

ISABELLA ZAMBOTTI VILLELA

Caracterização epigenética nos núcleos respiratórios no modelo animal 6-OHDA da doença de Parkinson

São Paulo

2022

ISABELLA ZAMBOTTI VILLELA

Caracterização epigenética nos núcleos respiratórios no modelo animal 6-OHDA da doença de Parkinson

Dissertação apresentada ao Programa de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Bárbara Falquetto

Versão Corrigida

São Paulo

2022

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Serviço de Biblioteca e informação Biomédica

do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Zambotti Villela, Isabella
Caracterização epigenética nos núcleos
respiratórios no modelo animal 6-OHDA da doença de
Parkinson / Isabella Zambotti Villela; orientador
Bárbara Falquetto. -- São Paulo, 2022.
77 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Controle neural da respiração. 2. Doença de
Parkinson. 3. Mecanismos epigenéticos. I. Falquetto,
Bárbara, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Isabella Zambotti Villela

Título da dissertação: Caracterização epigenética nos núcleos respiratórios no modelo 6-OHDA da doença de Parkinson

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Bárbara Falquetto

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a 10/02/2023, considerou o(a) candidato(a):

Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:

Nome: Prof^a. Dr^a. Ariadiny de Lima Caetano

Instituição: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo

Examinador(a): Assinatura:

Nome: Dr^a. Josiane do Nascimento Silva

Instituição: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Presidente: Assinatura:

Nome: Prof^a. Dr^a Carolina Demarchi Munhoz

Instituição: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo



Instituto
de Ciências
Biomédicas
Excelência em Ensino e Pesquisa

Universidade de São Paulo
**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

São Paulo, 23 de junho de 2021
CEUA N 7992180820

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Barbara Falquetto
Área: Farmacologia

Título da proposta: "Participação do estresse oxidativo na degeneração dos neurônios respiratórios do bulbo no modelo de doença de Parkinson em camundongos".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais ICB (ID 001574)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo), no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 23/junho/2021) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Inserir aluno participante".

Comentário da CEUA: "A CEUA autoriza a inclusão de Isabella Zambotti Villela ao protocolo aprovado. ".

Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos do grupo de pesquisa Neurobreath, principalmente aos meus amigos de laboratório, Nayani, André, Pamela e Luiz, os quais com a maior paciência do mundo me ajudaram a todo o momento, tanto em experimentos como nas risadas e momentos de descontração. Aos amigos que fiz durante o mestrado, Nicole, Laís, Camilla e Gustavo que foram essenciais para tornar minha caminhada mais leve.

Em especial, gostaria de agradecer a minha orientadora Bárbara, que me acolheu no momento mais difícil da minha pós graduação. Ela, sem hesitar me ensinou toda teoria, foi para bancada comigo e me ensinou a ter pensamento crítico. Obrigada por toda a orientação, carinho e broncas recebidas, tudo foi necessário para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos professores Ana Takakura e Thiago Moreira, que diversas vezes me ajudaram e demonstraram que vale a pena fazer pesquisa, independente das dificuldades que encontramos.

Aos meus amigos de faculdade, Roberta, Almir e Luis Antônio os quais divido minha carreira científica desde 2014. Obrigada por toda a ajuda e apoio que vocês me deram, vocês sempre foram e sempre serão essenciais. Ao Bruno e o Felipe que sempre me apoiaram e ficavam entusiasmados com os meus experimentos, a opinião e apoio de vocês foi sempre necessária, obrigada pelo carinho.

Ao Nikolas, que estive ao meu lado em todos os momentos, desde a iniciação científica até hoje. Me orientando, dizendo que sou capaz e sempre me ajudando com o que foi possível. Obrigada por tamanho amor e carinho.

Agradeço a toda comissão de pós graduação do Departamento de Farmacologia, que me ouviram e me auxiliaram em todos os momentos. Á Mônica, Camila e Rosa da secretaria que com todo o bom humor e paciência do mundo me ajudaram.

Á toda minha família, o meu muito obrigada. Agradeço especialmente ao meu pai, mãe, irmãos, cunhados e sobrinho que sempre entenderam, respeitaram e me apoiaram minha vontade de ser cientista.

Á CAPES e a FAPESP, através destas duas instituições este projeto pode ser realizado. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*“Nada em biologia faz sentido
exceto à luz da evolução.”*

Theodosius Dobzhansky

*“Quem come do fruto do conhecimento, é
sempre expulso de algum paraíso.”*

Melanie Klein

RESUMO

VILLELA, I. Z. **Caracterização epigenética nos núcleos respiratórios no modelo animal 6-OHDA da doença De Parkinson.** 2022. 77 folhas. Dissertação (Farmacologia) –Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa idiopática de caráter crônico e progressivo. Caracteriza-se pela morte de neurônios dopaminérgicos na região da substância negra (SN), resultado de interações moleculares complexas, como alterações epigenéticas, disfunções mitocondriais, toxinas ambientais e diversos outros processos celulares. Diversos estudos correlacionam a DP com alterações respiratórias e neurodegeneração na coluna respiratória (CR). Recentemente, a epigenética tem se tornado forte candidata como etiologia da DP, como a interação direta da SIRT2 com as histonas e as alterações pós-traducionais. Diante disso, avaliamos as alterações das histonas H3K4me3, H3K9ac e H3K27me3 e a atividade da SIRT2 na CR no modelo 6-OHDA de DP. Para isto, o modelo de DP foi induzido em camundongos e ratos machos pela injeção bilateral de 6-OHDA no estriado e realizamos a técnica de imuno-histoquímica para tirosina hidroxilase, pletismografia de corpo inteiro, imunofluorescência com dupla marcação de phox2b ou DAPI e histonas, avaliamos a concentração proteica destas histonas por *Western Blot* (WB) e também a atividade da SIRT2 nos núcleo do trato solitário (NTS), núcleo retrotrapezoide (RTN), grupamento respiratório ventral rostral (rVRG) e complexo de pré-Botzinger (preBotC). O modelo da doença e os déficits respiratórios foram confirmados, onde observamos mais de 70% da lesão dos neurônios da SN e redução da frequência respiratória com redução da ventilação minuto em normóxia e hipercapnia após 10 dias de indução do modelo de DP. Em camundongos foi observada por imunofluorescência a redução da H3K27me3 no preBotC no grupo 6-OHDA 10 dias após a indução; em ratos por WB observamos a redução proteica da H2K9ac no NTSi e rVRG/preBotC no grupo 6-OHDA 30 dias após indução; e a atividade da SIRT2 encontrou-se reduzida no RTN 4 dias após a indução, enquanto no rVRG/preBotC observamos o aumento da atividade 6 dias após a indução em camundongos. Dessa forma, os dados sugerem que a SIRT tem implicações nas modificações pós-traducionais das histonas e estas podem estar relacionados com processos de apoptose e sobrevivência celular nos núcleos respiratórios no modelo de DP.

Palavra-chave: Controle neural da respiração. Doença de Parkinson. Alterações epigenéticas.

ABSTRACT

VILLELA, I. Z. **Epigenetic characterization in respiratory nuclei in the 6-OHDA animal model of Parkinson's disease**. 2022. 77 sheets. Masters thesis (Pharmacology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Parkinson's disease (PD) is a chronic and progressive idiopathic neurodegenerative disease. It is characterized by the death of dopaminergic neurons in the substantia nigra (SN) region, resulting from complex molecular interactions, such as epigenetic alterations, mitochondrial dysfunction, environmental toxins and several other cellular processes. Several studies correlate PD with respiratory alterations and neurodegeneration in the respiratory column (RC). Recently, epigenetics has become a strong candidate as an etiology of PD, such as the direct interaction of SIRT2 with histones and post-translational modifications. Therefore, we evaluated the presence of histones H3K4me3, H3K9ac and H3K27me3 and SIRT2 activity in CR in a 6-OHDA model of PD. For this, the PD model was induced in male mice and rats by bilateral injection of 6-OHDA in the striatum and we performed the immunohistochemistry technique for tyrosine hydroxylase, whole body plethysmography, immunofluorescence with double labeling of phox2b or DAPI and histones, we evaluated the protein concentration of these histones by Western Blot (WB) and also the activity of SIRT2 in the nucleus of solitary tract (NTS), retrotrapezoid nucleus (RTN), rostral ventral respiratory group (rVRG) and preBotzinger Complex (preBotC). The disease model and the respiratory deficits were confirmed, where we observed more than 70% of the lesions of neurons in the SN, there was a reduction in the respiratory rate with reduction in minute ventilation in normoxia and hypercapnia 10 days after PD model induction. In mice, a reduction of H3K27me3 in preBotC in the 6-OHDA group was observed by immunofluorescence 10 days after PD model induction, in rats the WB showed a protein reduction of H2K9ac in iNTS and rVRG/preBotC in the 6-OHDA group and SIRT2 activity was reduced in the RTN 4 days after PD induction, while in the rVRG/preBotC we had an increase in SIRT2 activity 6 days after PD induction in mice. Therefore, the data suggest that SIRT2 has implications in post-translational histone modifications and being related to apoptosis and cell survival processes in neural control of breathing in 6-OHDA model of PD.

Key-words: Neural control of breathing. Parkinson's disease. Epigenetic alteration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação frontal e coronal do tronco encefálico ilustrando as regiões envolvidas no controle neural da respiração.....	17
Figura 2 – Linha do tempo de acontecimentos nos núcleos respiratórios após indução do modelo da Doença de Parkinson com 6-OHDA.....	20
Figura 3 – Principais mecanismos regulatórios epigenéticos.....	22
Figura 4 – Mudanças epigenéticas	24
Figura 5 – Protocolo experimental	39
Figura 6 – OHDA promoveu neurodegeneração na SN, déficit respiratório funcional e perda de peso em camundongos após 10 dias, confirmando o modelo de DP	41
Figura 7 – Imunofluorescência das histonas H3K4me3, H3K9ac e H3K27me3 na região do NTS em camundongos.	44
Figura 8 – Imunofluorescência das histonas H3K4me3, H3K9ac e H3K27me3na região do rVRG em camundongos.	45
Figura 9 – Imunofluorescência das histonas H3K4me3, H3K9ac e H3K27me3na região do preBotC em camundongos.	47
Figura 10 – Imunofluorescência das histonas H3K4me3, H3K9ac e H3K27me3 na região do RTN em camundongos.	48
Figura 11 – 6-OHDA promoveu neurodegeneração na SN e levou a perda de peso em ambos os grupos 6-OHDA em camundongos.....	49
Figura 12 – Número de neurônios imunorreativos para TH na SN e proteína controle para padronização de <i>Western Blot</i> em ratos	50
Figura 13 – Normalização de H3 total por beta-actina nos núcleos respiratórios nos grupos veículo e 6-OHDA em ratos	51
Figura 14 – Expressão da H3K9ac nos núcleos respiratórios nos grupos veículo e 6-OHDA em ratos	52
Figura 15 – 6-OHDA promoveu neurodegeneração na SN, levou a perda de peso nos grupos 6-OHDA e alterações na atividade da SIRT2 nos núcleos respiratórios em camundongos.	53

Figura 16 – Regulação epigenética e sinalização intracelular nos núcleos respiratórios no modelo de DP.

..... 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais modificações epigenéticas encontradas na Doença de Parkinson.....	28
Tabela 2 – Anticorpos utilizados nas técnicas de imuno-histoquímica e imunofluorescência.....	35
Tabela 3 – Relação de anticorpos utilizados para técnica de <i>Western Blot</i>	37

LISTA DE ABREVEATURA E SIGLAS

AP	Área Postrema
BotC	Complexo de Botzinger
CC	Canal Central
CO ₂	Dióxido de Carbono
CP _u	Caudado e Putamen
DA	Dopamina
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DP	Doença de Parkinson
GRD	Grupamento Respiratório Dorsal
GRV	Grupamento Respiratório Ventral
GRVc	Grupo Respiratório Ventral Caudal
GRVr	Grupo Respiratório Ventral Rostral
KF	Kolliker-Fuse
NRT	Núcleo Retrotrapezóide
NTS	Núcleo do Trato Solitário
NTSc	Núcleo do Trato Solitário Comissural
NTSi	Núcleo do Trato Solitário Intermediário
O ₂	Oxigênio
PA	Pressão arterial
Pa _{co2}	Pressão parcial de dióxido de carbono
Pa _{o2}	Pressão parcial de oxigênio
PBS	Solução de tampão fosfato
pF	Parafacial

Phox2b	<i>Paired-like homebox 2b</i>
preBotC	Complexo de PreBotzinger
Rpm	Rotações por minuto
SNC	Sistema nervoso central
TH	Tirosina Hidroxilase
VII	Núcleo facial
XII	Nervo hipoglosso
6-OHDA	6-hidroxidopamina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Controle neural da respiração.....	17
1.2 Ventilação pulmonar e quimiorrecepção.....	20
1.3 Doença de Parkinson e controle respiratório	21
1.4 Epigenética na Doença de Parkinson	24
1.4.1 Modificações pós-traducionais das histonas	25
1.4.2 Modificações pós-traducionas das histonas na Doença de Parkinson	27
2 JUSTIFICATIVA.....	32
3 OBJETIVOS.....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Animais.....	34
4.1.1 Camundongos.....	34
4.1.2 Ratos.....	34
4.2 Modelo de Doença de Parkinson – Lesão química com 6-hidroxidopamina (6-OHDA)	34
4.2.1 Indução em camundongo	35
4.2.2 Indução em rato	35
4.3 Avaliação da ventilação pulmonar	36
4.4 Histologia.....	36
4.5 Imuno-histoquímica	37
4.6 Imuno-histoquímica por Imunofluorescência	37
4.7Análise proteica por <i>Western Blot</i>	38
4.8 Ensaio de ELISA para detecção da atividade de SIRT2.....	40
4.9 Análise estatística.....	41
4.10 Protocolo Experimental.....	41
5 RESULTADOS	43

5.1 Confirmação do modelo experimental da Doença de Parkinson	43
5.2 Alterações nas histonas nos núcleos respiratórios no modelo de DP.....	44
5.2.2 Quantificação de proteínas por <i>Western Blot</i> antes da neurodegeneração dos núcleos respiratório no modelo de DP	52
5.3 Alterações na atividade da HDAC Sirtuína 2 (SIRT 2) nos núcleos respiratórios no modelo de DP	56
6 DISCUSSÃO.....	58
7 CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 Controle neural da respiração

Nos mamíferos, a respiração é primordial para a regulação dos níveis de oxigênio (O₂) e dióxido de carbono (CO₂) no organismo (SMITH et al., 2013). A captação de O₂ do ambiente pelo processo de inspiração e a liberação do CO₂ dos pulmões pela expiração é resultado de um circuito ritmado que garante a contração e relaxamento do diafragma, musculatura intercostal, músculos abdominais e com conseqüente expansão e retração dos pulmões e da caixa torácica (BIANCHI et al., 1995; RICHTER & SPYER, 2001). O ritmo respiratório depende da alternância entre os processos de inspiração, pós-inspiração (expiração passiva estágio I) e estágio II da expiração (RICHTER; SPYER, 2001a) e a pressão gerada pela contração e relaxamento destes músculos em conjunto com a resistência ao fluxo das vias aéreas altera o volume de ar presente nos pulmões (BIANCHI; DENAVIT-SAUBIFI; CHAMPAGNAT, 1995). Além disso, fatores como temperatura corporal, integridade de nervos periféricos, níveis de gases no sangue, estado de sono-vigília e doenças podem alterar o padrão de ventilação (FELDMAN et al., 2013). O objetivo deste processo é fornecer O₂ e remover CO₂ do organismo através da ventilação pulmonar por troca gasosa que ocorre pela difusão de gases entre os alvéolos e o sangue, o que depende de um complexo e delicado controle do sistema nervoso central (SNC), o qual é responsável por promover a regulação dos processos de respiração (ANGELOVA et al., 2015; FELDMAN et al., 2013). Os movimentos respiratórios, assim como diversos outros comportamentos rítmicos inatos são provenientes de redes neurais semiautônomas denominadas como geradores de padrões centrais (CPGs) (SMITH et al., 2013).

Em 1812, o pesquisador M. Le Gallois realizou transecções entre as regiões da ponte e do bulbo encefálico de coelhos e, com isso, ele pode analisar que a atividade do nervo frênico, responsável por inervar o diafragma, era mantida mesmo após estas transecções. Isso demonstrou que as regiões caudais em relação as transecções eram importantes na geração da respiração. Ainda, quando as transecções eram realizadas na porção entre o bulbo e a medula espinal a atividade do nervo frênico era interrompida e assim, os pesquisadores puderam identificar a importância do bulbo no controle respiratório (LEGALLOIS, 1812). Com estes feitos, em 1982, Loeschcke pode concluir que os neurônios que estavam envolvidos no controle da respiração estavam localizados na região ventrolateral do bulbo (H. H. LOESCHCKE, 1982) e a correlação entre o padrão respiratório

e o bulbo fez com que o pesquisador Richter e seu grupo (RICHTER, 1982) iniciassem a pesquisa nessa área. Assim, através de técnicas de registro intracelular, demonstraram que, durante o processo de respiração, as fases são geradas na região ventrolateral bulbar que envolve uma rede neuronal orquestrada por interações sinápticas, que posteriormente foi denominada de coluna respiratória ventral (RICHTER, 1982; SMITH et al., 1991).

