanda metabólica, a expiração passa a ocorrer de forma ativa recrutando a musculatura abdominal e os músculos intercostais internos (DEL NEGRO; FUNK; FELDMAN, 2018).

A inspiração é um processo ativo, gerada e coordenada pelo complexo de Pre-Botzinger (preBotC), localizado na coluna respiratória ventral (CRV), onde existem neurônios ritmogênicos predominantemente glutamatérgicos, cujos axônios atravessam a linha média e se projetam para os neurônios pré-motores localizados também no bulbo e que, por sua vez, se projetam para neurônios motores localizados em regiões medulares que controlam a musculatura envolvida na inspiração. Algumas subpopulações de neurônios do preBotC, bem como de toda a CRV, expressam o

receptor para Substância P do tipo neurocinina 1 (NK1R), sendo este receptor, então, um biomarcador da CRV (DEL NEGRO; FUNK; FELDMAN, 2018). Já a expiração passiva é controlada principalmente pelo complexo de Botzinger (BotC), também localizado na CRV, que é composto basicamente por neurônios inibitórios glicinérgicos que auto-regulam a atividade deste núcleo e também atuam inibindo o preBotC, dando origem à expiração passiva (DEL NEGRO; FUNK; FELDMAN, 2018; SMITH et al., 2009).

A CRV contém, também, mais dois núcleos compostos por neurônios pré-motores: o grupamento respiratório ventral caudal (cVRG) que possui neurônios pré-motores expiratórios glutamatérgicos que participam da expiração ativa e o grupamento respiratório ventral rostral (rVRG) que possui neurônios pré-motores inspiratórios glutamatérgicos (DEL NEGRO; FUNK; FELDMAN, 2018) que recebem as projeções do preBotC.

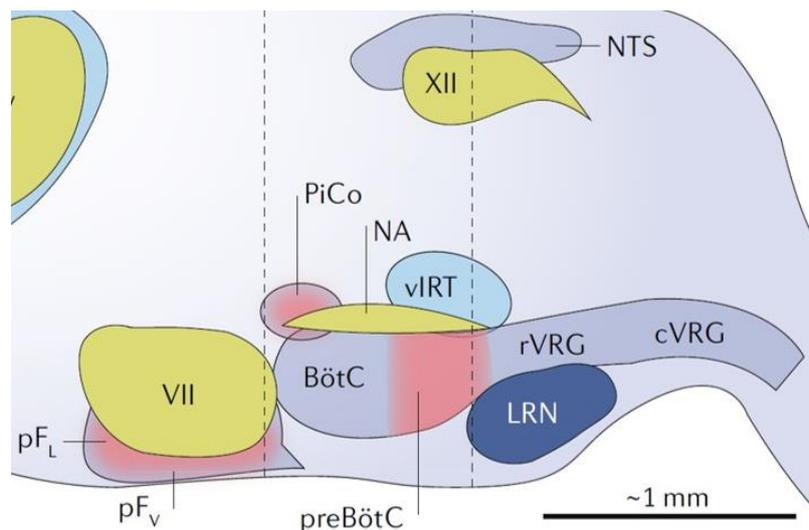


Figura 1. Esquema de um corte sagital do tronco encefálico de rato mostrando a localização anatômica dos núcleos envolvidos no controle neural da respiração. A coluna respiratória dorsal é composta pelo NTS, localizado dorsalmente ao XII. Compondo a coluna respiratória ventral estão os núcleos cVRG, rVRG, preBotC e BotC sendo os dois últimos localizados ventralmente ao NA. Por fim, o RTN (ou pFv) se localiza ventralmente ao VII. Abreviações: NTS: núcleo do trato solitário; XII: núcleo hipoglosso; PiCo: complexo Pós-Inspiratório; NA: núcleo ambíguo; vIRT: formação reticular intermediária ventral; cVRG: grupamento respiratório ventral caudal; rVRG: grupamento respiratório ventral rostral; preBotC: complexo de pre Botzinger; BotC: complexo de Botzinger; LRN: núcleo reticular lateral; VII: núcleo motor do facial; pFL: grupamento parafacial lateral; pFv: grupamento parafacial ventral (ou RTN). (Figura modificada de Del Negro et al. 2018).

O núcleo do trato solitário (NTS) é uma região que desempenha um papel fundamental na transmissão de informações viscerais aferentes para o tronco encefálico e a medula espinhal. Com relação aos sistemas cardiovascular e respiratório, duas porções do NTS são preferencialmente envolvidas: o NTS intermediário (NTSi) e o NTS comissural (NTSc) (ZOCCAL et al., 2014). Além disso, o NTS compõe a coluna respiratória dorsal (CRD) e é uma região do bulbo que se constitui de neurônios com diversos fenótipos, como glutamatérgicos, GABAérgicos, glicinérgicos e neurônios que expressam o fator de transcrição PHOX2B. Esses neurônios apresentam atividade inspiratória, pós-inspiratória e expiratória, além de atuar modulando a atividade dos neurônios respiratórios da ponte e da CRV (BIANCHI; DENAVIT-SAUBIE; CHAMPAGNAT, 1995; STORNETTA et al., 2006; SUBRAMANIAN; CHOW; BALNAVE, 2007).

Outra importante região envolvida no controle neural da respiração é o núcleo retrotrapezoide (RTN) e/ou grupamento respiratório parafacial ventral (pF_v). Essa região bulbar se localiza ventralmente ao núcleo motor do facial e possui neurônios excitatórios que expressam o fator de transcrição PHOX2B. Esses neurônios contêm os quimiorreceptores centrais e atuam modulando a atividade dos neurônios da CRV de acordo com as concentrações de CO₂ e H⁺ no sangue arterial (GUYENET et al., 2012, 2019; TAKAKURA et al., 2008, 2014). Além do RTN, outras regiões encefálicas também possuem receptores capazes de detectar alterações nessas concentrações, como é o caso do Locus Coeruleus (LC), um núcleo pontino formado por neurônios catecolaminérgicos. Um estudo mostrou que, em ratos submetidos ao modelo da DP induzido por 6-OHDA, essa região é uma forte candidata a compensar a atividade quimiorreflexa central frente a degeneração do RTN (OLIVEIRA et al., 2017).

Mais recentemente, em 2016, Anderson e colaboradores propuseram uma nova região para o controle neural da respiração: o complexo pós-inspiratório (PiCo). Esta região se localiza no bulbo, dorsalmente ao preBotC, possui atividade pós inspiratória e contém neurônios colinérgicos, ritmogênicos e excitatórios que disparam de forma semelhante aos neurônios do preBotC, porém na fase correspondente à expiração passiva ou pós-inspiração (ANDERSON et al., 2016; RAMIREZ; ANDERSON, 2017).

1.4 Distúrbios respiratórios na Doença de Parkinson

Nos estágios mais avançados da DP, é observado o surgimento de alterações respiratórias que são uma das principais causas de morbidade e mortalidade desta

doença e que já haviam sido reportadas em 1817 por James Parkinson (MEHANNA; JANKOVIC, 2010; TORSNEY; FORSYTH, 2017). Sabe-se que a obstrução de vias aéreas superiores, reportada em mais de 33% dos casos (TORSNEY; FORSYTH, 2017), diminuição da complacência da caixa torácica e discinesias musculares podem causar dispneia, hipoventilação e atelectasias facilitando, assim, um quadro de pneumonia causada por aspiração (WERMUTH et al., 1995).

Porém, além de ocorrerem por comprometimento motor de estruturas envolvidas com a respiração, os déficits respiratórios podem ter como origem falhas no controle neural da respiração que podem ser explicadas, em parte, pela hipótese elaborada por Braak (**Figura 2**) que sugere haver um comprometimento precoce do tronco encefálico, com a degeneração seletiva de neurônios dopaminérgicos no bulbo de pacientes portadores da DP (BRAAK; BRAAK, 2000; TORSNEY; FORSYTH, 2017). Em 2003, Benarroch e colaboradores demonstraram, em um estudo *post mortem*, que os encéfalos de pacientes portadores da DP apresentavam redução na marcação de NK1R em uma região muito próxima ao preBotC, o centro gerador do ritmo respiratório (BENARROCH et al., 2003). Mais tarde, em 2011, Seccombe e colaboradores observaram que pacientes portadores da DP que não apresentavam alterações no fluxo e volumes pulmonares tiveram resposta ventilatória normal frente à hipóxia, mas quando foram expostos à hipercapnia a resposta ventilatória reflexa foi reduzida, levando, portanto, à sugestão de que estes pacientes estariam apresentando um déficit na sensibilidade central às alterações na concentração de CO₂ (SECCOMBE et al., 2011).