Estudos recentes demonstraram que o padrão e o ritmo respiratório são gerados por neurônios presentes dorsalmente e ventralmente no tronco encefálico, os quais, são responsáveis pela coordenação de motoneurônios inspiratórios e expiratórios (FELDMAN et al., 2013; RICHTER & SPYER, 2001). Neurônios respiratórios localizados no grupo respiratório ventral (GRV) apresentam papel fundamental na ritmogênese e no padrão respiratório basal (FELDMAN; DEL NEGRO; GRAY, 2013; SMITH et al., 2007), os quais incluem 4 regiões orientadas no sentido rostro-caudal, sendo elas: I) complexo de Botzinger (BotC), importante para a atividade expiratória; II) complexo de pré-Botzinger (preBotC), apresenta um grupo de interneurônios responsáveis pela geração do ritmo inspiratório; III) porção rostral do grupo respiratório ventral (rVRG), o qual contém neurônios pré-motores inspiratórios e IV) porção caudal do grupo respiratório ventral (cVRG), que possui neurônios pré-motores expiratórios (EZURE; TANAKA; SAITO, 2002; SMITH et al., 2007). Além do GRV, temos outras regiões responsáveis pelo controle da respiração como neurônios localizados no núcleo retrotrapezóide (RTN), rostral ao BotC que estão envolvidos na quimiorrecepção central, ou seja, modulam a atividade dos neurônios do GRV nos processos de inspiração e expiração quando os níveis de CO₂ e H⁺ são alterados na circulação (GUYENET, 2014; TAKAKURA et al., 2014); e a região do núcleo do trato solitário (NTS) subdividido em NTS rostral, NTS intermediário e NTS caudal, onde em sua extensão intermediária e caudal é composta por diversos grupos de neurônios relacionados com todas as fases da respiração e recebem as aferências pulmonares e dos quimiorreceptores periféricos (BRACCIALLI et al., 2008). Ainda, estudos apontam a região do complexo parabraquial e Kolliker-Fuse (PB e KF), na ponte, como importante no processo de respiração (fase da expiração passiva ou pós-inspiratória) e no ritmo respiratório (DUTSCHMANN et al., 2004; , 2014). Ainda na região pontina, o grupamento de neurônios noradrenérgicos do Locus Coeruleus (LC) também está relacionado com a atividade respiratória e quimiorrecepção (GUYENET; WANG, 2001).

Assim, o mecanismo de geração do ritmo respiratório se inicia no preBotC, de maneira intrínseca, que ao estimular os neurônios do rVRG e conseqüente estimulação do nervo frênico ocorre a contração do diafragma, gerando a inspiração. O BotC envia

projeções inibitórias ao preBotC juntamente com ação dos núcleos pontinhos PB e KF na interrupção da inspiração, gerando a pós-inspiração ou fase I da expiração (passiva, na qual não há contração muscular). Em situações que a expiração ativa ou fase II da expiração é necessária, para suprir a demanda metabólica, o cVRG é ativado para acionar os nervos torácicos e lombares a fim de gerar a contração dos músculos abdominais (FELDMAN; DEL NEGRO; GRAY, 2013; GUYENET; BAYLISS, 2015; SMITH et al., 1991).

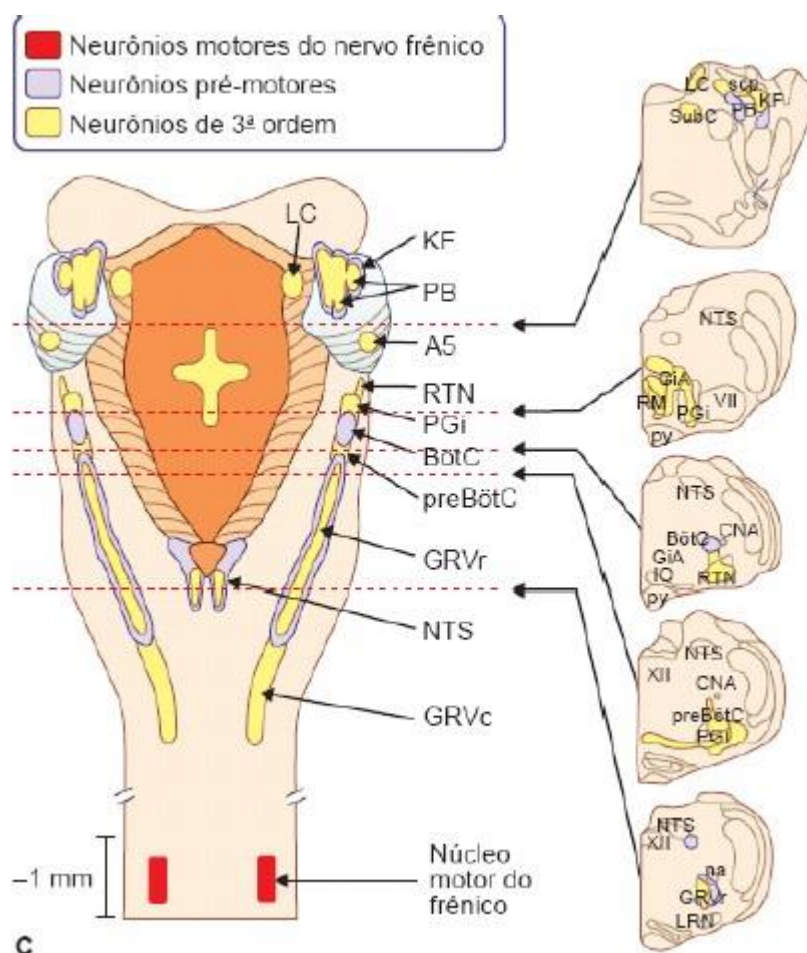


Figura 1: Representação frontal e coronal do tronco encefálico ilustrando as regiões envolvidas no controle neural da respiração.

A5, região pontina ventrolateral catecolaminérgica A5; BotC, complexo de Botzinger; C3-C5, medula espinal cervical níveis 3-5; GRVc, grupamento respiratório ventrolateral caudal; GRVr, grupamento respiratório ventrolateral rostral; Itr, região intertrigeminal; KF, Kölliker-Fuse; LC, locus coeruleus; LRt, núcleo reticular lateral; L1-L4, medula espinal lombar níveis 1-4; Mo5, núcleo mesencefálico do trigêmeo; na, núcleo ambíguo; NTS, núcleo do trato solitário; PB: parabraquial; Pn, núcleo basilar pontino; preBotC, complexo de pré-Bötzinger; RTN/pF, núcleo retrotrapezoide/região parafacial; scp, pedúnculo cerebelar superior; SO, oliva superior; tz, corpo trapezoide; 7n, nervo facial. Imagem retirada e adaptada do livro Fisiologia de Margarida Aires.

1.2 Ventilação pulmonar e quimiorrecepção

A homeostase gasométrica é necessária para manter os padrões ventilatórios ritmados por meio da sinalização refinada que chega ao SNC dos valores de O₂ e CO₂ arteriais (FELDMAN; DEL NEGRO; GRAY, 2013). Para isso, células quimiorreceptoras sensíveis a alterações químicas no sangue e no líquido cefalorraquidiano desenvolvem um papel importante no controle da homeostase gasométrica (FELDMAN et al., 2013). O CO₂ e pH sanguíneo devem ter controle ainda mais refinado para que o organismo consiga realizar todos os seus processos metabólicos (FELDMAN et al., 2003). Para que isso ocorra, quimiorreceptores periféricos e centrais captam mudanças na pressão parcial de CO₂ (PaCO₂) e do pH e na pressão parcial de O₂ (PaO₂) (FELDMAN; MITCHELL; NATTIE, 2003; GUYENET; STORNETTA; BAYLISS, 2010).

O controle voluntário da ventilação ocorre por meio de estímulos do córtex cerebral para os centros respiratórios presentes no bulbo e na ponte, onde o controle automático e involuntário é feito acrescido da informação dos reflexos quimiorreceptores periféricos e centrais (FELDMAN et al., 2003; GUYENET, 2014). Os quimiorreceptores periféricos, localizadas no corpúsculo aórtico (porção inferior do arco aórtico) e carotídeos (bifurcação das artérias carótidas), são sensíveis a queda de PaO₂ (hipóxia), acidose (redução do pH) e aumentos na PaCO₂ (hipercapnia) do sangue arterial (NURSE, 2014). Ao reconhecer estas mudanças, eles sofrem despolarização e conduzem o sinal para terminais nervosos aferentes do nervo glossofaríngeo (IX par craniano) e nervo vago (X par craniano) que por sua vez chegam ao NTS e interagem com a coluna respiratória (KUMAR & PRABHAKAR, 2012; TAKAKURA et al., 2006). O ajuste gerado pelos quimiorreceptores periféricos age aumentando a pressão arterial por aumento de atividade simpática e a ventilação alveolar, aumentando o débito cardíaco e a captação de O₂ que por consequência aumenta a perfusão tecidual e retira CO₂ dos tecidos. Enquanto que os quimiorreceptores centrais respondem a mudanças no pH e na PaCO₂, presentes estrategicamente no parênquima encefálico próximo ao líquor e em regiões do SNC altamente vascularizadas (H. H. LOESCHKE, 1982). A exemplo de neurônios quimiorreceptores centrais, estão aqueles presentes no RTN, os quais expressam o fator de transcrição Phox2b, neuromedina e são glutamatérgicos (AIRES, 2012; SOUZA et al., 2018).

Assim, frente as alterações químicas dos gases sanguíneos e estímulos pulmonares, os receptores periféricos e centrais se comunicam com a coluna respiratória a fim de alterar

o ritmo e padrão respiratório por meio de reflexos, os quais retornam a homeostase do meio interno.

Como citado anteriormente, a ventilação é um processo que deve estar devidamente equilibrado a fim de manter a homeostase geral do organismo. Atualmente, sabe-se que doenças degenerativas apresentam disfunções respiratórias, como na Doença de Parkinson (DP), em que, acredita-se que neurônios pré-motores e motores, junções neuromusculares, receptores sensoriais, vias aferentes e vias motoras descendentes podem estar afetadas pelo processo degenerativo (MEHANNA; JANKOVIC, 2010).

1.3 Doença de Parkinson e controle respiratório

A Doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa de caráter progressivo que afeta a transmissão dopaminérgica para a região do estriado (via nigro-estriatal) pela degeneração ventrolateral dos neurônios dopaminérgicos presentes na substância negra compacta (SNc), além da formação de inclusões citoplasmáticas de alfa-sinucleína, denominadas de corpúsculos de Lewis (FAMILY; GAZEWOOD; RICHARDS, 2013; KWOK, 2010). Essa doença é caracterizada classicamente pelos sintomas motores como a bradicinesia, instabilidade postural, rigidez de membros, tremores, mas também sintomas não motores, como problemas respiratórios, alteração de memória, depressão, ansiedade e distúrbios do sono (BALESTRINO; SCHAPIRA, 2020; MEHANNA; JANKOVIC, 2010). Em humanos, a obstrução das vias aéreas superiores, distúrbios restritivos, complicações na ingestão de medicamentos e alimentos, diminuição na complacência da caixa torácica (por obstrução de vias aéreas) por consequência originando dispneia, hipoventilação e pneumonia por aspiração também são observadas na DP (MEHANNA; JANKOVIC, 2010). Além disso, a apneia obstrutiva do sono é um quadro importante em pacientes com DP, sendo considerada umas das principais causas de morte (GILMAN et AL., 2003; MEHANNA & JANKOVIC, 2010). Assim, as complicações ligadas aos distúrbios respiratórios na DP comprometem a qualidade de vida destes pacientes (MEHANNA; JANKOVIC, 2010)

Em 2015, Tuppy e colaboradores demonstraram a redução na frequência respiratória e na ventilação minuto basais e frente ao estímulo hipercápnic de ratos Wistar após 40 dias da indução do modelo de DP por meio da injeção bilateral de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) no estriado. Os pesquisadores puderam observar a diminuição do número de neurônios Phox2b presentes em regiões do RTN e NTS, e a redução na densidade dos

receptores da substância P do tipo NK1 no preBotC e no rVRG, os quais justificam o déficit respiratório funcional na DP (FALQUETTO et al., 2020; TUPPY et al., 2015). Mais recentemente, Fernandes-Junior e colaboradores mostraram, também em ratos, que há um decurso temporal das alterações nos núcleos respiratórios após indução da DP por 6-OHDA. Os núcleos RTN e NTS quimiossensíveis sofrem perda neuronal aos 30 dias após indução da DP, enquanto que os núcleos rVRG e preBotC apresentam neurodegeneração aos 40 dias após indução da DP, concomitante ao déficit respiratório funcional (FERNANDES-JUNIOR et al., 2018). Por fim, Falquetto e colaboradores, 2020 investigaram as possíveis causas destes déficits respiratórios observados, demonstrando que existe um decurso temporal de alterações que se iniciam com a redução de miR-34c que se relaciona com o estresse oxidativo (aumento de espécies reativas de oxigênio) nas áreas de controle da respiração e perfazem em sinalizações pró-apoptóticas, culminando na morte dos neurônios respiratórios (FALQUETTO et al., 2020). No mesmo modelo animal 6-OHDA em camundongos, Oliveira e colaboradores, 2019 observaram déficits respiratórios, porém com algumas diferenças dos trabalhos anteriores em ratos; não houve redução dos neurônios no NTS e o déficit funcional está presente após 10 dias da indução do modelo de DP (OLIVEIRA et al., 2019, 2021). Dados não publicados do nosso grupo de pesquisa (Cabral et al., 2022 em preparação), em camundongos, mostraram que o núcleo RTN apresenta redução dos neurônios Phox2b no 5º dia após indução da DP pela 6-OHDA e o preBotC apresenta redução dos receptores NK1 após 10 dias da lesão, concomitante ao déficit funcional respiratório, corroborando os achados em ratos, demonstrando que somente após a perda neuronal do núcleo preBotC o déficit funcional respiratório se apresenta (figura 2).

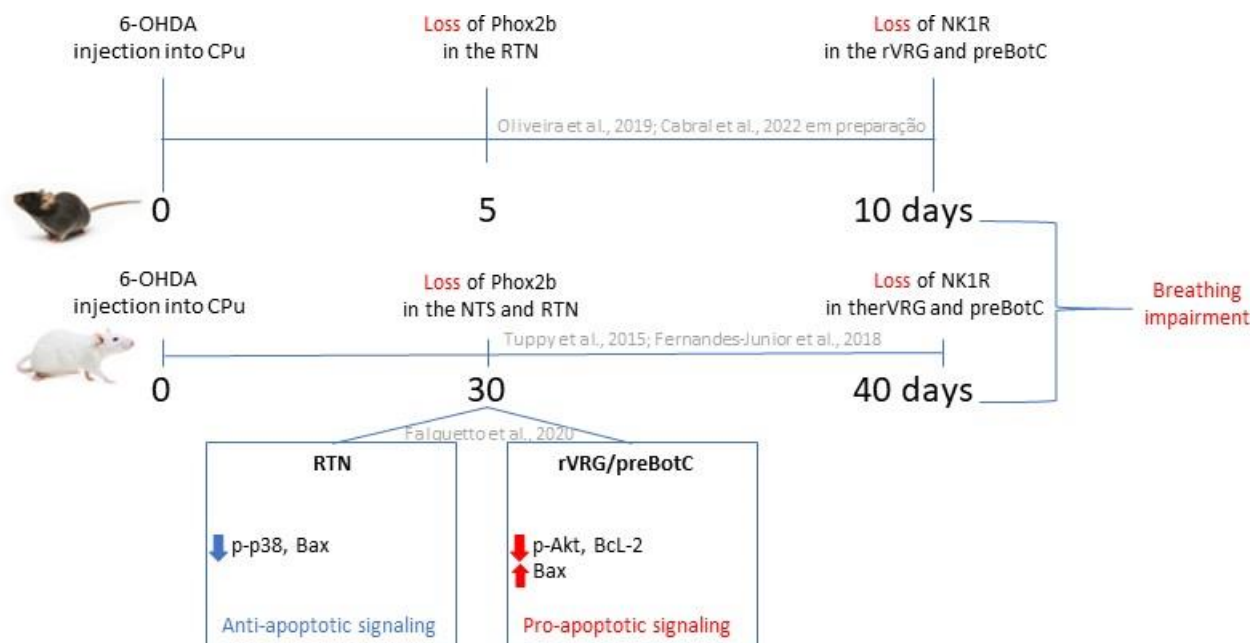


Figura 2: Linha do tempo de acontecimentos nos núcleos respiratórios após indução do modelo da Doença de Parkinson com 6-OHDA (Tuppy et al., 2015; Fernandes-Junior et al., 2018; Oliveira et al., 2019; Falquetto et al., 2020; Cabral et al., 2022 em preparação).