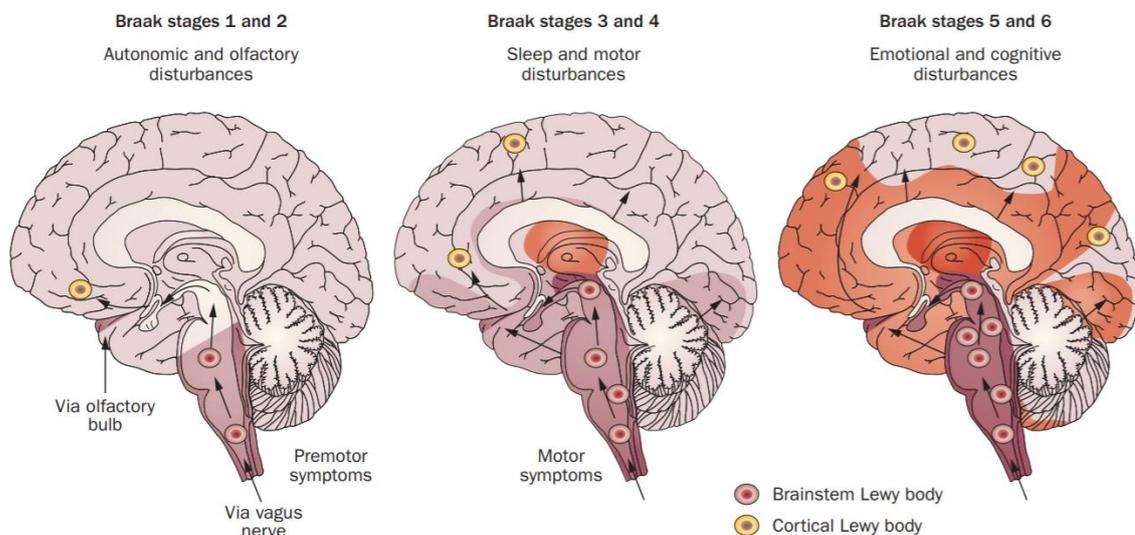


Figura 2. Escala de Braak. Nos estágios 1 e 2 da escala de Braak, há comprometimento autônomo e distúrbios olfatórios causados pela chegada dos corpos de Lewy no bulbo, na ponte e no bulbo olfatório. Nos estágios 3 e 4, os corpos de Lewy alcançam estruturas mesencefálicas, como a Substância Negra compacta, e o córtex causando distúrbios motores e do sono. Nos últimos estágios, 5 e 6, os corpos de Lewy alcançam novas áreas do córtex provocando distúrbios emocionais e cognitivos (Figura obtida de Doty 2012).

Este novo achado dá suporte aos dados que mostram que a obstrução de vias aéreas superiores pode ser uma das causas de morte em pacientes com DP (MEHANNA; JANKOVIC, 2010): o paciente apneico apresenta paradas respiratórias que diminuem a ventilação alveolar, levando à dessaturação de oxihemoglobina que, em um episódio mais longo de apneia respiratória, pode levar ao aumento da pressão parcial de CO₂ (PaCO₂) no sangue arterial. Esse aumento é detectado pelo centro respiratório localizado no bulbo e com isso a ventilação é aumentada junto a possíveis episódios de microdespertares quando a apneia ocorrer durante o sono (GORETTI DE LANDA; SUZUKI, 2009). Havendo um déficit na detecção de alterações na PaCO₂ na DP, o paciente em um episódio de apneia poderia ir à óbito por não apresentar os mecanismos reflexos que permitiriam a recuperação de sua ventilação alveolar.

Outro problema que pode ser observado nos pacientes portadores da DP é a disfagia que pode levar à aspiração de alimentos e até da própria saliva, causando, conseqüentemente, um quadro de pneumonia (SIMONS, 2017). A respiração necessita ser amplamente coordenada com outros comportamentos como a vocalização e a deglutição que ocorrem na fase pós-inspiratória do ciclo respiratório. Falhas neste processo podem levar, então, a um quadro de pneumonia por aspiração (ANDERSON et al., 2016). No bulbo, o PiCo é a região responsável por controlar a pós-inspiração e na DP pode ser que esta região esteja com atividade prejudicada.

Nosso laboratório se dedica, então, a estudar os déficits respiratórios e alterações neuroanatômicas, com foco em regiões de controle neural respiratório, que ocorrem em um modelo animal da DP induzido por 6-OHDA. Em dois de nossos estudos, os autores demonstraram que ratos que receberam injeção de 6-OHDA no CPU apresentaram alterações respiratórias basais a partir do 40º dia após a lesão da SNc e esse efeito perdurou pelo menos até o 60º dia. Nesses animais também se observou uma intensa redução no número de neurônios dopaminérgicos da SNc, mas também de regiões que controlam a respiração no bulbo, como os neurônios PHOX2B do RTN e do NTS e da densidade de NK1R do preBotC e do rVRG. Além disso, esse mesmo

estudo mostrou que a resposta respiratória induzida por hipercapnia também está reduzida 40 e 50 dias após a lesão (FERNANDES-JUNIOR et al., 2018; TUPPY et al., 2015). Em camundongos, também foi mostrada disfunção respiratória nesse modelo sem associação de alterações musculares respiratórias, demonstrando que essa disfunção ocorre por meio de mecanismos centrais (OLIVEIRA et al., 2019).

Apesar dos achados obtidos, as causas da neurodegeneração encontrada em núcleos respiratórios neste modelo e também nos encéfalos dos pacientes portadores da DP ainda não são conhecidas. Muitos mecanismos podem levar à morte neuronal, como a excitotoxicidade glutamatérgica, o estresse oxidativo, rompimento da barreira hematoencefálica, perda de conexões neuronais ou ainda a neuroinflamação mediada pelas células da glia como os astrócitos e as microglias (FRICKER et al., 2018). Em ratos induzidos ao modelo da DP por 6-OHDA, o tratamento com apocinina, um inibidor não específico da NADPH oxidase, foi capaz de prevenir alterações respiratórias anatômicas e funcionais descritas nesse modelo mostrando que o estresse oxidativo tem importância fundamental para a morte neuronal neste modelo (NASCIMENTO et al., 2022). Porém, como descrito no item 1.2 desta tese, o estresse oxidativo também pode induzir respostas inflamatórias. Assim, entender a função da inflamação neste processo de degeneração que ocorre no modelo 6-OHDA da DP também é necessário e é o foco de estudo desta tese.

Conhecer plenamente os mecanismos que levam à morte neuronal é de grande importância não apenas para prevenir ou diminuir os sintomas motores desta doença, mas também para que se possa evitar a degeneração de outras regiões do SNC, como os núcleos que controlam a respiração e, com isso, minimizar os déficits respiratórios observados na DP, podendo aumentar a qualidade e expectativa de vida destes pacientes.

1.5 Células da glia: Função na fisiologia e nas doenças neurodegenerativas

A morte neuronal, como dito anteriormente, pode ocorrer como consequência de diferentes e complexos mecanismos. Nas doenças neurodegenerativas como a DP e a doença de Alzheimer, esses mecanismos ainda não foram totalmente elucidados, mas muito está sendo estudado sobre a influência da neuroinflamação sobre a degeneração encontrada nestas patologias, processo que envolve a participação de células da glia como a microglia ativada e os astrócitos reativos no parênquima encefálico (VIVEKANANTHAM et al., 2015).

As células da glia, junto dos neurônios e células endoteliais, formam o tecido nervoso e ocupam aproximadamente metade do volume encefálico (JESSEN, 2004). Por muito tempo, essas células foram conhecidas apenas por darem suporte ao encéfalo, não sendo atuantes, diretamente, do funcionamento do sistema nervoso. Em 1858, foi feita a primeira descrição das células da glia pelo patologista alemão Rudolf Virchow, quando ele observou a existência de uma substância conectiva no cérebro e na medula que embebia os elementos do tecido nervoso. O médico deu a essa substância, que mais tarde seria conhecida como neuroglia, o nome de *nervenkitt* (cimento de nervo, em alemão) (GOMES; TORTELLI; DINIZ, 2013).

Atualmente, com os avanços na ciência, o entendimento do papel dessas células na fisiologia e na patologia neurais foi aprimorado. Hoje, sabe-se que a glia é formada por dois tipos de células distintos tanto no aspecto morfológico quanto funcional: a macroglia e a microglia. A microglia tem origem mesodermal, ao passo que a primeira tem origem ectodermal e é composta por três subtipos celulares: 1) A astroglia, incluindo os astrócitos; 2) Os oligodendrócitos, responsáveis pela formação da bainha de mielina que reveste os axônios dos neurônios no SNC e 3) As células ependimárias ou ependimócitos que são responsáveis pela produção do líquido cefalorraquidiano e revestem o canal central da medula e os ventrículos presentes no encéfalo (GOMES; TORTELLI; DINIZ, 2013).

Como dito anteriormente, no processo de neuroinflamação, que vem sendo muito estudado no campo das doenças neurodegenerativas, as principais células envolvidas são os astrócitos e a microglia. Assim, nesta tese, discutimos o papel destas células em regiões específicas do bulbo que controlam a respiração em camundongos induzidos ao modelo da DP por 6-OHDA.

1.5.1 Astrócitos

Os astrócitos são as células gliais presentes em maior número no tecido nervoso. Por muito tempo, sua função foi reduzida apenas ao suporte às células do SNC, porém, hoje, sabe-se que estas células atuam como uma interface entre neurônios e vasos sanguíneos e são parte formadora da estrutura da barreira hematoencefálica, mediando a relação entre neurônios e o fluido cérebro-espinhal (GOMES; TORTELLI; DINIZ, 2013; LEE, 2015; TESCHEMACHER; GOURINE; KASPAROV, 2015). Os astrócitos são, também, participantes ativos na regulação da função sináptica e na absorção de neurotransmissores e participam de ajustes metabólicos ao regular o tônus vascular encefálico, permitindo, assim, controlar o fluxo sanguíneo do encéfalo

em meio a diferentes demandas metabólicas. Sabe-se, também, que controlam a concentração extracelular de íons e o transporte de água (ANDERSON; SWANSON, 2000; ERLICHMAN; LEITER; GOURINE, 2010; FREEMAN, 2010; LEE, 2015; TESCHEMACHER; GOURINE; KASPAROV, 2015).

Uma gama de estudos indica que os astrócitos também desempenham importante papel no controle neural da respiração. No preBotC, estudos mostram que existem astrócitos com atividade rítmica similar a dos neurônios encontrados nesta região e que estes astrócitos são morfologicamente mais complexos do que os localizados em outras áreas do tronco encefálico (FORSBERG; HERLENIUS, 2019; SHEIKHBAHAEI et al., 2018). Outra função dos astrócitos que está sendo estudada diz respeito à sua capacidade de responder ativamente a alterações de gases sanguíneos e pH, aumentando a concentração intracelular de Ca^{2+} e liberando trifosfato de adenosina (ATP), que atua sobre os neurônios. Sua localização estratégica meio a uma rede complexa de interações neurais e vasculares parece lhe conferir esta função de quimiossensibilidade central (ERLICHMAN; LEITER; GOURINE, 2010; GOURINE et al., 2010). Em regiões específicas do bulbo, como a superfície ventral (mais especificamente no RTN), os astrócitos ativados em resposta a queda de pH e/ou aumento de CO_2 ou ainda por meio de ferramentas biotecnológicas como a estimulação optogenética, liberam ATP e ativam os neurônios localizados nesta região, estimulando a respiração (GOURINE et al., 2010).

Os astrócitos, então, como visto até aqui, desempenham importantes funções na manutenção da homeostase do sistema nervoso sendo indispensáveis, portanto, para a sobrevivência neuronal. Sendo assim, por esse raciocínio, alterações na função ou até mesmo a perda de função astrocitária podem contribuir para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (PHATNANI; MANIATIS, 2015). Nestas doenças, como a DP, existem evidências de que os astrócitos participam da resposta imune inata do SNC ao reagirem a perturbações com aumentos na expressão do filamento intermediário, como a proteína glial fibrilar ácida (GFAP), hipertrofia e proliferação celular, produções de citocinas e quimiocinas, formação de cicatrizes gliais e recrutamento de microglias para a área lesada. Em conjunto, esse processo é denominado astrogliose reativa (GALLO; DENEEN, 2014; SOFRONIEW, 2009; SOFRONIEW; VINTERS, 2010). Além disso, sabendo que os astrócitos produzem várias moléculas neurotróficas, incluindo o fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF) que é importante para o desenvolvimento e sobrevivência de neurônios

dopaminérgicos, pode-se inferir que disfunções astrocitárias poderiam ser um fator determinante para a patogênese da DP (BOOTH; HIRST; WADE-MARTINS, 2017). De fato, na DP, estudos mostram haver astrogliose reativa na região da SNC (MCGEER; MCGEER, 2008).

Em nosso laboratório, estudos recentes realizados em ratos demonstraram ocorrer perda astrocitária em importantes áreas encefálicas envolvidas na geração da atividade/controla ventilatório em ratos que receberam injeção de 6-OHDA no CPu. Sessenta dias após a indução da DP, observou-se redução na densidade astrocitária, quantificada por meio da marcação de GFAP, no NTSc, NTSi e no preBotC. No RTN, foi observada redução a partir de 40 dias após a injeção de 6-OHDA no CPu e no rVRG essa redução foi observada a partir de 30 dias pós indução da DP (FERNANDES-JUNIOR et al., 2018).

1.5.2 *Microglia*

As microglias fazem parte do mecanismo de defesa imunológica intrínseco do SNC. Este tipo celular assemelha-se aos macrófagos, executando a função de reparo de danos e regulação do sistema imunológico (CHHOR et al., 2013) por meio de um processo chamado microgliose reativa no qual ocorre manutenção ou supressão da resposta imune e liberação de citocinas (ASCHNER, 1998). É importante ressaltar que estas células do SNC são altamente dinâmicas já que seus prolongamentos retraem e se projetam constantemente, e apresentam diversos fenótipos, variando entre células hiper-ramificadas, quando estão em estado de vigilância, e células ameboides ou pouco ramificadas e com soma maior em situações que demandam ativação desse tipo celular (ZHOU et al., 2018)(SAVAGE, 2019).

A ativação da microglia que se dá, por exemplo, por meio da ativação de receptores do tipo Toll Like Receptors (pertencentes a família de receptores de reconhecimento de padrão), é de fundamental importância para o funcionamento do sistema nervoso por controlar o ambiente neuronal e induzir efeitos benéficos sobre as células circundantes (LONG-SMITH; SULLIVAN; NOLAN, 2009; SAIJO; CROTTI; GLASS, 2013). Porém, quando esta ativação é exacerbada e persistente, ocorre a morte do tecido nervoso sadio, o que é característico das doenças neurodegenerativas, em que se sabe que a microgliose reativa está presente (GAO; HONG, 2008; LONG-SMITH; SULLIVAN; NOLAN, 2009).

Atualmente, sabe-se que este dano neuronal causado pela microglia ocorre principalmente devido à produção do fator de necrose tumoral- α (TNF- α). A ação dessa citocina ocorre pela ativação dos receptores TNFR1 e TNFR2, sendo que sua ação pró-inflamatória se dá por meio da ativação do primeiro, que possui um domínio intracelular de morte envolvido com a indução de apoptose (KUNO et al., 2005; LENG et al., 2005). Quando o receptor TNFR1 é ativado ocorre produção de citocinas pró-inflamatórias, óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS), que levam ao dano neuronal progressivo característico de doenças neurodegenerativas (KUNO et al., 2005). Um modelo animal knockout para TNFR1, como o que utilizamos neste estudo, faz-se de grande utilidade para o estudo da importância da ativação deste receptor na morte neuronal encontrada no modelo de DP induzido por 6-OHDA. Esse modelo animal já foi utilizado na literatura para o estudo da função do TNF- α no desenvolvimento da resposta imunológica e também do papel do TNFR1 na resposta da ouabaína no hipocampo (KINOSHITA et al., 2022; PASPARAKIS et al., 1996)