A etiologia da DP é idiopática, uma vez que o mecanismo responsável pela perda dos neurônios dopaminérgicos ainda não é totalmente esclarecido (BALESTRINO; SCHAPIRA, 2020). Estudos prévios apontam diversas possíveis causas relacionadas com o desenvolvimento da DP. Dentre elas, fatores externos como neurotoxinas ambientais, a exemplo da toxina MPTP (1-Metil-4-Fenil-1,2,3,6- Tetrahidropiridina) (PONZONI; GARDIA-CAIRASCO, 1995), exposição a agrotóxicos como o paraquate (OLIVEIRA DA PAIXÃO et al., 2013), disfunções mitocondriais e estresse oxidativo (FALQUETTO et al., 2020; PHILLIPSON, 2017), neuroinflamação (OLIVEIRA DA PAIXÃO et al., 2013), apoptose (BOHUSH; NIEWIADOMSKA; FILIPEK, 2018), ruptura da barreira hematoencefálica (KORTEKAAS et al., 2005), fatores genéticos (KIA et al., 2021) e fatores epigenéticos (NAVARRO-SÁNCHEZ et al., 2018; PARK et al., 2022). Estas hipóteses também são alvos dos estudos nos núcleos respiratórios na busca dos mecanismos responsáveis pela morte neuronal destes grupamentos no modelo de DP (FALQUETTO et al., 2020). Atualmente, o tratamento é baseado nos sintomas e na reposição de dopamina, com o objetivo de aumentar a disponibilidade da mesma no encéfalo (CAPRIOTTI; TERZAKIS, 2016).

Recentemente, a epigenética se tornou uma forte candidata como possível etiologia de doenças neurodegenerativas, incluindo a DP. Este fato abriu um leque de possibilidade aos pesquisadores, o qual o epigenoma tornou-se alvo para uma abordagem preventiva e terapêutica nas doenças neurodegenerativas (COPPEDÈ, 2014).

1.4 Epigenética na Doença de Parkinson

Por definição, o termo epigenética corresponde a diversos mecanismos capazes de mudar a expressão gênica sem a alteração na sequência de nucleotídeos, ou seja, sem ocasionar mutações no DNA (PEREIRA et al., 2021). Estes mecanismos são importantes para a plasticidade dos fenótipos (quando um único genótipo apresenta diversos fenótipos em resposta as variações encontradas no ambiente) (HOLLOWAY, 2002), regulação da diferenciação celular como neurônios, células do sangue, cardiomiócitos, dentre outras células, regulação gênica e para a preservação da integridade genômica (ARISTIZABAL et al., 2020; PARK et al., 2022). Os mecanismos epigenéticos regulatórios incluem a metilação do DNA, remodelação da cromatina, modificações nas histonas e expressão de microRNAs (PEREIRA et al., 2021), estes, são reversíveis e dinâmicos os quais se tornaram possíveis alvos de terapias (DEL POZO et al., 2018).

Os fenômenos epigenéticos apresentam um papel importante na embriogênese e na diferenciação celular (COPPEDÈ, 2014; PEREIRA et al., 2021). Como descrito na literatura, a relação de modificações epigenéticas em doenças neurodegenerativas possibilitou diversos estudos para o melhor entendimento dos mecanismos e possibilitar novas terapêuticas (KAUT; SCHMITT; WÜLLNER, 2012; PARK et al., 2022; VERVERIS; KARAGIANNIS, 2012). Processos como metilação do DNA e modificações nas histonas são os principais mecanismos estudados (Fig 3) (FENG; JANKOVIC; WU, 2015^a), mas também ocorre a participação de RNAs não codificantes (ncRNA) (WEI et al., 2017). No presente estudo foram avaliadas as modificações pós-traducionais das histonas.

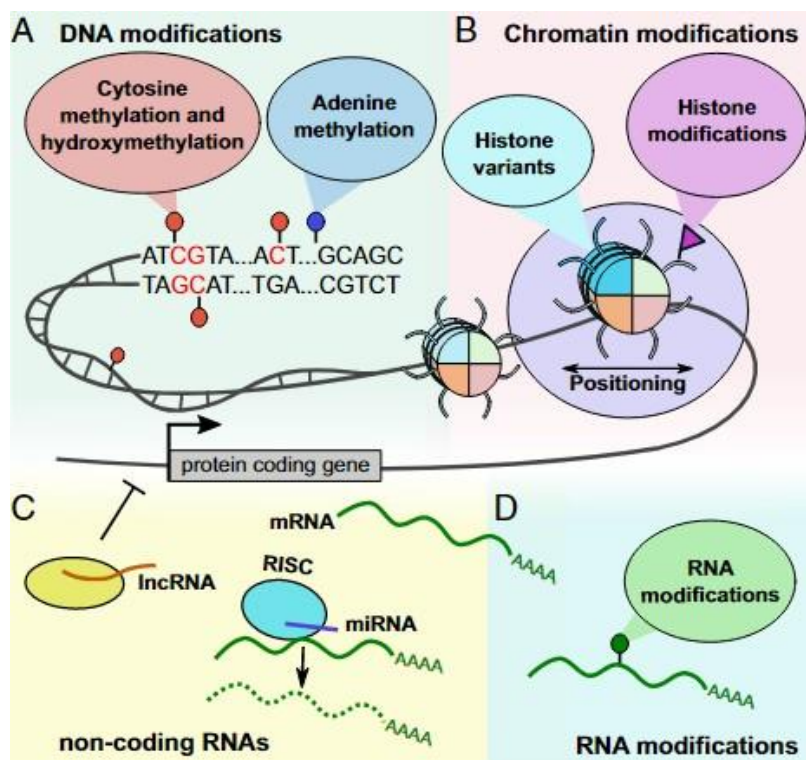


Figura 3: Principais mecanismos regulatórios epigenéticos.

A) Modificações no DNA; B) Modificações na cromatina; C) RNAs não codificantes; D) Modificações no RNA. Retirado e adaptado de Biological embedding of experience: A primer on epigenetics, (ARISTIZABAL et al., 2020).

1.4.1 Modificações pós-traducionais das histonas

As histonas são proteínas que compõem o nucleossomo, que se ligam ao DNA e auxiliam na modelação da cromatina e controle da expressão genica (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011)(fig. 3). São classificadas em H2A, H2B, H3 e H4 (LUGER et al., 1997) e podem sofrer processos de metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação, benzoilação, crotonilação, ADP-ribosilação, butirilação, glicosilação, dopaminilação, sumoilação, serotonilação, sendo as mais comuns a metilação e acetilação (PARK et al., 2022). Estes processos mudam a estrutura da cromatina abrindo ou fechando-a e/ou realizando a modificação da ligação dos fatores de transcrição (PEREIRA et al., 2021). Ademais, pela adição ou remoção de grupos químicos nas histonas e o DNA, as quais levam modificações na estrutura da cromatina, promovem alterações nas ligações de fatores de transcrição, enzimas modificadoras e interações entre proteína-proteína (Fig 4) (PARK et al., 2022; PEREIRA et al., 2021).

Na metilação das histonas ocorre a adição de um grupo metil nos resíduos de lisina (K) e/ou arginina (R) da histona, onde na lisina pode ser mono, di ou trimetilada (me1, me2 e me3, respectivamente) e na arginina pode ser mono ou dimetilada (PARK et al., 2022). São processos reversíveis, catalisados pelas enzimas histona metiltransferase (HMTs) e

pela histona demetilase (HDMs) (PARK et al., 2022). Estes processos são de suma importância na regulação da transcrição, tendo em vista que dependendo da posição da adição do radical metil haverá repressão ou ativação gênica (HYUN et al., 2017; PARK et al., 2022).

A acetilação ocorre por meio das enzimas acetiltransferase (HATs), as quais adicionam um grupo acetil na região amino terminal da histona, especificamente no resíduo de lisina e/ou arginina, levando a abertura da estrutura da cromatina pela neutralização das cargas positivas existentes na lisina, fazendo com que a cromatina se abra para que os fatores de transcrição consigam ter acesso (DEL POZO et al., 2018; PARK et al., 2022; PEREIRA et al., 2021) (Fig. 4B). É um processo reversível pela hidrólise da ligação amida pelas enzimas histonas desacetilases (HDACs), um grupo de enzimas que apresentam 4 classes de acordo com a necessidade de cofatores e sua similaridade. São divididas em classe I (HDAC1, 2, 3 e 8), classe II (HDAC4, 5, 6, 7, 9 e 10), classe III que são a família das sirtuínas que contém 7 membros (SIRT1-7) e classe IV (HDAC11) (WAKINO; HASEGAWA; ITOH, 2015). Estas enzimas apresentam a capacidade de fechar a cromatina, ou seja, levar a repressão gênica (PARK et al., 2022). As HDACs SIRTs apresentam a capacidade de se transportar do citoplasma para o núcleo, com exceção da HDAC1 que está presente no núcleo de forma predominante (WAKINO; HASEGAWA; ITOH, 2015). As SIRTs 1, 6 e 7 estão presentes no núcleo, enquanto a SIRT 2 está presente no citoplasma e as SIRTs 4 e 5 na mitocôndria (WAKINO; HASEGAWA; ITOH, 2015).

De forma geral, nas doenças neurodegenerativas foram observadas modificações pós traducionais em 4 resíduos da histona 3, que são utilizadas como marcadores, sendo elas: a histona 3 lisina 4 (H3K4), histona 3 lisina 9 (H3K9), histona 3 lisina 27 (H3K27), histona 3 lisina 79 (H3K79) (HYUN et al., 2017; PARK et al., 2022). Na maior parte dos casos, a acetilação de resíduos de lisina específicos da histona ativa a transcrição do gene e a desacetilação desses mesmos resíduos de lisina reprime a transcrição (FISCHLE; WANG; ALLIS, 2003), enquanto que a trimetilação da H3K4 está associada à ativação transcricional da expressão gênica, e a trimetilação de H3K27 está associada à inibição transcricional da expressão gênica (DART, 2017; GIBNEY; NOLAN, 2010).

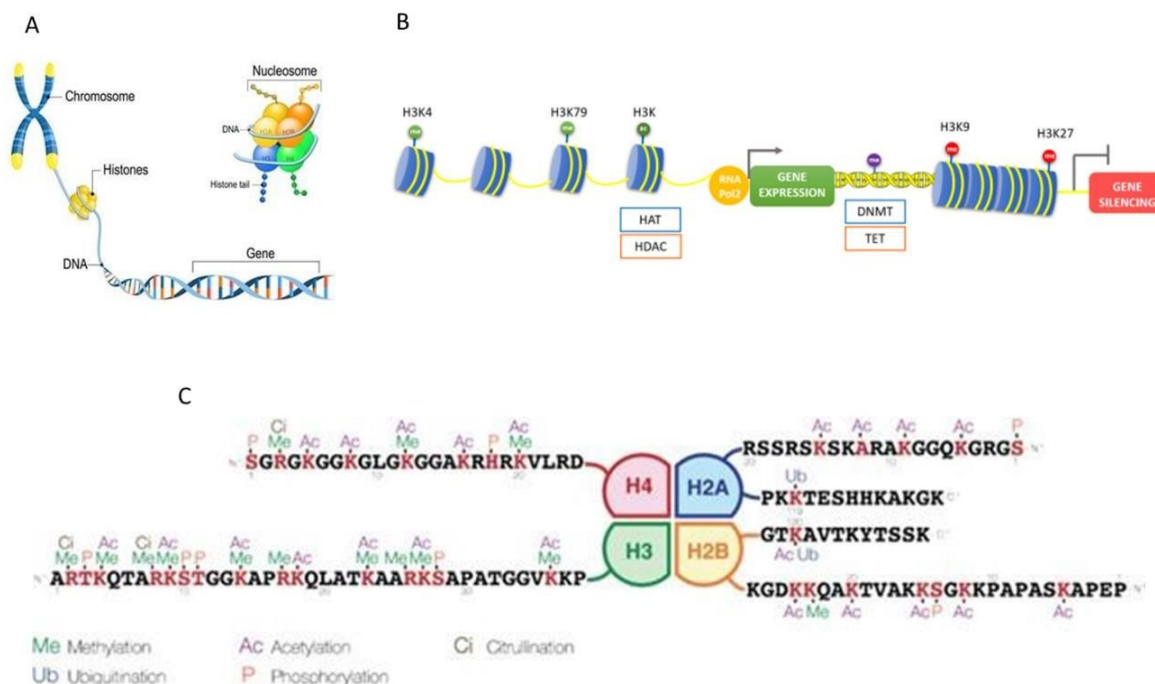


Figura 4: Mudanças epigenéticas.

A) Representação das regiões de controle gênico. B e C) Principais modificações epigenéticas nas histonas (retirado e adaptado de <https://drinkhrw.com/blog/what-is-epigenetics/> e PEREIRA et al., 2021).

1.4.2 Modificações pós-traducionas das histonas na Doença de Parkinson

Os principais estudos das alterações epigenéticas por modificações nas histonas na DP procuraram investigar a relação destas e o acúmulo da proteína alfa-sinucleína (α Syn) mal enovelada, visto que é um marcador clássico da DP em humanos (GOERS et al., 2003). Rouaux e colaboradores, em 2003, foram os primeiros pesquisadores a identificar alterações nos níveis de acetilação das histonas na neurodegeneração, demonstrando redução nos níveis de acetilação das histonas globalmente nos neurônios acompanhados por uma diminuição da HAT p300 (ROUAUX, 2003). Desde então, alterações epigenéticas no encéfalo tornaram-se alvo de estudos nas doenças neurodegenerativas. Na DP, alterações epigenéticas como a H3K4me3, H3K9ac e H4K27me3 foram encontradas na região da substância negra além de outras regiões do encéfalo (tabela 1) (BENNETT, 2010; PARK et al., 2022).

Foi demonstrado por Kontopoulos e seus colaboradores em 2006, que o acúmulo de α Syn promove a hipoacetilação da histona H3, conforme verificado a partir de estudos de superexpressão de α Syn em células SH-Sy5Y, bem como em um modelo de drosófila transgênica α Syn *in vivo* (KONTOPOULOS; PARVIN; FEANY, 2006). Portanto, teoriza-se que o acúmulo de α Syn promove neurotoxicidade na DP por “mascarar” as histonas, e assim prevenindo sua acetilação, condensando a cromatina, reprimindo a expressão gênica

e, finalmente, levando à morte celular (LI; LIU, 2011). Mais especificamente quanto a H3K9, foi observado uma diminuição na acetilação desta histona no córtex de cérebros pós morte de pacientes com DP comparados com pacientes saudáveis com idades semelhantes. Esses dados apoiam a hipótese de que as alterações de acetilação da histona H3 observadas na DP não são devidas ao intervalo pós-morte ou envelhecimento (GEBREMEDHIN; RADEMACHER, 2016). Em modelos de DP induzidos por MPTP em camundongos ou primatas não humanos, o nível de H3K4me3 no corpo estriado é significativamente reduzido (NICHOLAS et al., 2008). Assim como no modelo de DP por 6-OHDA, *in vitro* e *in vivo*, foi possível observar uma diminuição significativa em H3K4me3 e H3K27me3, o que levou a apoptose pelo aumento de caspase-3 e redução de Bcl-2 (MU et al., 2020). Quando tratados com o pró-fármaco GSK-J4, um potente inibidor da histona demetilase na H3K27me3/me2 e H3K4me3/me2, observou-se efeito protetor contra a toxicidade da 6-OHDA suprimindo significativamente o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, resgatando os déficits motores e neurodegeneração na SN (MU et al., 2020).

Entretanto, quando associada a inflamação na DP (modelo MPTP), foi observado que a demetilase Jumonji 3 (Jmjd3) específica para a H3K27me3, é capaz de atuar na polarização da microglia para M2 (ação anti-inflamatória) em camundongos e em células N9 (microglia), e o *knock-out* dessa demetilase contribuiu para uma microglia reativa e pró inflamatória (M1). Além disso, a supressão de Jmjd3 no mesencéfalo de camundongos idosos foi acompanhado por um nível elevado da H3K27me3 e uma razão aumentada de marcadores M1/M2, sugerindo que o envelhecimento é um fator importante na troca dos fenótipos da microglia. No geral, isso indica que Jmjd3 é capaz de aumentar a polarização da microglia M2 através da demetilação da H3K27me3 e sua supressão leva a produção de vários fatores pró-inflamatórios, incluindo óxido nítrico, IL-1 β e IL-6. Ao suprimir a expressão da demetilase na região da SN nos camundongos, foi capaz de causar a superativação da microglia e a perda em massa dos neurônios dopaminérgicos (TANG et al., 2014).