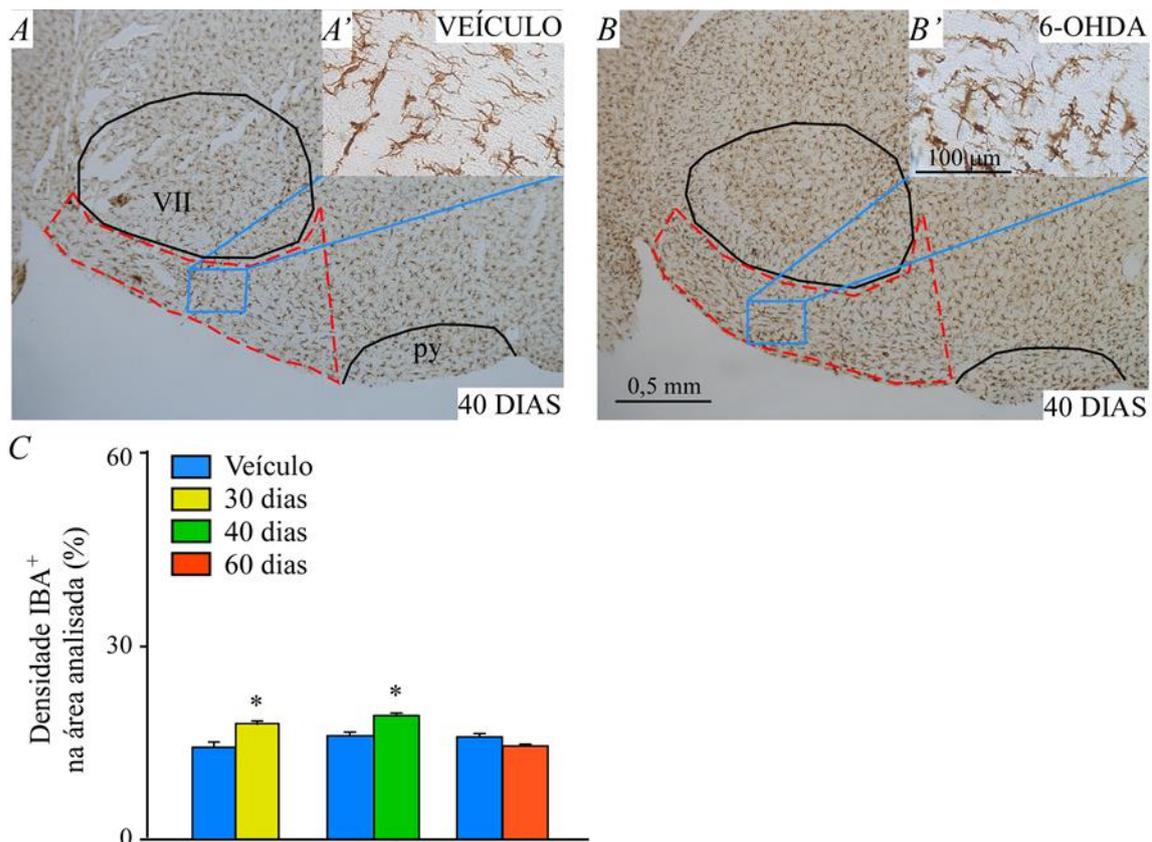


Figura 3. Efeito da injeção bilateral de 6-OHDA no CPu sobre a expressão de Iba1 no RTN. Fotomicrografias do RTN de ratos que receberam injeção bilateral de veículo (A) ou 6-OHDA (24 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) e foram sacrificados 40 dias após a injeção da toxina (B). C) Porcentagem de densidade de imunorreatividade para Iba1 na área analisada do RTN 30, 40 ou 60 dias após injeção de veículo ou

6-OHDA no CPu. Teste- t, * $p < 0,05$ (diferente de respectivo veículo). Abreviações: py, pirâmide; VII, núcleo facial (Carvalho, KS. 2017).

Em ratos que receberam injeção de 6-OHDA com a finalidade de induzir a DP, foi observado um aumento microglial na região da SNc (AKIYAMA; MCGEER, 1989; DEPINO et al., 2003). Com base nisto, buscando entender se há alterações microgliais em regiões neurais de controle respiratório na DP, um estudo ainda não publicado do nosso laboratório demonstrou que em ratos que receberam injeção de 6-OHDA no estriado ocorreu, após 30 e 40 dias, aumento na quantidade de células da microglia no RTN, representado pela densidade da proteína ligante de actina cruzada (Iba1) (**Figura 3**). Estes dados sugerem, portanto, que ocorre uma neuroinflamação local que pode justificar a redução tanto neuronal quanto astrocitária na região do RTN, acrescentando à literatura mais uma informação sobre a função da microglia na DP.

Diante das evidências que mostram a importância da microglia para regular processos do desenvolvimento neural e capacidade de aumentar a expressão de RNA mensageiro (RNAm) que codificam citocinas e fatores inflamatórios, o tratamento com um anti-inflamatório pode ser uma possibilidade para avaliar as respostas inflamatórias e respiratórias ocasionadas pelo modelo da DP.

A minociclina (7-dimethylamino-6-dimethyl-6-deoxytetracycline) é uma tetraciclina semi-sintética de segunda geração, eficaz contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Ela é rapidamente e completamente absorvida, possui uma meia-vida longa e apresenta uma excelente absorção tecidual com aproximadamente 100% de biodisponibilidade (BROGDEN et al., 1975; ZARZUELO; GÁLVEZ, 2013). Além disso, é altamente lipofílica e pode facilmente atravessar a barreira hematoencefálica (ZARZUELO; GÁLVEZ, 2013).

Seu mecanismo de ação anti-bacteriano se dá pela ligação reversível à região H34 da subunidade 30S dos ribossomos das bactérias resultando na perda da formação de peptídeos e inibição do crescimento bacteriano, sendo então, um agente bacteriostático (ASADI et al., 2020). Porém, além disso, sabe-se que este fármaco possui outras propriedades atuando também como um agente anti-apoptótico, anti-oxidante e, também, anti-inflamatório (LOREA-HERNÁNDEZ et al., 2016; SANTISTEBAN et al., 2015).

Um dos primeiros relatos da capacidade da minociclina em exercer um papel anti-inflamatório, inibindo a atividade da microglia, foi descrita por Yrjänheikki e colaboradores em 1998 e, desde então, essa tetraciclina tem sido utilizada como ferramenta em inúmeros estudos com objetivo de avaliar a atividade microglial (LOPEZ-RODRIGUEZ et al., 2015; LOREA-HERNÁNDEZ et al., 2016; SANTISTEBAN et al., 2015; YRJÄNHEIKKI et al., 1998). Para exercer suas propriedades anti-inflamatórias, a minociclina é capaz de realizar seu papel inibitório prevenindo a degradação da subunidade inibitória I κ B, e assim, reduzir a translocação NF κ -B para o núcleo e sua consequente ativação, o que resulta em uma diminuição na transcrição de mediadores pró-inflamatórios, como por exemplo as citocinas interleucina 6 (IL-6), IL1- β e TNF- α (YRJÄNHEIKKI et al., 1998; ZARZUELO; GÁLVEZ, 2013). Mais especificamente, na microglia, sabe-se que a minociclina inibe diversos componentes presentes nesse tipo celular, como: o co-transportador 2 de cloreto de potássio (KCC2), o receptor de quimiocina C 3 (CXCR3), o complexo de histocompatibilidade classe II (MHCII) e, também o receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR). A minociclina também inibe a atividade astrocitária por meio da supressão da ativação do NF- κ B e também da inibição do CXCR3 (ZHOU et al., 2018) (**Figura 4**).

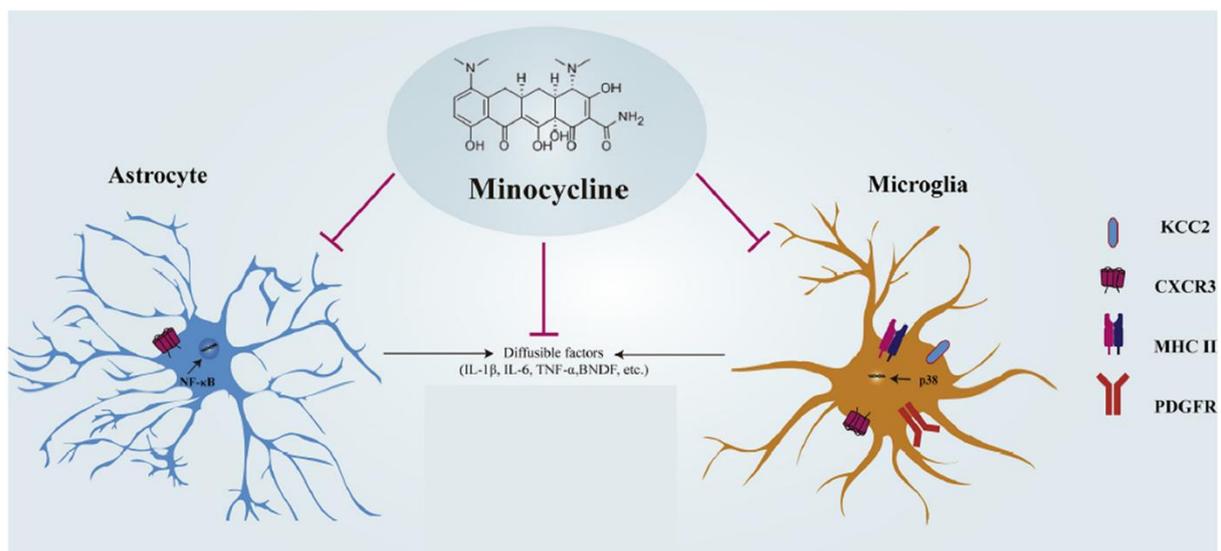


Figura 4. Esquema ilustrando os efeitos da minociclina sobre as células da glia e fatores pró-inflamatórios. Abreviações: BDNF: fator neurotrófico derivado de cérebro; IL-1 β : interleucina 1 β ; IL-6: interleucina 6; KCC2: co-transportador de cloreto de potássio 2; MHC II: complexo de histocompatibilidade classe II; NF- κ B: fator nuclear kappa B; PDGFR: receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas; TNF- α : fator de necrose tumoral α (Modificado de Zhou et al. 2018).