Outros estudos também relataram que a H3K4me3 apresentou-se elevada na região promotora do gene codificador da alfa-sinucleína na SN em cérebros pós-morte de pacientes com DP (GUHATHAKURTA et al., 2020; PAVLOU; OUTEIRO, 2017) e que ao remover a metilação ocasionou uma queda significativa nos níveis de alfa-sinucleína, baseado na técnica de CRISPR/dCas9 que efetivamente reduziu o enriquecimento de H3K4me3 do promotor do gene SNCA (alfa-sinucleína) e concomitantemente diminuiu os

níveis de proteína tanto em células de neuroblastoma SHSY5Y, bem como em neurônios dopaminérgicos de pacientes com DP. Estes resultados implicam na importância da H3K4me3 na regulação de alfa-sinucleína em DP (GUHATHAKURTA et al., 2020). De fato, alguns estudos mostraram que os níveis de H3K27me3 diminuíram na SN após a injeção de 6-OHDA (REKAİK et al., 2015) e que a administração de L-DOPA pode induzir fosforilação de H3K27meS28 no estriado no modelo unilateral com lesão por 6-OHDA, no qual alterações locais na H3K27me3 e H3K4me3 não foram estabelecidas (SÖDERSTEN et al., 2014).

O papel dos HDACs na regulação epigenética é reverter os efeitos dos HATs, catalisando a desacetilação das caudas N-terminais das histonas. Isso facilita a condensação da estrutura da cromatina que impede o acesso do fator de transcrição ao DNA, levando à repressão da transcrição (HARRISON; DEXTER, 2013a) (Fig. 2B). Porém, há um equilíbrio rigidamente controlado entre os efeitos das HATs e HDACs, permitindo a (des) acetilação das histonas e o controle dinâmico da transcrição do gene (DIETZ; CASACCIA, 2010; SAHA; PAHAN, 2006). Notavelmente, a inibição da HDAC SIRT2, tornou-se cada vez mais estudada como um novo alvo para a mediação da neuroproteção na DP já que a SIRT2 é expressa em quase todas as células cerebrais (ZHU et al., 2012) e que os níveis de SIRT2 aumentam com o envelhecimento; além de novas evidências mostrarem que a atividade de SIRT2 medeia vários processos envolvidos na patogênese da DP, incluindo agregação de alfa-sinucleína (CHEN et al., 2015; DI FRUSCIA et al., 2015; DONMEZ; OUTEIRO, 2013; GARSKE; SMITH; DENU, 2007; LIU et al., 2012; OUTEIRO et al., 2007; WANG et al., 2015). Estudos demonstraram que a SIRT2, além do efeito direto nas histonas, regula diversos processos como autofagia, regulação de microtúbulo, estresse oxidativo e neuroinflamação (DE OLIVEIRA et al., 2012; KIDA; GOLIGORSKY, 2016; LIU et al., 2014; MAXWELL et al., 2011; ZHAO et al., 2010), ou seja, processos que estão diretamente relacionados com a patogênese da DP e as alterações respiratórias do modelo da doença.

Foi demonstrado que a inibição da SIRT2 na DP se traduz em uma resposta anti-inflamatória em culturas de células microgliais, visto que a SIRT2 promove a ativação da microglia (CHEN et al., 2015). Adicionalmente, o tratamento com inibidor desta HDAC em um modelo animal de DP resultou em neuroproteção, associada com a suprarregulação do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) e fator anti-apoptótico de linfoma de células B2 (Bcl-2) (HARRISON et al., 2015). Além disso, a SIRT2 interage com a subunidade p65 de NFκB, desacetilando-a na lisina 301 e, assim,

aumentando sua capacidade de ligação ao DNA (KIERNAN et al., 2003; ROTHGIESSER et al., 2010). É concebível, então, que a redução da ativação microglial, via inibição de SIRT2, possa ser alcançada por meio da inibição desse mecanismo. Sendo assim, a inibição da SIRT2 resultaria em hiperacetilação da histona, levando a um maior acesso para fatores de transcrição como NFκB. No entanto, a capacidade reduzida de ligação ao DNA de NFκB induzida como resultado da inibição de SIRT2 levaria a um nível geral reduzido de transcrição dependente de NFκB de genes inflamatórios, como TNFα (HARRISON; SMITH; DEXTER, 2018). Ainda, observou-se que a inibição de SIRT2 reduz a neuroinflamação via regulação negativa de óxido nítrico e Ciclooxigenase 2 (COX2) na doença de Alzheimer (SCUDERI et al., 2014). Por fim, o estresse oxidativo está relacionado com o processo de apoptose, outra característica da DP, na qual a SIRT2 está aumentada (WANG et al., 2007). Esta, realiza a desacetilação da FOXO3a (regulador da homeostase celular e resposta ao estresse), a qual ativa a proteína pró-apoptótica Bim, que inibe a atividade de BCL-2, que por consequência ativa a caspase-3 levando a morte neuronal, outro processo a qual a deleção da SIRT2 (SIRT2 KO) teve papel neuroprotetor no modelo MPTP de DP (LIU et al., 2014).

Assim, a inibição de HDACs, como a SIRT2, reduz a desacetilação de histonas que, portanto, leva ao relaxamento da cromatina e à ativação de vários produtos gênicos que conduzem à neurotroficidade, anti-inflamação e, subsequentemente, à neuroproteção. É evidente que o mecanismo de neuroproteção dos inibidores das HDACs é provavelmente multidirecionado e que dadas as origens multifacetadas da patogênese da DP, eles pareçam candidatos otimistas para a terapia, assim como para os déficits respiratórios associados à DP.

Tabela 1 - Principais modificações epigenéticas encontradas na Doença de Parkinson.

Principais alterações epigenéticas na Doença de Parkinson					
	Modelo	Expressão da histona	Região	Alteração	Estudo
H3K4me3	MPTP (camundongos e primatas)	Reduzida	Corpo estriado	Camundongo: redução da trimetilação; Primatas: hiperacetilação e desfosforilação da H3 e aumento de fosforilação de ERK	NICHOLAS et al., 2008
	Células SH-SY5Y	Reduzida	Nuclear	Aumento de caspase 3 e redução de Bcl-2 e neuroproteção por expressão de ferroportina-1	MU et al., 2020
	Humanos (pós-mortem)	Aumentada	Substância negra	Aumento da expressão do gene <i>SNCA</i>	GUHATHAKU et al., 2021
H3K27me3	Células SH-SY5Y	Reduzida	Nuclear	Aumento de caspase 3 e redução de Bcl-2	MU et al., 2020
	Ratos (6-OHDA)	Reduzida	Substância negra	Menor perda de neurônios dopaminérgicos	MU et al., 2020
	MPTP (células N9 e camundongos)	Reduzida	Mesencéfalo e estriado	Aumento de <i>Jmjd3</i>	TANG et al., 2014
H3K9ac	Humanos (pós-mortem)	Reduzida	Córtex motor		GEBREMEDH et al., 2016
	Células SH-SY5Y	Reduzida	Nuclear	Repressão de p53 por ativação de SIRT1	FEND et al., 2015
SIRT 2	6-OHDA (camundongos e células SH-SY5Y)	Ativada	Estriado e nuclear	Ativação de FOXO3a e Diminuição de Bim e apoptose celular	LIU et al., 2012
	<i>Drosophila</i> e células H4	Inibida	Encéfalo e nuclear	Diminuição da agregação de alfa sinucleína	OUTEIRO et al., 2017
	MPTP (camundongos e células LUHMES)	Inibida	Estriado e citoplasma	Previne a degeneração de neurônios dopaminérgicos e diminuição de alfa sinucleína	CHEN et al., 2015

2 JUSTIFICATIVA

No Brasil, não há uma estimativa correta para a incidência de casos de DP. Em média, temos 600 mil pessoas com a doença com 64 anos ou mais, além dos casos não notificados da forma precoce da doença. De acordo com o Ministério da Saúde, esta é uma doença de distribuição universal, atinge todas as classes econômicas, etnias, sexos, porém, a doença tende a ser mais presente em homens. Sua incidência e prevalência avançam de acordo com a idade, sendo mais comum em pacientes acima de 64 anos. Há a estimativa de que por ano, no Brasil, surja em média 36 mil novos casos de DP (DE LAU; BRETELER, 2006; LARA SANTOS; SILVA MILAGRES, 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019; STEIDL; ZIEGLER; VARGAS, 2007).

Apesar de diversos estudos apontarem a correlação de distúrbios respiratórios com a DP, é necessário identificar qual é a etiologia da degeneração dos neurônios respiratórios (FALQUETTO et al., 2020; FERNANDES-JUNIOR et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2019; TUPPY et al., 2015). Assim, conhecendo mais a fundo os mecanismos, podemos desenvolver possíveis terapêuticas para a prevenção e tratamento da doença, garantindo qualidade de vida e sobrevida dos pacientes com DP.

3 OBJETIVOS

Atualmente pouco se sabe sobre os mecanismos epigenéticos nas doenças neurodegenerativas, especialmente no controle neural da respiração, nunca investigado. Foram observadas alterações pós-traducionais nas histonas na DP, em especial na SN, e assim foi possível identificar alvos candidatos para o déficit respiratório considerados nesta doença. Dessa forma, sabendo que as modificações pós-traducionais das histonas, como por exemplo as acetilações e metilações, podem alterar a expressão de genes causadores da morte neuronal na DP, o objetivo principal do presente estudo foi a caracterização epigenética nos núcleos respiratórios no modelo de DP pela injeção bilateral de 6-OHDA no estriado.

Portanto, os objetivos específicos do presente projeto foram:

1. Confirmação do modelo experimental de DP pela injeção de 6-OHDA no estriado por meio da quantificação da tirosina hidroxilase na SN por imuno-histoquímica e avaliação do déficit respiratório funcional por pletismografia;
2. Investigar a presença de histonas metiladas e acetiladas (H3K4me3, H3K9ac e H3K27me3) nos núcleos respiratórios por meio da técnica de imunofluorescência após 10 dias da injeção de 6-OHDA no estriado em camundongos;
3. Analisar, por meio da técnica de *Western-Blot*, a quantificação proteica destas alterações nas histonas nos núcleos respiratórios após 4 e 6 dias da injeção de 6-OHDA no estriado em camundongos; porém conforme adiante explicado, este objetivo foi alterado para o modelo experimental em ratos, avaliados após 30 dias da injeção de 6-OHDA no estriado;
4. Analisar a atividade da SIRT2, por meio da técnica de ELISA, nos núcleos respiratórios após 4 e 6 dias da injeção de 6-OHDA no estriado em camundongos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

4.1.1 Camundongos

Foram utilizados camundongos C57BL6, adultos, com peso variando entre 20 e 30 gramas, procedentes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP). Os animais foram mantidos em caixas com água e ração (Nuvlab) ad libitum. A temperatura e umidade do biotério foram controladas. O ciclo claro-escuro do biotério foi mantido como de 12 horas cada. Os protocolos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pela Comissão de Ético Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo (USP) (nº 7992180820).

4.1.2 Ratos

Foram utilizados ratos Wistar, adultos, com peso variando entre 250 e 300 gramas, procedentes da Rede Universidade de São Paulo (USP) de Biotérios – Biotério de Produção de Ratos “Zuleica Bruno Fortes” do Instituto de Ciências Biomédicas. Os animais foram mantidos em caixas com água e ração (Nuvlab) ad libitum. A temperatura e umidade do biotério foram controladas. O ciclo claro-escuro do biotério foi mantido como de 12 horas cada. Os protocolos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (nº 2740200319).

4.2 Modelo de Doença de Parkinson – Lesão química com 6-hidroxidopamina (6-OHDA)

Para indução do modelo de DP foi utilizada a 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Hydrochloride H4381– Sigma®, Saint Louis, MO, USA), toxina que não cruza a barreira hematoencefálica e deve ser administrada estereotaxicamente no próprio corpo estriado (CPu) bilateralmente para efetuar uma lesão retrógrada dos neurônios nigro-estriatais (Blum et al., 2001). Em todos os procedimentos cirúrgicos foram utilizados métodos assépticos para evitar os riscos de infecções.

4.2.1 Indução em camundongo

Os animais foram, inicialmente, anestesiados com isoflurano (5% em O₂) e adaptados ao aparelho estereotáxico Kopf (Modelo 1760). Após uma incisão longitudinal na pele e no tecido subcutâneo para a exposição da calota craniana, o lambda e o bregma foram utilizados como referência para nivelar as cabeças dos animais. As injeções bilaterais, a partir do bregma, de 6-OHDA (10 µg/µl) ou salina + 0,3% de ácido ascórbico (veículo) (1 injeção por lado, no volume de 0,5 µl por injeção) foram realizadas com o objetivo de atingir o CPu utilizando uma seringa Hamilton (10 µl) conectada a um polietileno (PE-10) e a uma injetora nas coordenadas: 2,1 mm lateral à linha média, 0 mm rostral ao bregma e 3 mm ventral à dura-máter. Após as injeções da toxina, as cabeças dos animais foram suturadas, os animais receberam uma dose profilática de pentabiótico (1200000 UI, 0,2 ml/camundongo) (Fort Dodge Saúde Animal LTDA, São Paulo, Brasil) e de analgésico/anti-inflamatório Biofen 1% (cetoprofeno 0,1 mg/ml) (Biofarm Química e Farmacêutica LTDA, São Paulo, Brasil) e foram colocados em caixas com água e ração “ad libitum” e mantidos em salas com temperatura, umidade e luminosidade controladas. Os animais permaneceram no biotério por um período de 4 a 10 dias. O peso dos animais foi avaliado antes da indução do modelo de DP e ao final dos experimentos.

4.2.2 Indução em rato

Os animais foram, inicialmente, anestesiados intraperitonealmente (i.p.) com cetamina (100 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg) associado ao analgésico opióide (tramal 20mg/kg i.p.) para serem adaptados a um aparelho estereotáxico Kopf (Modelo1760). Após uma incisão longitudinal na pele e no tecido subcutâneo para a exposição da calota craniana, o lambda e o bregma foram utilizados como referência para nivelar as cabeças dos animais. As injeções bilaterais, a partir do bregma, de 6-OHDA (24 µg/µl) dissolvida em salina (NaCl 0,9%) + 0,3% de ácido ascórbico (veículo) (2 injeções por lado, no volume de 1 µl/injeção) foram realizadas utilizando uma seringa Hamilton (10 µl) conectada a um tubo de polietileno (PE-10) e a uma injetora a fim de alcançar a região do corpo estriado (CPu) em 2 coordenadas distintas para atingir o CPu: 1) 2,7 mm lateral à linha média, 0 mm rostral ao bregma e 4,5 mm ventral à dura-máter 2) 3,2 mm lateral à linha média, 0,5 mm rostral ao bregma e 4,5 mm ventral à dura-máter. Após as injeções da toxina, as cabeças dos animais foram suturadas, os animais receberam uma dose profilática de pentabiótico (1200000 UI, 0,2 ml/rato) (Fort Dodge Saúde Animal LTDA, São Paulo, Brasil) e de analgésico/anti-inflamatório Biofen 1% (cetoprofeno 0,1 ml/rato) (Biofarm Química e Farmacêutica LTDA,

São Paulo, Brasil) e foram colocados em caixas com água e ração ad libitum e mantidos em salas com temperatura, umidade e luminosidade controladas. Os animais permaneceram por um período de 30 dias.

4.3 Avaliação da ventilação pulmonar

A ventilação dos camundongos foi avaliada utilizando a pletismografia de corpo inteiro (tecnologias EMKA) (ABBOTT et al., 2011). A câmara de pletismografia no qual o animal é colocado individualmente foi ventilada continuamente com 0,4 L/min de ar (21 % O₂ equilibrado com N₂). A temperatura e a umidade dentro da câmara de pletismografia se mantêm estáveis durante os experimentos ($\pm 0,5$ °C e ± 10 % de umidade relativa). A frequência respiratória (fR, respirações/min) e volume corrente (VT, área sob a curva durante o período inspiratório - baseado no gráfico de ondas gerados pela injeção de 10 ml de ar seco a partir de uma seringa durante a calibração, expresso em ml/peso) foram extraídos do programa de aquisição de dados e análises IOX v 2.8. Estes valores foram utilizados para calcular a ventilação por minuto ($VE = fR \times VT$, expresso em ml//min/peso). Após análises os valores de VT e VE foram convertidos em μ L considerando o peso individual dos animais em gramas. Após período de ambientação de 2h e registro basal em normoxia e normocapnia (21% O₂ balanceado com N₂) por 45min, os animais foram expostos à hipercapnia (7%CO₂, 21% O₂ balanceado com N₂) por 15min. As análises durante hipercapnia foram consideradas a partir de 5 min, período em que a caixa de pletismografia já se encontra em estabilidade do gás.

4.4 Histologia

Todos os animais tiveram seus encéfalos retirados para análise imuno-histoquímica. Os camundongos que foram avaliadas as respostas funcionais de ventilação, foram profundamente anestesiados com isoflurano (5% em O₂) e perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo com PBS (pH 7,4) seguido de paraformaldeído (4 % em 0,1 M de fosfato, pH 7,4). Os animais que foram avaliados para as técnicas de Western Blot e ELISA foram anestesiados com isoflurano (5% em O₂) e decapitados. Os encéfalos foram retirados e a região da SN guardada no mesmo fixador a 4 °C. Após o período de fixação o material foi transferido para uma solução contendo sacarose a 20% em PBS para crioproteção. Os encéfalos dos camundongos foram cortados em microtômo numa espessura de 30 μ m e dos ratos em 40 μ m e guardados em solução crioprotetora (20% de glicerol, 30% de etileno glicol em 50 mM de fosfato, pH 7.4) que preserva as qualidades do

tecido encefálico para posterior tratamento imuno-histoquímico (SCHREIHOFER; GUYENET, 1997).

4.5 Imuno-histoquímica

Para avaliar a extensão da lesão nigral causada pela 6-OHDA e a seletividade da mesma, os cortes foram selecionados e submetidos à metodologia de imunoperoxidase (Oliveira et al., 2019) com anticorpo específico anti-tirosina-hidroxilase (TH) (1:1000, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) para detecção da enzima limitante da síntese de dopamina feito em camundongo seguido do anticorpo secundário biotinilado anti-camundongo feito em burro (1:500, Jackson, West Grove, PA, USA) (Tabela 2). As lâminas foram desidratadas com álcool e xilol, posteriormente cobertas com D.P.X (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). A imunorreatividade foi analisada em microscópio de campo claro e para análise quantitativa, capturamos imagens digitais dos cortes selecionados para cada grupo e foi realizada contagem do número de neurônios para TH. Toda a nomenclatura anatômica foi baseada no Atlas de Paxinos e Franklin's (*The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*) e Paxinos e Watson (*The Rat Brain*).

4.6 Imuno-histoquímica por Imunofluorescência

Pela técnica de imunofluorescência foram avaliadas a presença das histonas H3K9ac, H3K4me3 e H3K27me3 junto ao Phox2b e marcação de DAPI nos núcleos respiratórios após 10 dias da indução da DP nos grupos experimentais veículo e 6-OHDA em camundongos. Os cortes foram lavados 3x em solução *Imuno buffer* (IB) por 10 minutos. Depois foram incubados por 30 minutos na solução de citrato de sódio aquecido a 80°C. Mais uma lavagem em IB foi realizada no mesmo padrão citado acima. Realizamos o bloqueio com soro normal de burro (NDS) a 2% com IB por 45 minutos. Após o tempo estimado, os cortes foram incubados com os anticorpos primários (histonas 1:500 e Phox2b 1:200) em IB e NDS 1% por 48h. No terceiro dia, as cortes foram lavados 3x por 10 minutos em TPBS (tampão fosfato salino– pH 7,4). Após as lavagens, foram incubados os anticorpos secundários a 1:500 em 1% de NDS em IB por 2 horas. Os cortes foram lavados 3x de 10 minutos em TPBS gelado e as lâminas montadas no sentido caudal rostral e cobertas com *vectashield* contendo DAPI (Tabela 1). A avaliação da imunofluorescência das histonas foi realizada pela densidade integrada por células remanescentes marcadas com phox2b ou DAPI utilizando o software *ImageJ*.

Tabela 2. Anticorpos utilizados nas técnicas de imuno-histoquímica e imunofluorescência.

Anticorpo primário	Marca	Concentração	Anticorpo secundário 1:500 (Jackson Immunoresearch)
<i>Mouse x TH</i>	<i>Merk</i>	1:1000	<i>Donkey x mouse biotilado</i>
<i>Mouse x Phox2b</i>	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>	1:200	<i>Alexa 594 donkey x mouse</i>
<i>Rabbit x H3K4me3</i>	<i>Cell Signaling</i>	1:500	<i>Alexa 594 donkey x mouse</i>
<i>Rabbit x H327me3</i>	<i>Cell Signaling</i>	1:500	<i>Alexa 594 donkey x mouse</i>
<i>Rabbit x H3K9ac</i>	<i>Cell Signaling</i>	1:500	<i>Alexa 594 donkey x mouse</i>

4.7 Análise proteica por *Western Blot*

Os animais de ambos os grupos foram profundamente anestesiados com isoflurano (5% em O₂) e decapitados com o auxílio de uma tesoura (camundongo) ou guilhotina (rato). Os encéfalos foram rapidamente removidos e colocados em bloco de agarose 2,5% e submergidos em uma base de apoio de um vibrátomo (Vibratome 1500, Vibratome, MO, USA) contendo líquido cerebrospinal artificial gelado (MgSO₄-50 mM; KH₂PO₄-50 mM; KCl-200 mM; NaHCO₃-1 M; NaCl-5 M; CaCl-100 mM e D-glicose-20 mM) para cortes histológicos contendo as regiões de interesse para camundongo [NTSc, bregma -8,24 mm (corte de ~350 µm de espessura a partir da transição entre medula espinal e bulbo), NTSi, bregma -7,92 mm (corte de ~550 µm de espessura após a coleta do NTSc; surgimento da área postrema), coluna respiratória ventral - GRV, incluindo rVRG retirado do corte que também contém o NTSi e preBotC, bregma -7,32 mm (corte de ~400 µm de espessura após a coleta do NTSi) e RTN, bregma -6,48 mm (após desprezar ~400 µm (Complexo de Botzinger), corte de ~500 µm de espessura)], e para rato [NTSc, bregma -14,76 mm (corte de ~400 µm de espessura a partir da transição entre medula espinal e bulbo), NTSi, bregma -14,28 mm (corte de ~700 µm de espessura após a coleta do NTSc; surgimento da área postrema), coluna respiratória ventral - CRV, incluindo rVRG e preBotC, bregma -13,3 mm (corte de ~800 µm de espessura após a coleta do NTSi) e RTN, bregma -11,9 mm (após desprezar ~300 µm (Complexo de Botzinger) corte de ~600 µm de espessura)].

As fatias foram depositadas em uma placa de Petri contendo fluido cerebrospinal e os núcleos foram cuidadosamente dissecados com a ajuda visual de um estereomicroscópio (Leica, Alemanha) e um microbisturi (Fine Science Tools, CA, USA). Foram utilizadas as

referências neuroanatômicas do atlas Paxinos e Franklin's e Paxinos e Watson para as coletas teciduais, as quais foram imediatamente congeladas e mantidas em tubos de centrifugação para subseqüentes procedimentos de extração de proteína. Foram adicionados 50 µl de tampão de extração (extrato total, 100 µl de Tris pH 7,5, 50 µl de EDTA, 100 µl de SDS, 4,2 mg/ml de fluoreto, 4,5 mg/ml de pirofosfato de sódio e 1,89 mg/ml de ortovanato de sódio) ao tecido que foi resfriado a 4 °C. Após serem fervidos a 96 °C por 10 min, as amostras foram sedimentadas por centrifugação a 12000 rpm por 20 min a 4 °C. Parte do sobrenadante foi utilizado para a determinação do conteúdo proteico por espectrofotometria com o reagente Bradford (Biorad, CA, USA) e o restante foi diluído em tampão Laemmli (1:4 v/v) contendo ditiotreitol 100 mM, incubados por 10 min a 96 °C e submetidos à separação eletroforética em gel de poliacrilamida 15% com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em aparelho para minigel (Mini Protean III, Biorad, CA, USA).

As proteínas presentes no gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Biorad, CA, USA) em cuba para transferência elétrica semiúmida (Biorad, CA, USA). As membranas foram posteriormente bloqueadas com uma solução de leite desnatado em pó a 5% por 12 h a 4 °C. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas para os anticorpos primários específicos para as proteínas de interesse e em subseqüente pelos anticorpos secundários adequados aos primários e aos reagentes de detecção de quimiluminescência (ECL, Amersham Pharmacia, UK) (Tabela 2). A quimiluminescência foi detectada em sistema de imagens Amersham (Biorad, CA, USA) e a análise de densitometria óptica foi realizada por meio do *software Scion Image* (Scioncorp, USA).

A quantificação das histonas em camundongos foi realizada 4 e 6 dias após a indução da DP, já nos ratos o tempo de análise foi após os 30 dias de indução do modelo da DP.

Tabela 3. Relação de anticorpos utilizados para técnica de *Western Blot*.

Anticorpo primário	Marca	Concentração	Anticorpo secundário 1:500 Cell Signaling
<i>Mouse x beta actina</i>	<i>Cell Signaling</i>	1:2000	<i>Anti rabbit HRP-linked</i>
<i>Rabbit x H3</i>	<i>Cell Signaling</i>	1:4000	<i>Anti mouse HRP-linked</i>
<i>Rabbit x H3K4me3</i>	<i>Cell Signaling</i>	1:500	<i>Anti mouse HRP-linked</i>
<i>Rabbit x H327me3</i>	<i>Cell Signaling</i>	1:500	<i>Anti mouse HRP-linked</i>
<i>Rabbit x H3K9ac</i>	<i>Cell Signaling</i>	1:500	<i>Anti mouse HRP-linked</i>

4.8 Ensaio de ELISA para detecção da atividade de SIRT2

Para análise da atividade da SIRT2, os tecidos dos grupos veículo e 6-OHDA dos núcleos respiratórios dos camundongos foram coletados da mesma maneira que para o WB. Os camundongos foram profundamente anestesiados com isoflurano (5% em O₂) e decapitados com o auxílio de uma tesoura. Os encéfalos foram rapidamente removidos e colocados em bloco de agarose 2,5% e submergidos em uma base de apoio de um vibratomo (Vibratome 1500, Vibratome, MO, USA) contendo líquido cerebrospinal artificial gelado (Mg₂SO₄-50 mM; KH₂PO₄-50 mM; KCl-200 mM; NaHCO₃-1 M; NaCl-5 M; CaCl-100 mM e D-glicose-20 mM) para cortes histológicos contendo as regiões de interesse para camundongo [NTSc, bregma -8,24 mm (corte de ~350 µm de espessura a partir da transição entre medula espinal e bulbo), NTSi, bregma -7,92 mm (corte de ~550 µm de espessura após a coleta do NTSc; surgimento da área postrema), coluna respiratória ventral - GRV, incluindo rVRG retirado do corte que também contém o NTSi e preBotC, bregma -7,32 mm (corte de ~400 µm de espessura após a coleta do NTSi) e RTN, bregma -6,48 mm (após desprezar ~400 µm (Complexo de Botzinger), corte de ~500 µm de espessura). A atividade da enzima foi quantificada por kit comercial fluorimétrico (SIRT2 Direct Fluorescent Screening Assay Kit – Cayman Chemical, 2015), conforme instruções do fabricante (% de inibição ou ativação), nos animais veículo e nos tempos 4 e 6 dias após a indução da DP.

4.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software). Os dados foram tabelados e representados em gráficos de barra como média \pm desvio padrão (WB) e box e whiskers plot (IH, pletismografia, peso e ELISA). Teste T de *Student* ou *One-Way* ANOVA foram utilizados para comparação entre as médias. O índice de significância foi fixado em $p < 0,05$.

4.10 Protocolo Experimental

Os camundongos foram divididos em 4 grupos (veículo, PD 4 dias, PD 6 dias e PD 10 dias) e os ratos em 2 grupos (veículo, PD 30 dias). Para a análise funcional e imunohistoquímica das modificações nas histonas nos camundongos, os experimentos foram realizados após 10 dias de indução do modelo de DP, período em que há o déficit funcional respiratório devido a neurodegeneração dos núcleos respiratórios. Para a análise de WB e ELISA, o período de análise foi quando os núcleos respiratórios ainda não foram degenerados: em camundongos 4 dias após indução do modelo de DP, antes da degeneração do núcleo RTN e 6 dias após a indução do modelo de DP, antes da degeneração do preBotC. Em ratos, a análise de WB foi após 30 dias da indução do modelo de DP, antes da degeneração do rVRG e preBotC.

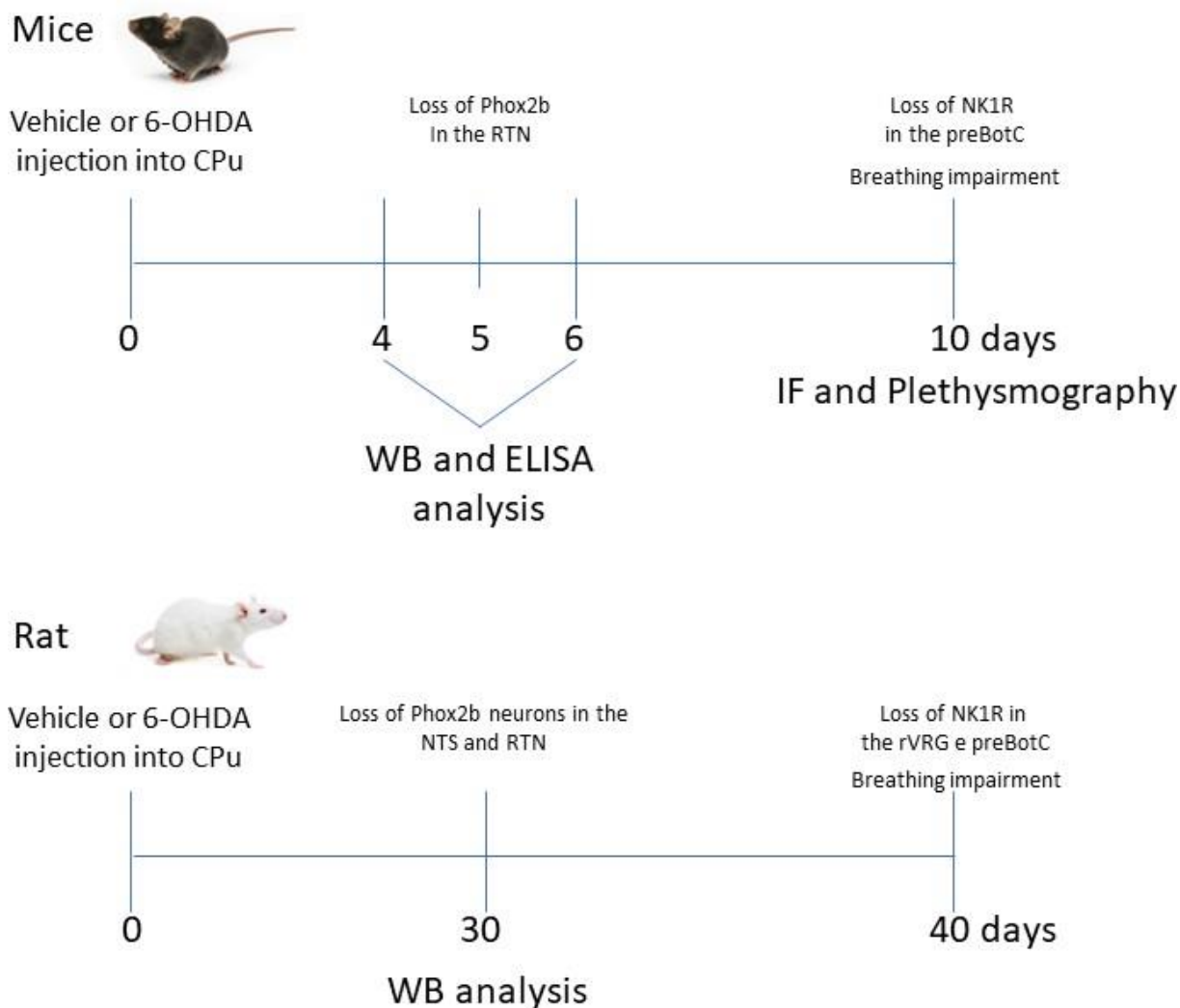


Figura 5: Protocolo experimental.