A minociclina apresenta estrutura orgânica bastante similar à vitamina E, podendo ser classificada como um antioxidante fenólico. Para exercer tal atividade, ela atua suprimindo a produção celular de H₂O₂, superóxido e peroxinitrito (ZARZUELO; GÁLVEZ, 2013). Por fim, suas propriedades anti-apoptóticas se justificam já que, na literatura, é mostrado que a minociclina inibe a liberação de Smac e do citocromo-C pelas mitocôndrias, o gene p53, a Apaf-1, a ativação de caspases e, também, proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 (Bax, Bad e Bid). Por outro lado, é capaz de estimular as proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xl, também membros da família Bcl-2 (ZARZUELO; GÁLVEZ, 2013) (Figura 5).

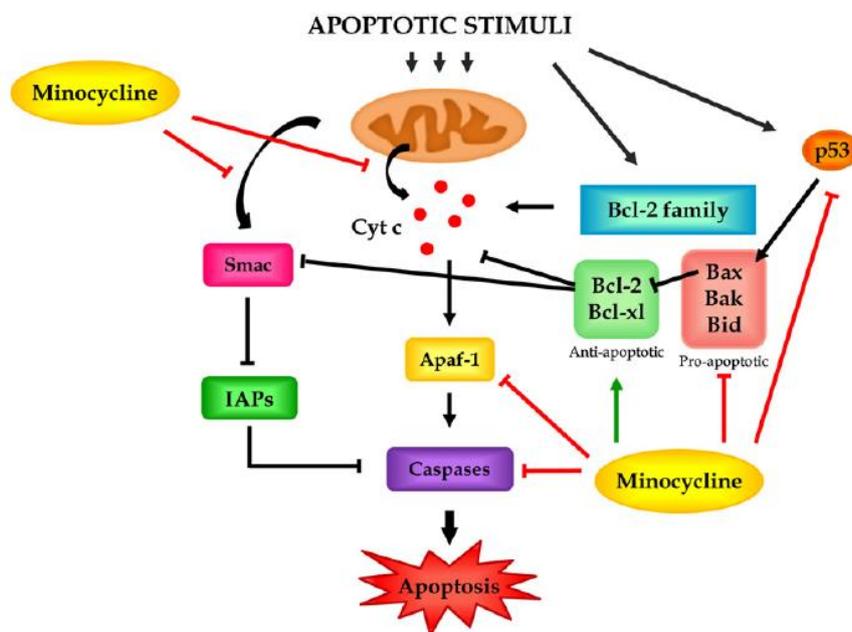


Figura 5. Esquema ilustrando os efeitos da minociclina sobre as vias intra-celulares que promovem a apoptose. Abreviações: Smac: segundo ativador de caspase derivado de mitocôndria; IAPs; proteínas inibidoras de apoptose; Cyt c: citocromo C; Apaf-1: Fator de ativação de protease apoptótica 1; Bcl-2: linfoma de células B 2; Bax: proteína X associada a Bcl-2; Bak: antagonista homólogo de Bcl-2; Bid: Agonista de morte que interage com o domínio BH3 (obtida de Zarzuelo e Gálvez, 2013).

A partir de todas essas informações consideramos a minociclina como uma excelente ferramenta farmacológica para entendermos a importância da microglia sobre as respostas respiratórias e neuroanatômicas desencadeadas pelo modelo experimental da DP.

8 CONCLUSÃO

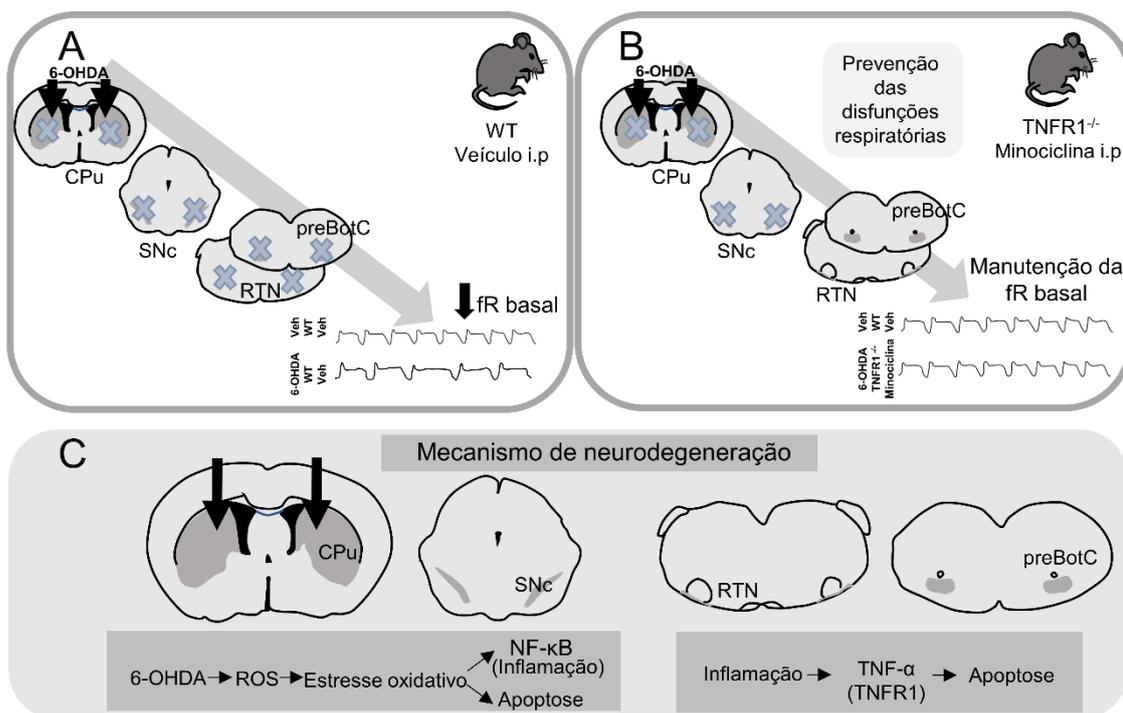


Figura 31. Resumo dos resultados descritos nesta tese. (A) Esquema ilustrando as alterações anatômicas e funcionais promovidas pela injeção de 6-OHDA no CPu: uma vez injetada no CPu, a 6-OHDA promove lesão local e é captada pelos terminais dos neurônios dopaminérgicos da região promovendo lesão retrógrada dos neurônios da SNc. No RTN e no preBotC ocorre degeneração neste modelo da DP induzido por 6-OHDA, e como consequência da morte neuronal no centro gerador do ritmo respiratório (preBotC), observa-se redução da frequência respiratória basal. (B) Esquema ilustrando as alterações anatômicas e funcionais promovidas pela injeção de 6-OHDA no CPu de animais $TNFR1^{-/-}$ ou tratados com minociclina i.p.: a injeção de 6-OHDA no CPu ainda promove degeneração local neste núcleo e retrógrada na SNc, porém no RTN e preBotC ocorre prevenção da morte neuronal. Como consequência, a redução da fR basal não é mais observada. (C) Esquema ilustrando os mecanismos de degeneração em núcleos encefálicos: no CPu e na SNc, a morte neuronal local ocorre por meio do aumento de ROS induzido pela 6-OHDA, que culmina em estresse oxidativo levando, conseqüentemente, a um processo inflamatório, pelo aumento da expressão do NF- κ B, e também, à apoptose neuronal. No RTN e no preBotC, a degeneração ocorre em resposta ao aumento da neuroinflamação local que promove liberação de TNF- α e indução da apoptose nesses núcleos por meio da interação desta citocina com seu receptor TNFR1. Abreviações: 6-OHDA, 6-hidroxidopamina; CPu, núcleo caudado putamen; SNc, porção compacta da substância negra; preBotC, complexo de Pre-Botzinger; RTN, núcleo retrotrapezoide; WT, selvagem; i.p., intraperitoneal; fR, frequência respiratória; Veh, veículo; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; TNFR1, receptor 1 para o TNF- α ; $TNFR1^{-/-}$, nocaute para o TNFR1; ROS, espécies reativas de oxigênio; NF- κ B - fator nuclear kappa B.

A DP é muito conhecida por estar associada a sintomas relacionados ao movimento como o tremor, bradicinesia, rigidez muscular e instabilidade postural, mas são os déficits respiratórios os principais responsáveis pelos óbitos em pacientes portadores desta doença. Sendo assim, estudos voltados para o entendimento do desenvolvimento e prevenção destes problemas são de grande importância para o aumento da qualidade e expectativa de vida dos pacientes portadores da DP.

Em nosso laboratório, diversos estudos mostraram que animais submetidos à indução de um modelo de DP por meio da administração de 6-OHDA no CPU apresentam déficits respiratórios associados a degeneração de importantes regiões envolvidas com o controle neural da respiração, mas as causas da morte neuronal encontradas neste modelo não haviam sido descritas.

Nesta tese, os resultados sugerem que a neurodegeneração em núcleos respiratórios neste modelo é mediada pelo TNF- α , uma citocina pró inflamatória liberada pela microglia quando esta se encontra ativada. De fato, o tratamento de animais induzidos ao modelo da DP por 6-OHDA com minociclina, um antibiótico que também apresenta propriedades anti-inflamatórias, preveniu as disfunções respiratórias funcionais e neuroanatômicas, confirmando que a inflamação tem destaque central nas alterações encontradas neste modelo (**Figura 31**). Estes dados são importantes pois abrem espaço para o estudo de tratamentos anti-inflamatórios como forma de reduzir ou até mesmo prevenir essas alterações funcionais respiratórias e neuroanatômicas para que, futuramente, na pesquisa clínica, sejam desenvolvidos tratamentos em humanos que tenham como foco a redução dos problemas respiratórios dos pacientes portadores da DP, e, com isso, também, a taxa de mortalidade desta patologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- AGID, Y. Parkinson's disease: pathophysiology. **The Lancet**, v. 337, n. 8753, p. 1321–1324, 1991.
- AKIYAMA, H.; MCGEER, P. L. Microglial response to 6-hydroxydopamine-induced substantia nigra lesions. **Brain Research**, v. 489, n. 2, p. 247–253, 1989.
- ANDERSON, C. M.; SWANSON, R. A. **Astrocyte glutamate transport: Review of properties, regulation, and physiological functions**. **GLIAGlia**, , 2000.
- ANDERSON, T. M. et al. A novel excitatory network for the control of breathing. **Nature**, v. 536, n. 7614, p. 76–80, 27 jul. 2016.
- AQUINO, Y. C. et al. Respiratory disorders of Parkinson's disease. **Journal of Neurophysiology**, v. 127, n. 1, p. 1–15, 2022.
- ARBAB, A. S. Uptake and washout of I-123-MIBG in neuronal and non-neuronal sites in rat hearts: Relationship to renal clearance. **Annals of Nuclear Medicine**, v. 10, n. 2, p. 211–217, 1996.
- ASADI, A. et al. Minocycline, focus on mechanisms of resistance, antibacterial activity, and clinical effectiveness: Back to the future. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 22, p. 161–174, 2020.
- ASCHERIO, A.; SCHWARZSCHILD, M. A. The epidemiology of Parkinson ' s disease : risk factors

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

and prevention. **The Lancet Neurology**, v. 15, n. 12, p. 1257–1272, 2016.

ASCHNER, M. **Immune and inflammatory responses in the CNS: Modulation by astrocytes**. *Toxicology Letters*. **Anais...Toxicol Lett**, 28 dez. 1998.

BENARROCH, E. E. et al. Depletion of ventromedullary NK-1, receptor-immunoreactive neurons in multiple system atrophy. **Brain**, v. 126, n. 10, p. 2183–2190, 2003.

BIANCHI, A. L.; DENAVIT-SAUBIE, M.; CHAMPAGNAT, J. **Central control of breathing in mammals: Neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters**. *Physiological Reviews* **Physiol Rev**, , 1995.

BLANDINI, F.; ARMENTERO, M.-T. Animal models of Parkinson's disease. **FEBS Journal**, v. 279, n. 7, p. 1156–1166, 2012.

BLANDINI, F.; ARMENTERO, M.; MARTIGNONI, E. The 6-hydroxydopamine Model: News From the Past. **Parkinsonism & related disorders**, v. 14 Suppl 2, 2008.

BLUM, D. et al. **Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: Contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease**. *Progress in Neurobiology*, 2001.

BOOTH, H. D. E.; HIRST, W. D.; WADE-MARTINS, R. The Role of Astrocyte Dysfunction in Parkinson's Disease Pathogenesis. **Trends in Neurosciences**, v. 40, n. 6, p. 358–370, 2017.

BRAAK, H.; BRAAK, E. Pathoanatomy of Parkinson's disease. **Journal of Neurology, Supplement**, v. 247, n. 2, p. 3–10, 2000.

BRENNER, M. **Role of GFAP in CNS injuries**. *Neuroscience Letters* Elsevier Ireland Ltd, , 17 abr. 2014.

BRIDGET MARTINEZ, P. V. P. **Neuroprotection by immunomodulatory agents in animal models of Parkinson's disease**. *NEURAL REGENERATION RESEARCH*, , 2018.

BROGDEN, R. N. et al. Minocycline : A Review of its Antibacterial and Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Use. **Drugs**, v. 291, p. 251–291, 1975.

CABRAL, L. M. et al. Attenuated baroreflex in a Parkinson's disease animal model coincides with impaired activation of non-C1 neurons. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 225, 1 maio 2020.

CHHOR, V. et al. Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia In vitro. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 32, p. 70–85, 2013.

DEL NEGRO, C. A.; FUNK, G. D.; FELDMAN, J. L. Breathing matters. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 6, p. 351–367, 2018.

DEPINO, A. M. et al. Microglial activation with atypical proinflammatory cytokine expression in a rat model of Parkinson's disease. **European Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 2731–2742, nov. 2003.

DEUMENS, R.; BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J. **Modeling Parkinson's disease in rats: An evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway**. *Experimental Neurology* Academic Press Inc., , 2002.

DOTY, R. L. Olfactory dysfunction in Parkinson disease. **Nature Reviews Neurology**, v. 8, n. 6, p. 329–339, 2012.

EMBORG, M. E. Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 139, n. 2, p. 121–143, 2004.

ERLICHMAN, J. S.; LEITER, J. C.; GOURINE, A. V. **ATP, glia and central respiratory control**. *Respiratory Physiology and Neurobiology* **Respir Physiol Neurobiol**, , out. 2010.

FALQUETTO, B. et al. Cardiovascular dysfunction associated with neurodegeneration in an experimental model of Parkinson's disease. **Brain Research**, 2017.