Para promoção do modelo de DP, foram injetados bilateralmente no estriado a toxina 6-OHDA ou veículo. Em camundongos, após 10 dias da indução do modelo de DP, os neurônios respiratórios estão degenerados e apresentam déficit respiratório funcional - comprovados por pletismografia -, momento em que foi avaliada, por fluorescência, a presença das modificações pós-traducionais das histonas (H3K4me3, H3K9ac e H3K27me3) nos núcleos respiratórios. Após 4 dias da indução do modelo de DP, foram avaliadas as expressões proteicas das modificações pós-traducionais das histonas por WB e atividade da SIRT por ELISA nos núcleos respiratórios. Em ratos, após 30 dias da indução do modelo de DP, foram avaliadas as expressões proteicas das modificações pós-traducionais das histonas por WB nos núcleos respiratórios, momento no qual o núcleo RTN e NTS já estão degenerados (perda do phox2b) e que antecede a degeneração dos núcleos rVRG e preBotC (perda dos receptores NK1). Em ratos, o déficit respiratório funcional ocorre aos 40 dias após a indução do modelo de DP.

5 RESULTADOS

5.1 Confirmação do modelo experimental da Doença de Parkinson

A partir da reação de imuno-histoquímica para tirosina-hidroxilase (TH) nos neurônios da Substância Negra (SN), foi possível observar a perda significativa de neurônios catecolaminérgicos na SN dos animais do grupo 6-OHDA (n=10) comparado com animais controle injetados com veículo (n=12) após 10 dias (6-OHDA: $4,4 \pm 1,4$ vs. veículo: $14,6 \pm 3,7$ neurônios por secção, $t_{(10,12)}=8,056$, $p<000,1$) (Fig. 6 A-C). Ainda, como esperado, o grupo 6-OHDA (n=9) apresentou significativa perda no peso corporal comparado ao veículo (n=13) após 10 dias (6-OHDA: $-7,11 \pm 3,1$ vs. veículo $1,15 \pm 0,9$ gramas, $t_{(9,13)}= 8.056$, $p<000,1$) (Fig. 6 D).

As medidas ventilatórias foram obtidas 10 dias após as injeções de 6-OHDA (n=12) ou veículo (n=10) por meio da técnica de pletismografia de corpo inteiro. Foi confirmado, conforme observado anteriormente (OLIVEIRA et al., 2019), o déficit respiratório observados nos animais 6-OHDA durante a normóxia com a redução da frequência respiratória (F_R) (6-OHDA: $158,3 \pm 26,5$ vs. veículo: $187,6 \pm 17,1$ respirações por minuto, $t_{17}=2,851$, $p=0,0111$) devido ao aumento do tempo inspiratório (T_i) (6-OHDA: $143,3 \pm 15,2$ vs. veículo: $124,7 \pm 5,3$ ms, $t_{17}=4,116$, $p=0,007$) e tempo expiratório (T_e) (6-OHDA: $254,3 \pm 57,4$ vs. veículo: $206,4 \pm 34,6$ ms, $T_{17}=2,239$, $p=0,0388$) com consequente redução na ventilação minuto (V_E) (6-OHDA: $767,1 \pm 137,7$ vs. veículo: $971,3 \pm 149,0$ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$, $t_{17}=2,676$, $p=0,0160$), sem alteração no volume corrente (V_T) (6-OHDA: $4,9 \pm 0,7$ vs. veículo: $5,2 \pm 0,7$ $\mu\text{l}/\text{min}$, $t_{17}=0,9065$, $p=0,3373$) (Fig. 6E-I). Da mesma maneira foram observados os déficits respiratórios no modelo DP durante a hipercapnia com a redução da F_R (6-OHDA: $266,1 \pm 30,1$ vs. veículo: $336,9 \pm 46,6$ respirações por minuto, $t_{17}=3,138$, $p=0,0060$) e aumento de T_e (6-OHDA: $125,5 \pm 18,7$ vs. veículo: $96,2 \pm 17,3$ ms, $t_{17}=3,186$, $p=0,0054$) com consequente redução na V_E (6-OHDA: $2.842,7 \pm 913,5$ vs. veículo: $3.994,5 \pm 934,4$ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$, $t_{17}=2,378$, $p=0,0294$), sem alteração no V_T (6-OHDA: $10,5 \pm 2,8$ vs. veículo: $11,7 \pm 1,5$ $\mu\text{l}/\text{min}$, $t_{17}=1,256$, $p=0,2252$) e T_i (6-OHDA: $104,2 \pm 11$ vs. veículo: $86,6 \pm 9,3$ $\mu\text{l}/\text{min}$, $t_{17}=3,467$, $p=0,0029$) (Fig. 6J-N).

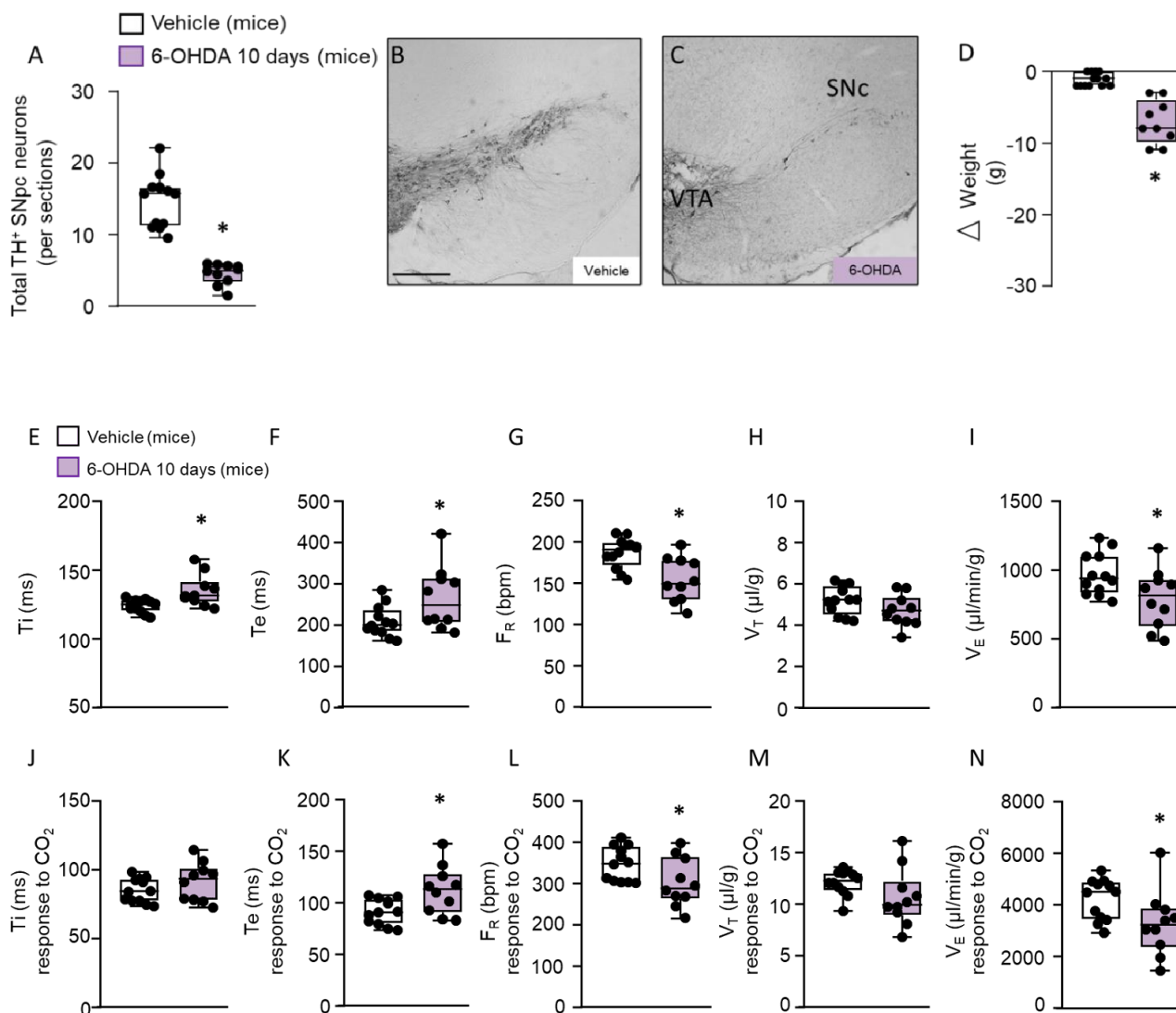


Figura 6: 6-OHDA promoveu neurodegeneração na SN, déficit respiratório funcional e perda de peso em camundongos após 10 dias, confirmando o modelo de DP.

A) Gráfico representativo da contagem total de neurônios TH imunorreativos na região da SN nos grupos veículo e 6-OHDA (n=10-12/grupo). B-C) Fotomicrografias representativas dos neurônios TH⁺ na SN nos grupos veículo e 6-OHDA, respectivamente. D) Representação gráfica do delta de peso, em grama, dos animais dos grupos veículo e 6-OHDA (n=9-13/grupo). E-N) Representação gráfica dos grupos veículo e 6-OHDA dos parâmetros respiratórios avaliados durante normóxia (E-I) e hipercapnia (J-N), respectivamente. Abreviações: VTA: Área tegmental ventral, SNc: Substância negra compacta. Escala em B= 300μm também se aplica a C, n=9-14, * Diferente do veículo, p<0,05 (Teste T de Student).

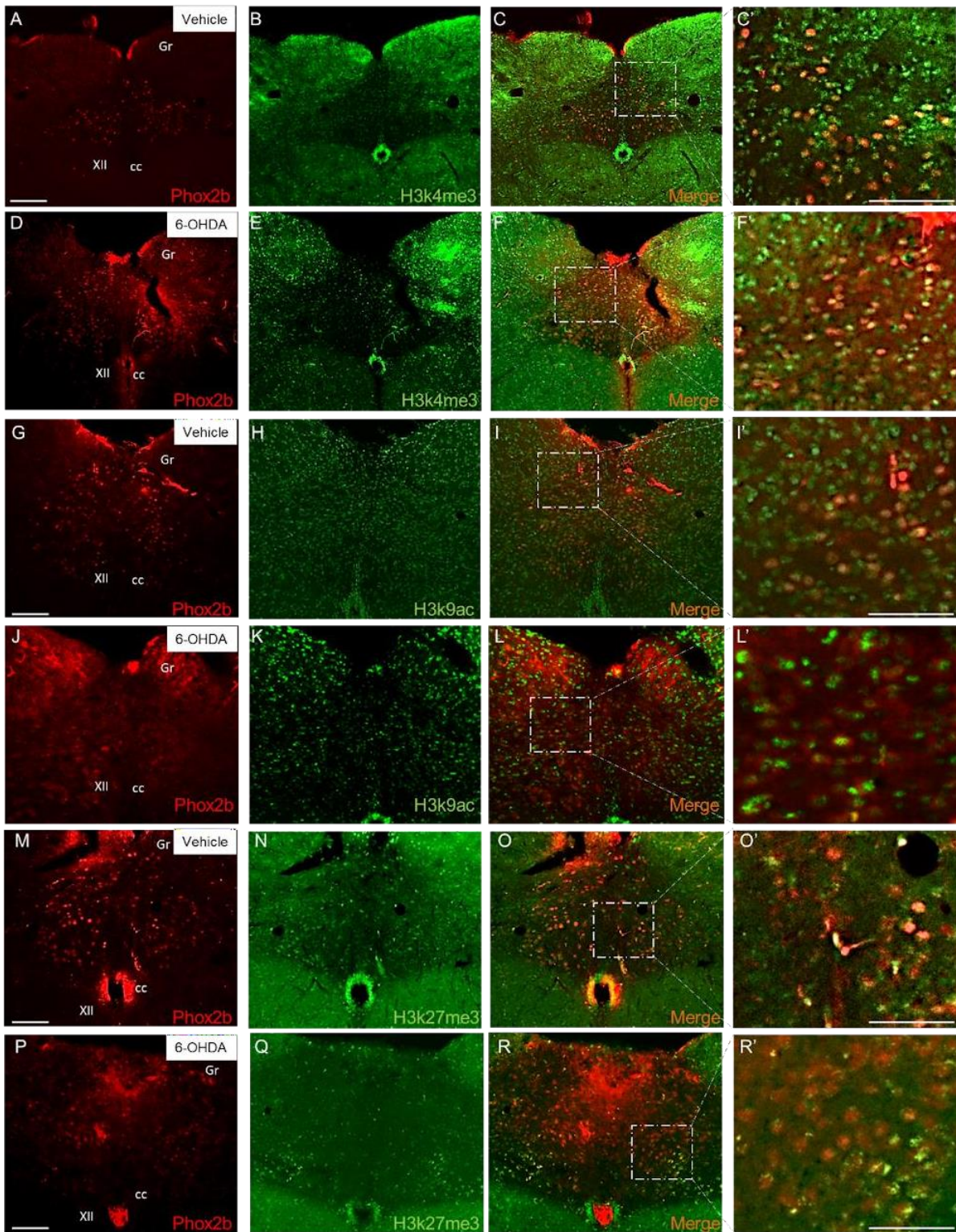
5.2 Alterações nas histonas nos núcleos respiratórios no modelo de DP

5.2.1 Análise pela técnica de Imunofluorescência após a neurodegeneração nos núcleos respiratórios no modelo de DP

A partir da técnica de imunofluorescência foram realizados os experimentos de dupla marcação para a presença das alterações nas histonas nos núcleos respiratórios com dupla marcação para phox2b ou DAPI. Após 10 dias de indução do modelo de DP foi demonstrado que há degeneração nos núcleos respiratórios em camundongos (OLIVEIRA et al., 2019).

Assim, para que não houvesse viés na contagem das histonas (H3K4me3, H3K9ac e H3K27me3), já que o grupo 6-OHDA teria menos neurônios, na avaliação do núcleo RTN foram quantificadas as células phox2b remanescentes duplamente marcadas com a alteração na histona por densidade integrada/área e para as regiões do rVRG e preBotC foram quantificadas as células remanescentes DAPI duplamente marcadas com a alteração na histona por densidade integrada/área. A quantificação de phox2b e alteração na histona no núcleo NTS foi realizada como controle, já que este não apresenta degeneração no modelo de DP em camundongos.

De forma quantitativa, no NTS não foram observadas diferenças nas histonas H3K4me3 (6-OHDA $95,4 \pm 11,05$ vs. veículo: $93,5 \pm 81,7$ densidade integrada/área, $t_{(5,4)}=0,2929$, $p=0,7781$) (Fig. 7A-F' e S), H3K9ac (6-OHDA: $75,1 \pm 27,7$ vs. veículo: $66,5 \pm 22,5$ densidade integrada/área, $t_{(4,5)}=0,5006$, $p=0,6320$) (Fig. 7G-L' e T) e H3K27me3 (6-OHDA: $63,5 \pm 21,3$ vs. veículo: $65,1 \pm 23,3$ densidade integrada/área, $t_{(4,7)}=0,1201$, $p=0,7071$) (Fig. 7M-R' e U) duplamente marcadas com Phox2b após 10 dias das injeções de veículo e 6-OHDA. O mesmo foi observado, no RTN, na contagem das histonas H3K4me3 (6-OHDA: $58,3 \pm 34,8$ vs. veículo: $67,4 \pm 29,8$ densidade integrada/área, $t_{(4,5)}=0,4218$, $p=0,6858$) (Fig. 10A-F' e S), H3K9ac (6-OHDA: $70,4 \pm 32,2$ vs. veículo: $94,0 \pm 17,4$ densidade integrada/área, $t_{(4,4)}=1,285$, $p=0,2461$) (Fig. 10G-L' e T) e H3K27me3 (6-OHDA: $80,7 \pm 53,8$ vs. veículo: $46,8 \pm 11,7$ densidade integrada/área, $t_{(5,5)}=1,222$, $p=0,2611$) (Fig. 10M-R' e U) duplamente marcadas com Phox2b após 10 dias das injeções de veículo e 6-OHDA. Também, no núcleo rVRG, não foram observadas diferenças nas histonas H3K4me3 (6-OHDA: $35,3 \pm 91,0$ vs. veículo: $34,1 \pm 54,5$ densidade integrada/área, $t_{(4,4)}=0,2217$, $p=0,8319$) (Fig. 8A-F' e S), H3K9ac (6-OHDA: $21,7 \pm 58,3$ vs. veículo: $27,8 \pm 70,9$ densidade integrada/área, $t_{(4,5)}=0,2838$, $p=0,2375$) (Fig. 8G-L' e T) e H3K27me3 (6-OHDA: $29,4 \pm 56,4$ vs. veículo: $29,9 \pm 70,8$ densidade integrada/área, $t_{(5,5)}=0,1128$, $p=0,9130$) (Fig. 8M-R' e U) duplamente marcadas com DAPI após 10 dias das injeções de veículo e 6-OHDA. No núcleo preBotC não foram observadas diferenças entre os grupos, após 10 dias, nas histonas H3K4me3 (6-OHDA: $58,3 \pm 34,6$ vs. veículo: $42,6 \pm 11,1$ densidade integrada/área, $t_{(4,4)}=1,032$, $p=0,3418$) (Fig. 9A-F' e S) e H3K9ac (6-OHDA: $29,6 \pm 10,8$ vs. veículo: $27,8 \pm 70,9$ densidade integrada/área, $t_{(5,5)}=0,2838$, $p=0,7848$) (Fig. 9G-L' e T) duplamente marcadas com DAPI após 10 dias das injeções de veículo e 6-OHDA. No entanto, no núcleo preBotC, a H3K27me3 mostrou-se reduzida no grupo 6-OHDA comparada ao veículo (6-OHDA: $29,5 \pm 32,5$ vs. veículo: $55,8 \pm 15,1$ densidade integrada/área, $t_{(4,7)}=4,587$, $p>0,0013$) (Fig. 9M-R' e U).



□ Vehicle (mice)
 ■ 6-OHDA 10 days (mice)

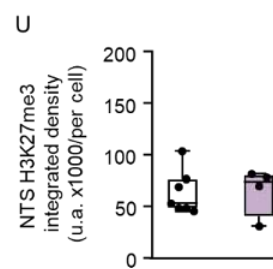
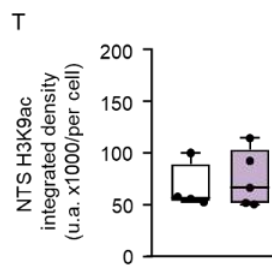
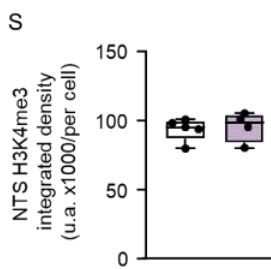


Figura 7: Imunofluorescência das histonas H3K4me3, H3K9ac e H3K27me3 na região do NTS em camundongos.

Fotomicrografias representativas da marcação de phox2b (A e D), H3K4me3 (B e E) e sobreposição (C-C' e F-F') no NTS nos grupos veículo e 6-OHDA respectivamente. G-L) Fotomicrografias representativas da marcação de phox2b (G e J), H3K9ac (H e K) e sobreposição (I-I' e L-L') no NTS nos grupos veículo e 6-OHDA respectivamente. M-N) Fotomicrografias representativas da marcação de phox2b (M e P), H3K27me3 (N e Q) e sobreposição (O-O' e R-R') no NTS nos grupos veículo e 6-OHDA respectivamente. S-U) Representação gráfica da densidade integrada das histonas (S) H3K4me3, (T) H4K9ac e (U) H3K27me3 nos grupos veículo (n=4-5) e 6-OHDA (n=4-7) na região do NTS. Escala em A= 200µm se aplica a B-R e em C'= 200µm se aplica a F', I', L'. O' e R'. Abreviações: Gr: Núcleo Gracil; cc: Canal central; XII: Núcleo Hipoglosso.

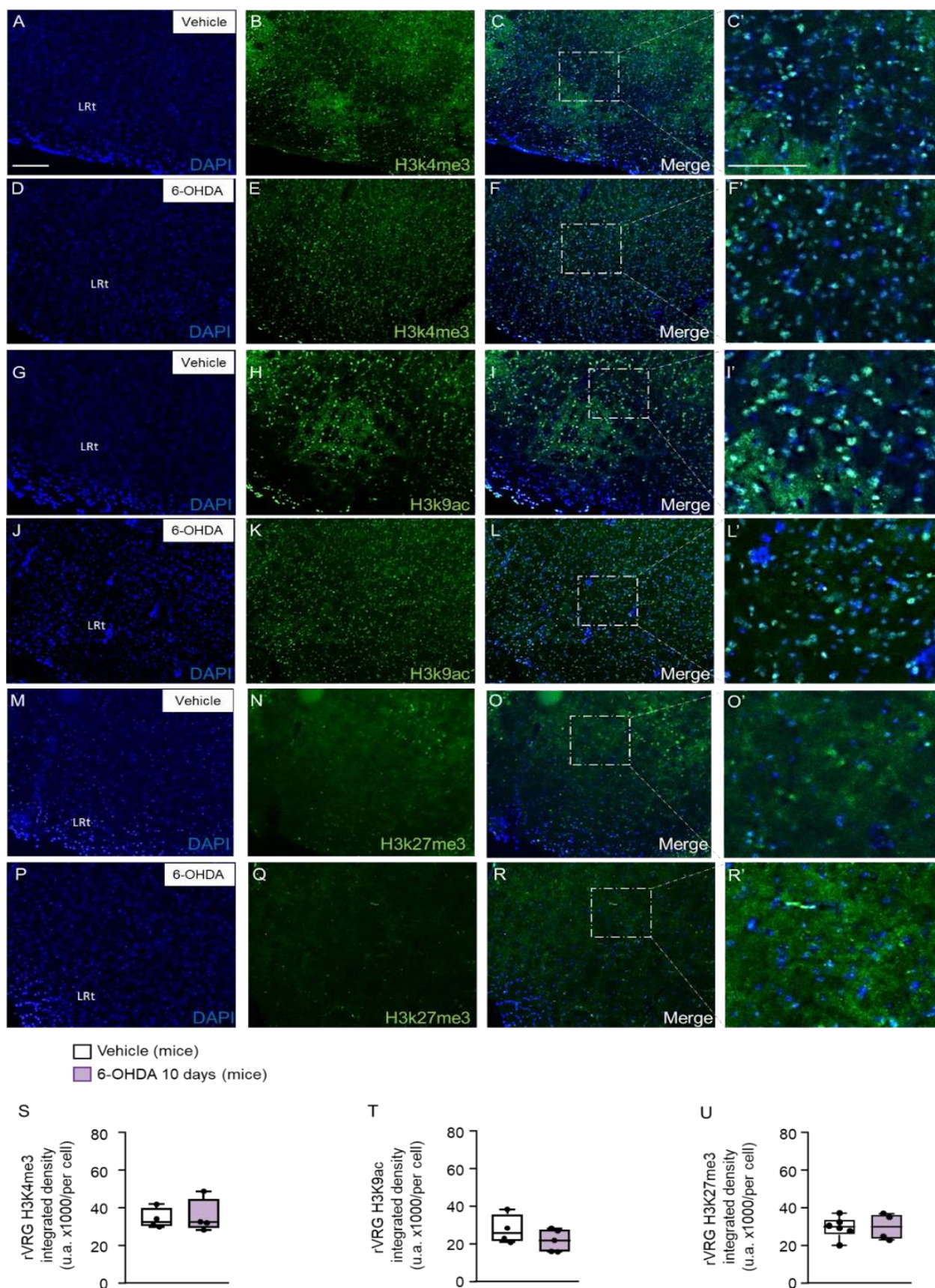


Figura 8: Imunofluorescência das histonas H3K4me3, H3K9ac e H3K27me3 na região do rVRG em camundongos.

Fotomicrografias representativas da marcação de DAPI (A e D), H3K4me3 (B e E) e sobreposição (C-C' e F-F') no rVRG nos grupos veículo e 6-OHDA, respectivamente. G-L) Fotomicrografias representativas da

marcação de DAPI (G e J), H3K9ac (H e K) e sobreposição (I-I' e L-L') no rVRG nos grupos veículo e 6-OHDA, respectivamente. (M-N) Fotomicrografias representativas da marcação de DAPI (M e P), H3K27me3 (N e Q) e sobreposição (O-O' e R-R') no rVRG nos grupos veículo e 6-OHDA, respectivamente. S- U) Representação gráfica da densidade integrada das histonas (S) H3K4me3, (T) H4K9ac e (U) H3K27me3 nos grupos veículo (n=4-5) e 6-OHDA (n=4-6) na região do rVRG. Escala em A= 200µm se aplica a B-L e em C'= 200µm se aplica a F', I', L'. O' e R'. Abreviação: LRt: Núcleo reticular lateral.

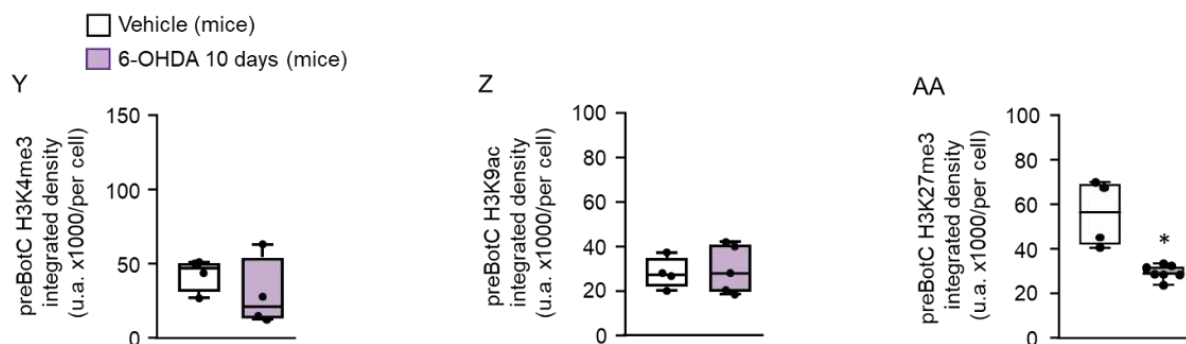
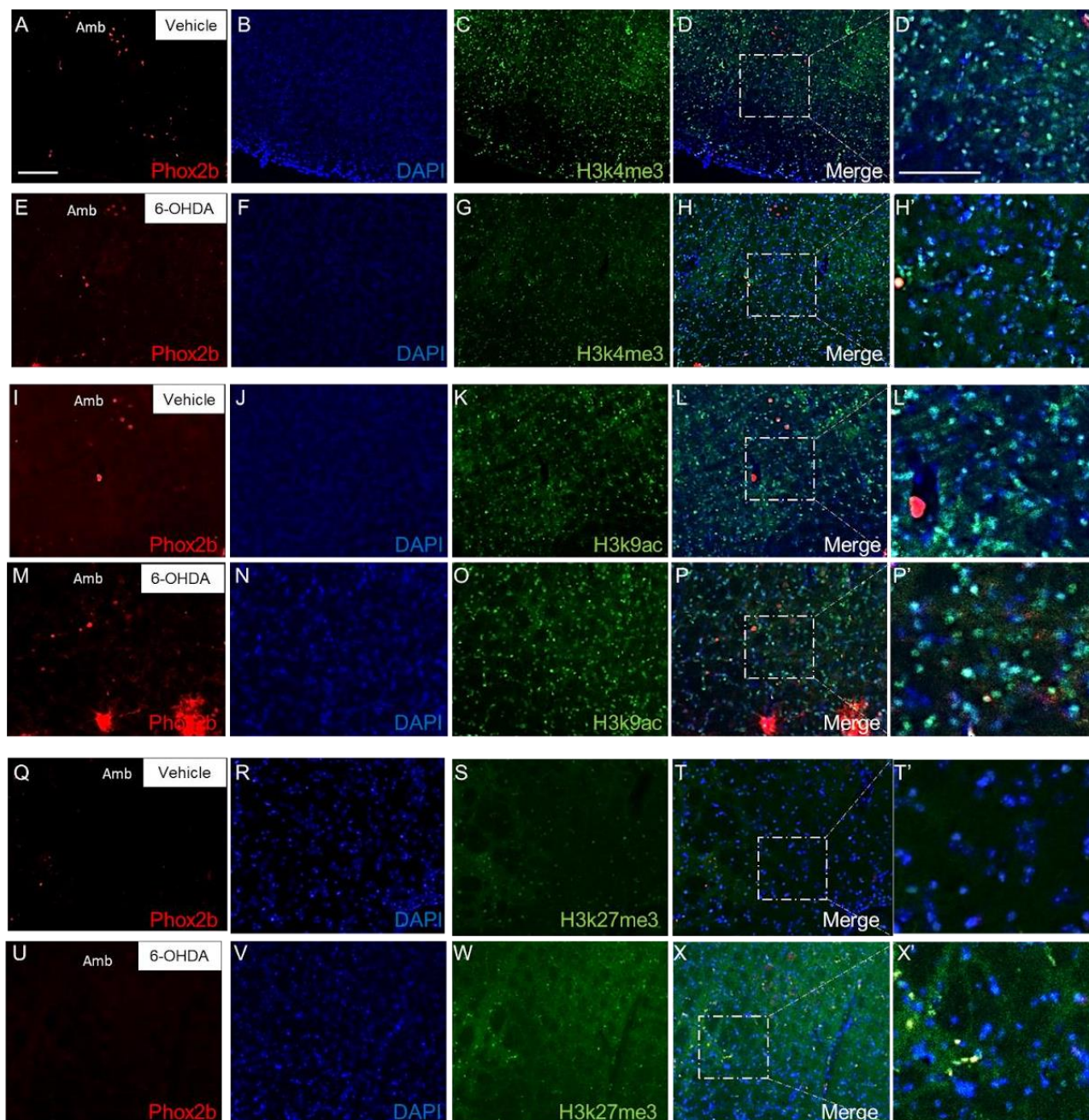
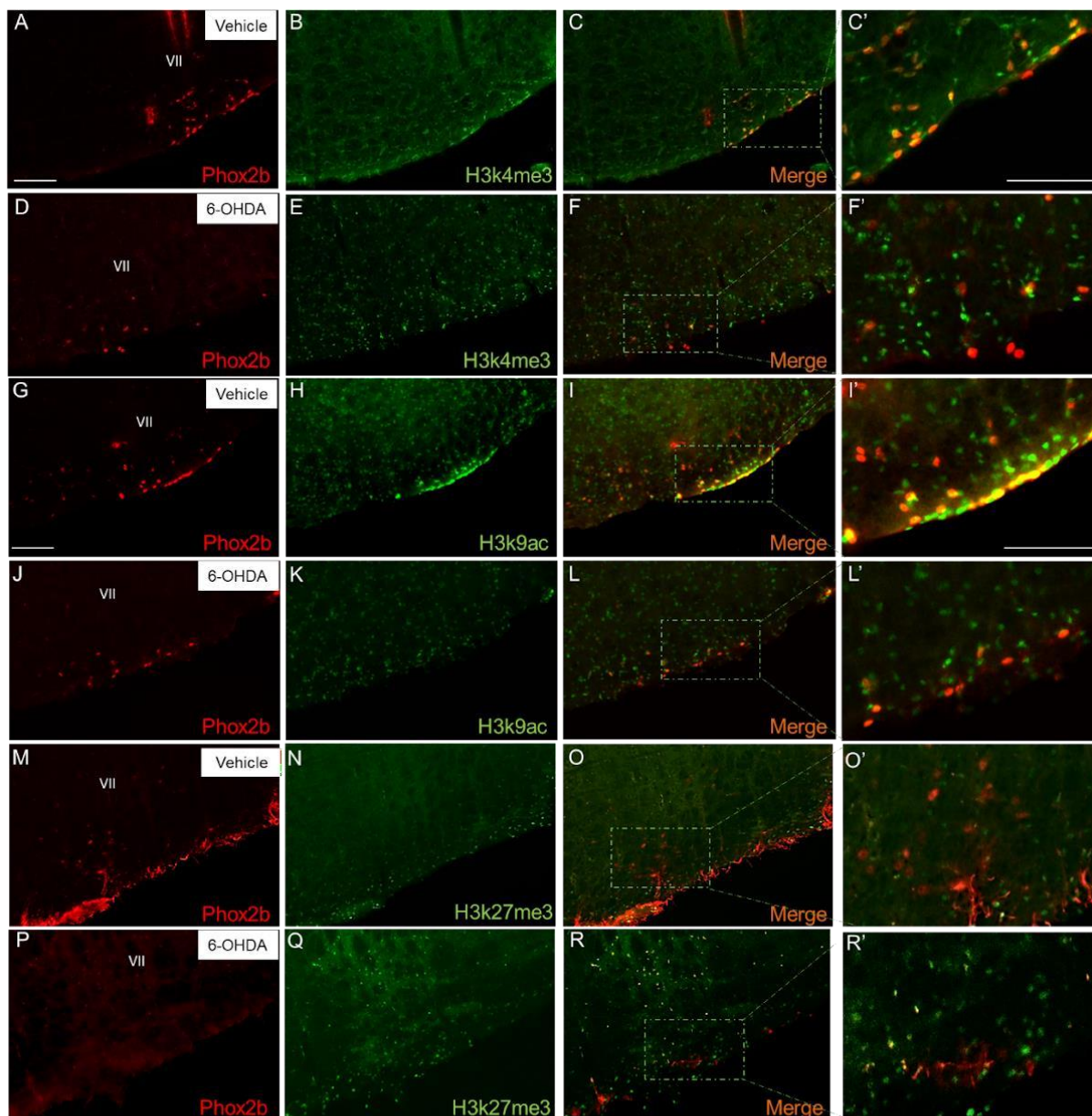


Figura 9: Imunofluorescência das histonas H3K4me3, H3K9ac e H3K27me3 na região do preBotC em camundongos.