- FERNANDES-JUNIOR, S. A. et al. Correlation between neuroanatomical and functional respiratory changes observed in an experimental model of Parkinson's disease. **Experimental Physiology**, v. 103, n. 10, p. 1377–1389, 1 out. 2018.
- FORSBERG, D.; HERLENIUS, E. Astrocyte networks modulate respiration – sniffing glue. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 265, n. June, p. 3–8, 2019.
- FREEMAN, M. R. **Specification and morphogenesis of astrocytes**. **Science**, 5 nov. 2010.
- FRICKER, M. et al. **Neuronal cell death**. **Physiological Reviews** American Physiological Society, 1 abr. 2018.
- GALLO, V.; DENEEN, B. **Glial development: The crossroads of regeneration and repair in the CNS**. **Neuron** Cell Press, 16 jul. 2014.
- GAO, H. M.; HONG, J. S. Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. **Trends in Immunology**, v. 29, n. 8, p. 357–365, ago. 2008.
- GAUTHIER, P.; NADEAU, R.; DE CHAMPLAIN, J. Acute and chronic cardiovascular effects of 6-hydroxydopamine in dogs. **Circulation research**, v. 31, n. 2, p. 207–217, 1972.
- GOETZ, C. G. The history of Parkinson's disease: Early clinical descriptions and neurological therapies. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 1, n. 1, 2011.
- GOLDSTEIN, D. S. et al. Positron emission imaging of cardiac sympathetic innervation and function using 18F-6-fluorodopamine: Effects of chemical sympathectomy by 6-hydroxydopamine. **Journal of Hypertension**, v. 9, n. 5, p. 417–423, 1991.
- GOLDSTEIN, D. S. **Dysautonomia in Parkinson's disease: Neurocardiological abnormalities**. **Lancet Neurology**, 2003.
- GOMES, F. C. A.; TORTELLI, V. P.; DINIZ, L. Glia: Dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. **Estudos Avancados**, v. 27, n. 77, p. 61–84, 2013.
- GORETTI DE LANDA, P.; SUZUKI, H. S. **SÍNDROME DA APNEIA E HIPOAPNEIA OBSTRUTIVA DO SONO E O ENFOQUE FONOAUDIOLÓGICO: REVISÃO DE LITERATURA** **Sleep obstructive apnea-hypoapnea syndrome and the phonoaudiological focus: literature review** Jul-Set. [s.l.: s.n.].
- GOURINE, A. V. et al. Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. **Science**, v. 329, n. 5991, p. 571–575, 30 jul. 2010.
- GRAZIA SPILLANTINI, M. et al. Filamentous α -synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. **Neuroscience Letters**, v. 251, n. 3, p. 205–208, 31 jul. 1998.
- GUO, J. D. et al. Damage to dopaminergic neurons by oxidative stress in Parkinson's disease (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 41, n. 4, p. 1817–1825, 2018.
- GUYENET, P. G. et al. The Retrotrapezoid Nucleus and Breathing. In: [s.l.: s.n.]. p. 115–122.
- GUYENET, P. G. et al. The Retrotrapezoid Nucleus : Central Chemoreceptor and Regulator of Breathing Automaticity. **Trends in Neurosciences**, p. 1–18, 2019.
- HE, Y.; APPEL, S.; LE, W. Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. **Brain Research**, v. 909, n. 1–2, p. 187–193, 2001.
- HOL, E. M.; PEKNY, M. **Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system**. **Current Opinion in Cell Biology** Elsevier Ltd, 1 fev. 2015.
- IZQUIERDO-ALONSO, J. L. et al. Airway dysfunction in patients with Parkinson's disease. **Lung**, v. 172, n. 1, p. 47–55, jan. 1994.
- JAIN, S.; GOLDSTEIN, D. S. Cardiovascular dysautonomia in Parkinson disease: from pathophysiology to pathogenesis. **Neurobiology of disease**, v. 46, n. 3, p. 572–80, 2012.

JESSEN, K. R. Glial cells. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 36, n. 10, p. 1861–1867, 2004.

JUÁREZ OLGUÍN, H. et al. The role of dopamine and its dysfunction as a consequence of oxidative stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

KALIA, L. V.; LANG, A. E. Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 386, n. 9996, p. 896–912, 2015.

KIM, S. et al. Transneuronal Propagation of Pathologic α -Synuclein from the Gut to the Brain Models Parkinson's Disease. **Neuron**, v. 103, n. 4, p. 627- 641.e7, 2019.

KINOSHITA, P. F. et al. Consequences of the Lack of TNFR1 in Ouabain Response in the Hippocampus of C57BL/6J Mice. **Biomedicines**, v. 10, n. 11, 1 nov. 2022.

KONDO, J. ICHI et al. Hemiparkinsonian rat models: Different sensitivity of dopaminergic neurotoxins. **International Congress Series**, v. 1260, n. C, p. 281–285, 2004.

KORCHOUNOV, A.; MEYER, M. F.; KRASNIANSKI, M. Postsynaptic nigrostriatal dopamine receptors and their role in movement regulation. 2010.

KOSTRZEWA, R. M.; JACOBOWITZ, D. M. **Pharmacological actions of 6 hydroxydopamine. Pharmacological Reviews**Pharmacol Rev, , 1974.

KUNO, R. et al. Autocrine activation of microglia by tumor necrosis factor- α . **Journal of Neuroimmunology**, v. 162, n. 1–2, p. 89–96, 2005.

LEE, K. M. New advances on glial activation in health and disease. **World Journal of Virology**, v. 4, n. 2, p. 42, 2015.

LEES, A. J.; HARDY, J.; REVESZ, T. **Parkinson's disease. The Lancet**Elsevier Limited, , 2009.

LENG, A. et al. Tumor necrosis factor-alpha receptor ablation in a chronic MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Neuroscience Letters**, v. 375, n. 2, p. 107–111, 28 fev. 2005.

LI, C.; YUAN, K.; SCHLUESENER, H. Impact of minocycline on neurodegenerative diseases in rodents: A meta-analysis. **Reviews in the Neurosciences**, v. 24, n. 5, p. 553–562, 1 out. 2013.

LIMA-SILVEIRA, L. et al. Enhancement of excitatory transmission in NTS neurons projecting to ventral medulla of rats exposed to sustained hypoxia is blunted by minocycline. **Journal of Physiology**, v. 597, n. 11, p. 2903–2923, 1 jun. 2019.

LIMA, J. C. et al. The involvement of the pathway connecting the substantia nigra, the periaqueductal gray matter and the retrotrapezoid nucleus in breathing control in a rat model of Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 302, n. December 2017, p. 46–56, 2018.

LONG-SMITH, C. M.; SULLIVAN, A. M.; NOLAN, Y. M. **The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease. Progress in Neurobiology**Prog Neurobiol, , nov. 2009.

LOPEZ-RODRIGUEZ, A. B. et al. CB 1 and CB 2 Cannabinoid Receptor Antagonists Prevent Minocycline-Induced Neuroprotection Following Traumatic Brain Injury in Mice. n. January, p. 35–45, 2015.

LOREA-HERNÁNDEZ, J. J. et al. Microglia modulate respiratory rhythm generation and autoresuscitation. **GLIA**, v. 64, n. 4, p. 603–619, 1 abr. 2016.

MCDOWELL, K.; CHESSELET, M. F. **Animal models of the non-motor features of Parkinson's disease. Neurobiology of Disease**, 2012.

MCGEER, P. L.; MCGEER, E. G. **Glial reactions in Parkinson's disease. Movement Disorders**Mov Disord, , 15 mar. 2008.

MEHANNA, R.; JANKOVIC, J. **Respiratory problems in neurologic movement disorders. Parkinsonism and Related Disorders**Parkinsonism Relat Disord, , dez. 2010.

MEYER, T. K. The larynx for neurologists. **Neurologist**, v. 15, n. 6, p. 313–318, nov. 2009.

MIDDELDORP, J.; HOL, E. M. **GFAP in health and disease. Progress in Neurobiology**Prog

Neurobiol, , mar. 2011.

MORRISON, H. et al. Quantitative microglia analyses reveal diverse morphologic responses in the rat cortex after diffuse brain injury. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.

NASCIMENTO, A. L. F. et al. Oxidative Stress Inhibition Via Apocynin Prevents Medullary Respiratory Neurodegeneration and Respiratory Pattern Dysfunction in a 6-Hydroxydopamine Animal Model of Parkinson's Disease. **Neuroscience**, v. 502, p. 91–106, 2022.

NÓBREGA, A. C.; RODRIGUES, B.; MELO, A. Is silent aspiration a risk factor for respiratory infection in Parkinson's disease patients? **Parkinsonism & related disorders**, v. 14, n. 8, p. 646–648, dez. 2008.

OBESO, J. A. et al. **Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. Trends in Neurosciences** Elsevier Ltd, , 2000.

OLIVEIRA, L. M. et al. Role of the locus coeruleus catecholaminergic neurons in the chemosensory control of breathing in a Parkinson's disease model. **Experimental Neurology**, v. 293, p. 172–180, 2017.

OLIVEIRA, L. M. et al. Orexinergic neurons are involved in the chemosensory control of breathing during the dark phase in a Parkinson's disease model. **Experimental Neurology**, v. 309, n. August, p. 107–118, 2018.

OLIVEIRA, L. M. et al. Respiratory disturbances in a mouse model of Parkinson's disease. **Experimental Physiology**, v. 104, n. 5, p. 729–739, 2019.

PARKINSON, J. An essay on the shaking palsy. 1817. **The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences**, v. 14, n. 2, mar. 2002.

PASPARAKIS, M. et al. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. **The Journal of experimental medicine**, v. 184, n. 4, p. 1397–1411, 1 out. 1996.

PFEIFFER, R. F. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 22, p. S119–S122, 1 jan. 2016.

PHATNANI, H.; MANIATIS, T. Astrocytes in neurodegenerative disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 6, p. 1–18, 2015.

POEWE, W. et al. Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 1–21, 2017.

PORTER, C. C.; TOTARO, J. A.; BURCIN, A. THE RELATIONSHIP BETWEEN RADIOACTIVITY AND NOREPINEPHRINE CONCENTRATIONS IN THE BRAINS AND HEARTS OF MICE FOLLOWING ADMINISTRATION OF LABELED METHYLDOPA OR 6-HYDROXYDOPAMINE. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 150, n. 1, 1965.

PORTER, C. C.; TOTARO, J. A.; STONE, C. A. EFFECT OF 6-HYDROXYDOPAMINE AND SOME OTHER COMPOUNDS ON THE CONCENTRATION OF NOREPINEPHRINE IN THE HEARTS OF MICE. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 140, n. 3, 1963.

PRZEDBORSKI, S. The two-century journey of Parkinson disease research. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 4, p. 251–259, 2017.

QUINLAN, R. A. et al. **GFAP and its role in Alexander disease. Experimental Cell Research** Academic Press Inc., , 10 jun. 2007.

RAFFEL, D. M. et al. Dependence of cardiac ¹¹C-meta-hydroxyephedrine retention on norepinephrine transporter density. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 47, n. 9, p. 1490–1496, 1 set. 2006.

RAGONESE, P. et al. Risk of Parkinson disease in women: Effect of reproductive characteristics. **Neurology**, v. 62, n. 11, p. 2010–2014, 2004.

RAMIREZ, J. M.; ANDERSON, T. M. **Respiratory rhythm generation: Triple oscillator hypothesis. F1000Research** Faculty of 1000 Ltd, , 2017.

- S, F. et al. Levodopa and the progression of Parkinson's disease. **The New England journal of medicine**, v. 351, n. 24, p. 2498–2508, 9 dez. 2004.
- SABATÉ, M. et al. Obstructive and restrictive pulmonary dysfunctions in Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 138, n. 1–2, p. 114–119, 1 jun. 1996.
- SAIJO, K.; CROTTI, A.; GLASS, C. K. Regulation of microglia activation and deactivation by nuclear receptors. **GLIA**, v. 61, n. 1, p. 104–111, jan. 2013.
- SANTISTEBAN, M. M. et al. Involvement of bone marrow cells and neuroinflammation in hypertension. **Circulation Research**, v. 117, n. 2, p. 178–191, 3 jul. 2015.
- SASAKI, A. Microglia and brain macrophages: An update. **Neuropathology**, v. 37, n. 5, p. 452–464, 1 out. 2017.
- SASAKI, Y. et al. Iba1 is an actin-cross-linking protein in macrophages/microglia. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 286, n. 2, p. 292–297, 2001.
- SAUNDERS-PULLMAN, R. Estrogens and Parkinson disease: Neuroprotective, symptomatic, neither, or both? **Endocrine**, v. 21, n. 1, p. 81–87, 2003.
- SAVAGE, J. C. Chapter 2 Morphology of Microglia Across Contexts of Health. **Methods in Molecular Biology**, v. 2034, 2019.
- SECCOMBE, L. M. et al. Abnormal ventilatory control in Parkinson's disease—Further evidence for non-motor dysfunction. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 179, n. 2–3, p. 300–304, 15 dez. 2011.
- SHEIKHBAHAEI, S. et al. Morphometric analysis of astrocytes in brainstem respiratory regions. **Journal of Comparative Neurology**, v. 526, n. 13, p. 2032–2047, 2018.
- SIMONS, J. A. **Swallowing Dysfunctions in Parkinson's Disease**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. v. 134
- SMITH, J. C. et al. Structural and functional architecture of respiratory networks in the mammalian brainstem. 2009.
- SMITH, Y.; VILLALBA, R. **Striatal and extrastriatal dopamine in the basal ganglia: An overview of its anatomical organization in normal and Parkinsonian brains**. **Movement Disorders** Mov Disord, , 2008.
- SOFRONIEW, M. V. **Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation**. **Trends in Neurosciences** Trends Neurosci, , dez. 2009.
- SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. **Astrocytes: Biology and pathology**. **Acta Neuropathologica** Acta Neuropathol, , jan. 2010.
- SONG, W. M.; COLONNA, M. The identity and function of microglia in neurodegeneration. **Nature Immunology**, v. 19, n. 10, p. 1048–1058, 2018.
- STORNETTA, R. L. et al. Expression of Phox2b by brainstem neurons involved in chemosensory integration in the adult rat. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 40, p. 10305–10314, 4 out. 2006.
- STOTT, S. R. W.; BARKER, R. A. Time course of dopamine neuron loss and glial response in the 6-OHDA striatal mouse model of Parkinson's disease. **European Journal of Neuroscience**, v. 39, n. 6, p. 1042–1056, 2014.
- SUBRAMANIAN, H. H.; CHOW, C. M.; BALNAVE, R. J. Identification of different types of respiratory neurones in the dorsal brainstem nucleus tractus solitarius of the rat. **Brain Research**, v. 1141, n. 1, p. 119–132, 13 abr. 2007.
- TAKAKURA, A. C. et al. Selective lesion of retrotrapezoid Phox2b-expressing neurons raises the apnoeic threshold in rats. **The Journal of physiology**, v. 586, n. 12, p. 2975–91, 15 jun. 2008.
- TAKAKURA, A. C. et al. Phox2b-expressing retrotrapezoid neurons and the integration of central and peripheral chemosensory control of breathing in conscious rats. **Experimental Physiology**, v. 99, n.

3, p. 571–585, 1 mar. 2014.

TANAKA, K. ICHI; OGAWA, N.; ASANUMA, M. Molecular basis of 6-hydroxydopamine-induced caspase activations due to increases in oxidative stress in the mouse striatum. **Neuroscience Letters**, v. 410, n. 2, p. 85–89, 20 dez. 2006.

TESCHEMACHER, A. G.; GOURINE, A. V.; KASPAROV, S. A Role for Astrocytes in Sensing the Brain Microenvironment and Neuro-Metabolic Integration. **Neurochemical Research**, v. 40, n. 12, p. 2386–2393, 1 dez. 2015.

TILLERSON, J. L. et al. Forced nonuse in unilateral Parkinsonian rats exacerbates injury. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 15, p. 6790–6799, 1 ago. 2002.

TOOR, R. U. A. S. et al. Neurons in the Intermediate Reticular Nucleus Coordinate Postinspiratory Activity, Swallowing, and Respiratory-Sympathetic Coupling in the Rat. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 39, n. 49, p. 9757–9766, 4 dez. 2019.

TORSNEY, K. M.; FORSYTH, D. Respiratory dysfunction in parkinson's disease. **Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh**, v. 47, n. 1, p. 35–39, 2017.

TUPPY, M. et al. Respiratory deficits in a rat model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, 2015.

TYSNES, O.-B.; STORSTEIN, A. Epidemiology of Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 124, 2017.

VAREŠLIJA, D. et al. 6-Hydroxydopamine: a far from simple neurotoxin. **Journal of Neural Transmission**, v. 127, n. 2, p. 213–230, 2020.

VIVEKANANTHAM, S. et al. Neuroinflammation in Parkinson's disease: Role in neurodegeneration and tissue repair. **International Journal of Neuroscience**, v. 125, n. 10, p. 717–725, 2015.

WALSH, S.; FINN, D. P.; DOWD, E. Time-course of nigrostriatal neurodegeneration and neuroinflammation in the 6-hydroxydopamine-induced axonal and terminal lesion models of Parkinson's disease in the rat. **Neuroscience**, v. 175, p. 251–261, 2011.

WERMUTH, L. et al. Mortality in patients with Parkinson's disease. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 92, n. 1, p. 55–58, 29 jan. 1995.

YRJÄNHEIKKI, J. et al. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 26, p. 15769–15774, 22 dez. 1998.

ZARZUELO, A.; GÁLVEZ, J. What is behind the non-antibiotic properties of minocycline ? **Pharmacological Research**, v. 67, n. 1, p. 18–30, 2013.

ZHOU, Y. Q. et al. Minocycline as a promising therapeutic strategy for chronic pain. **Pharmacological Research**, v. 134, n. May, p. 305–310, 2018.

ZOCCAL, D. B. et al. **The nucleus of the solitary tract and the coordination of respiratory and sympathetic activities.** **Frontiers in Physiology**Frontiers Research Foundation, , 25 jun. 2014.