Fotomicrografias representativas da marcação de phox2b para localização do núcleo ambíguo (Amb) (A e E); marcação de DAPI (B e F), H3K4me3 (C e G) e sobreposição (D-D' e H-H') no preBotC nos grupos veículo

e 6-OHDA, respectivamente. I-M) Fotomicrografias representativas da marcação do núcleo ambíguos (I e M), DAPI (J e N), H3K9ac (K e O) e sobreposição (L-L' e P-P') no preBotC nos grupos veículo e 6-OHDA, respectivamente. Q-U) Fotomicrografias representativas da marcação o núcleo ambíguos (Q e U), DAPI (R e V), H3K27me3 (S e W) e sobreposição (T-T' e X-X') no preBotC nos grupos veículo e 6-OHDA, respectivamente. S- U) Representação gráfica da densidade integrada das histonas (S) H3K4me3, (T) H4K9ac e (U) H3K27me3 nos grupos veículo (n=4) e 6-OHDA (n=4-7). Escala em A= 200 μ m se aplica a B-L e em C'= 200 μ m se aplica a F', I', L'. O' e R'. * Diferente do veículo, p<0,05 (Teste T de Student). Abreviação: Amb: Núcleo ambíguos.



□ Vehicle (mice)
 ■ 6-OHDA 10 days (mice)

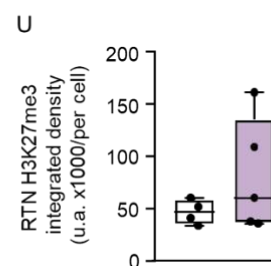
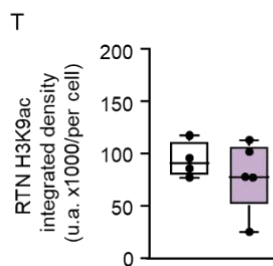
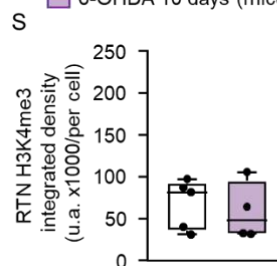


Figura 10: Imunofluorescência das histonas H3K4me3, H3K9ac e H3K27me3 na região do RTN em camundongos.

Fotomicrografias representativas da marcação de phox2b (A e D), H3K4me3 (B e E) e sobreposição (C-C' e F-F') no RTN nos grupos veículo e 6-OHDA, respectivamente. G-L) Fotomicrografias representativas da marcação de phox2b (G-J), H3K9ac (H e K) e sobreposição (I-I' e L-L') no RTN nos grupos veículo e 6-OHDA, respectivamente. (M-N) Fotomicrografias representativas da marcação de phox2b (M e P), H3K27me3 (N e Q) e sobreposição (O-O' e R-R') no RTN nos grupos veículo e 6-OHDA, respectivamente. S-U) Representação gráfica da densidade integrada das histonas (S) H3K4me3, (T) H4K9ac e (U) H3K27me3 nos grupos veículo (n=4-5) e 6-OHDA (n=4-5) na região do RTN. Escala em A= 200 μ m se aplica a B-R e em C'= 200 μ m se aplica a F', I', L'. O' e R'. Abreviação: VII: Núcleo motor do Facial.

5.2.2 Quantificação de proteínas por *Western Blot* antes da neurodegeneração dos núcleos respiratório no modelo de DP

A técnica de *Western Blot* foi realizada para avaliar a quantificação proteica das alterações das histonas (H3K4me3, H3K9ac e H3K27me3) nos tempos 4 e 6 dias após indução do modelo de DP, período prévio a neurodegeneração dos núcleos respiratórios RTN e preBotC, respectivamente. Um *pool* de 4 camundongos foi realizado para ter 1 n amostral. A partir da reação de imuno-histoquímica para tirosina-hidroxilase (TH) nos neurônios da substância negra (SN), foi possível quantificar a lesão dos neurônios catecolaminérgicos causada pela injeção da 6-OHDA no modelo animal de DP comparado ao grupo veículo. Os animais foram divididos em três grupos, veículo (n=44), 6-OHDA 4 dias (n=32) e 6-OHDA 6 dias (n=31), onde após a injeção da droga, 4 e 6 dias depois, respectivamente, os animais apresentaram uma perda significativa de neurônios catecolaminérgicos na SN em relação ao grupo veículo (6-OHDA 4 dias: $2,9 \pm 0,5$, 6-OHDA 6 dias: $3,0 \pm 0,7$ vs. veículo $13,3 \pm 2,17$ neurônios por secção, $F_{(44,32,31)}=684,8$, $p<000,1$) (Fig. 11A-D), assim, confirmando o modelo da DP. Ainda, como esperado, os animais dos grupos 6-OHDA apresentaram perda de peso em relação ao grupo controle (6-OHDA 4 dias: $-6,9 \pm 2,9$; 6-OHDA 6 dias: $-8,4 \pm 2,7$ vs. veículo $-1,4 \pm 1,00$ gramas, $F_{(44,32,31)}=77,31$, $p<000,1$) (Fig. 11E).

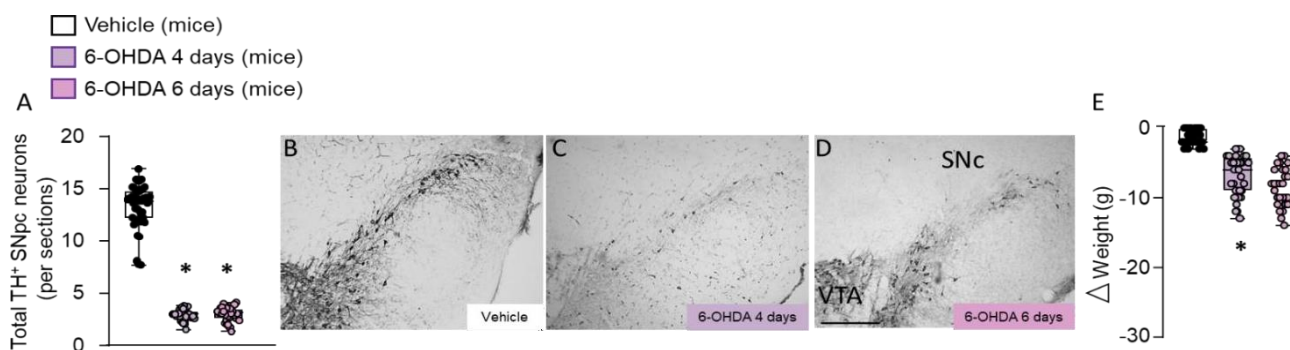


Figura 11: 6-OHDA promoveu neurodegeneração na SN e levou a perda de peso em ambos os grupos 6-OHDA em camundongos.

A) Representação gráfica da contagem total de neurônios TH imunorreativos na região da SN nos grupos veículo (n=32), 6-OHDA 4 dias (n=32) e 6-OHDA 6 dias (n=32). B-D) Fotomicrografias representativas dos neurônios TH⁺ na SN nos grupos veículo, 6-OHDA 4 dias e 6 dias, respectivamente. E) Gráfico representativo do peso, em grama, dos animais dos grupos veículo, 6-OHDA 4 dias e 6 dias. Escala em D= 300µm também se aplica a B e C. * Diferente do veículo, p<0,05 (One-Way ANOVA). Abreviações: VTA: Área tegmental ventral; SNC: Substância negra, parte compacta.

Entretanto, o n utilizado para fazer o *pool* de animais não foi suficiente para o preparo das amostras, tendo em vista que os núcleos respiratórios são extremamente pequenos, sendo a concentração de proteínas muito baixa. A padronização da técnica não foi satisfatória pela análise da proteína endógena utilizada como controle (beta-actina). Assim, padronizamos a técnica de WB em ratos (pool de 3 animais para n=1) que sofreram indução da DP por 6-OHDA após 30 dias, período em que ocorre sinalizações pró-apoptóticas nos núcleos rVRG e preBotC e anti-apoptóticas nos núcleos NTS e RTN, conforme dados do nosso laboratório (FALQUETTO et al., 2020). O modelo da DP foi confirmado, com a redução da expressão de TH no grupo 6-OHDA (n=15) comparado ao grupo veículo (n=16) (6-OHDA: $26,89 \pm 3,7$ vs. veículo: $98,4 \pm 16,4$ neurônios por secção, $t_{31}=16,50$, $p<0,001$) (Fig. 12A-C). Na padronização não observamos alterações na beta-actina entre os grupos, NTSc: (6-OHDA: $70,23 \pm 38,1$ vs veículo $68,2 \pm 45,08$ % do controle, $t_{(8,8)}=0,09561$, $p=0,9252$) (Fig. 1 D); NTSi: (6-OHDA: $91,67 \pm 46,73$ vs veículo $100 \pm 69,63$ % do controle, $t_{(8,8)}=0,2810$, $p=0,7828$) (Figura 12 E); rVRG/preBotC: (6-OHDA: $120,2 \pm 61,26$ vs veículo $100 \pm 39,42$ % do controle, $t_{(6,6)}=0,6795$ $p=0,5122$) (Figura 12F); RTN: (6-OHDA: $19,4 \pm 79,09$ vs veículo $100 \pm 28,56$ % do controle, $t_{(6,6)}=1,380$, $p=0,1976$) (Figura 12G).

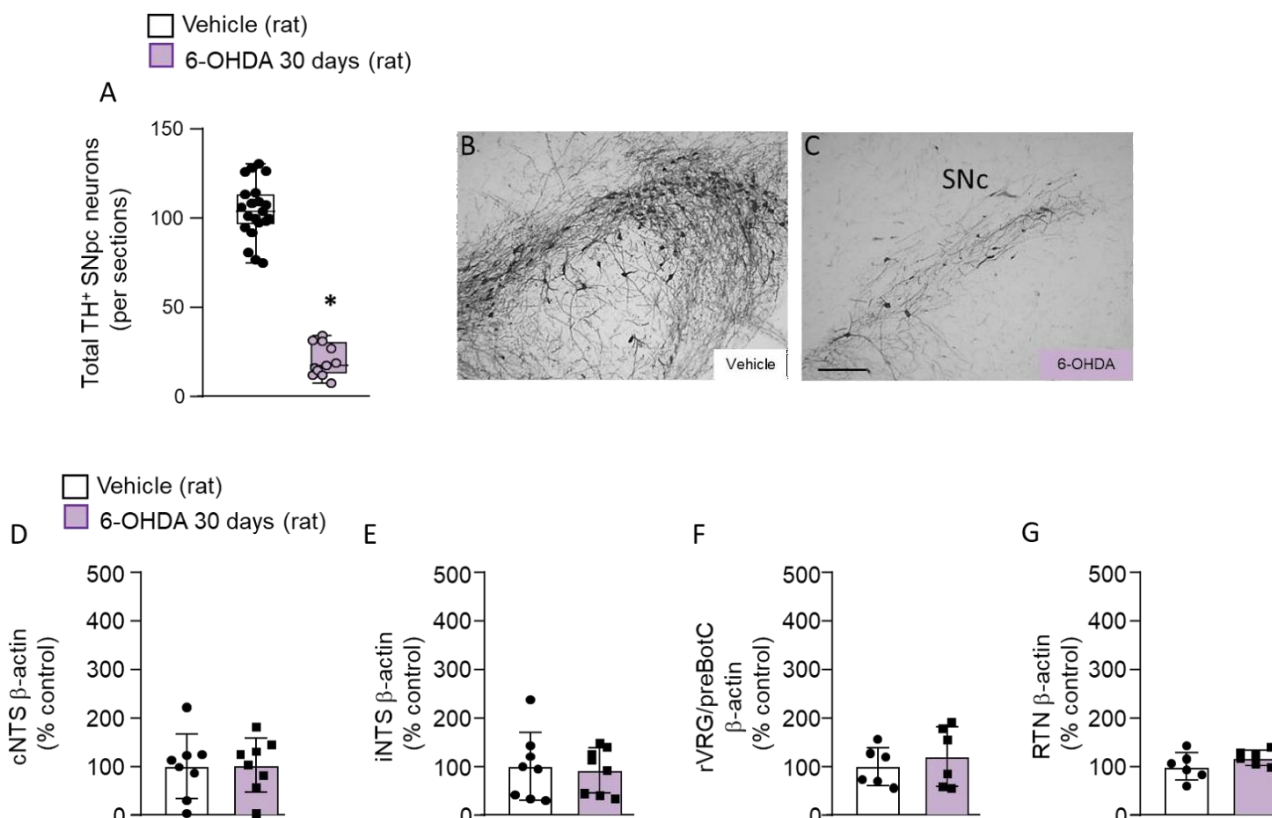


Figura 12: 6-OHDA promoveu neurodegeneração na SN sem alterar proteína endógena em ratos.

A) Gráfico representativo da contagem total de neurônios TH imunorreativos na região da SN nos grupos veículo (n=16) e 6-OHDA (n=15). B-C) Fotomicrografias representativas dos neurônios TH⁺ na SN nos grupos veículo e 6-OHDA após 30 dias, respectivamente. D-G) Gráficos representativos da porcentagem de beta-actina nos núcleos respiratórios nos grupos veículo (n=8) e 6-OHDA (n=8), D) NTSc/beta-actina, E) NTSi/beta-actina, F) rVRG/preBotC/beta-actina e G) RTN/beta-actina. Escala em C= 300μm também se aplica a B. Abreviação: SNc: Substância negra, parte compacta.

Após a padronização pela beta-actina realizamos a quantificação da histona 3 total (H3) para verificar a presença da mesma nas amostras coletadas, como um outro controle para confirmar posteriormente a presença ou não das metilações e acetilação nos núcleos respiratórios (Fig. 13). Onde, NTSc: (6-OHDA: $128 \pm 36,73$ vs. veículo $100 \pm 51,51$ % do controle, $t_{(5,7)}=1,106$, $p=0,2947$) (Fig. 13A); NTSi: (6-OHDA: $120,8 \pm 82,34$ vs. veículo $100 \pm 60,09$ % do controle, $t_{(5,6)}=0,4694$, $p=0,6500$) (Fig. 13B); rVRG/preBotC: (6-OHDA: $130 \pm 64,84$ vs. veículo $100 \pm 56,41$ % do controle, $t_{(5,6)}=0,8047$, $p=0,4412$) (Fig.13C) ; RTN: (6-OHDA: $135,1 \pm 62,85$ vs. veículo $100 \pm 82,04$ % do controle, $t_{(6,6)}=0,8329$, $p=0,4243$) (Fig. 13D).

□ Vehicle (rat)
 ■ 6-OHDA 30 days (rat)

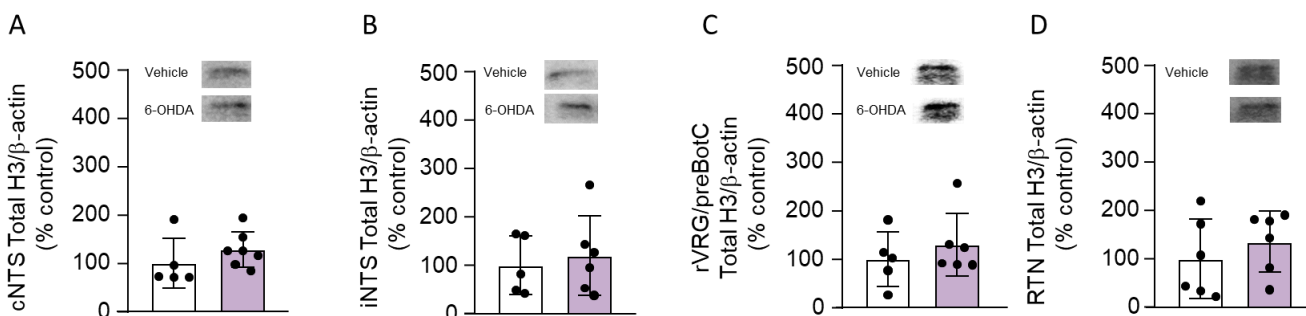


Figura 13: Normalização de H3 total por beta-actina nos núcleos respiratórios nos grupos veículo e 6-OHDA em ratos.

A-D) Representação gráfica da expressão da histona 3 total nos núcleos respiratórios nos grupos veículo e 6-OHDA. A) NTSc H3 total/beta-actina (6-OHDA: 7/veículo:5); B) NTSi H3 total/beta-actina (6-OHDA: 6/veículo:5); C) rVRG/preBotC H3 total/beta-actina (6-OHDA: 6/veículo:6); D) RTN H3 total/beta-actina (6-OHDA: 6/veículo:6).

Após a confirmação da presença da H3 total nos núcleos respiratórios, foi realizada a quantificação das metilações e acetilação da histona 3 do estudo. Somente a H3K9ac foi expressa nos núcleos respiratórios, com expressão proteica significativamente diminuída no NTSi e rVRG/preBotC no grupo 6-OHDA em relação ao grupo veículo (NTSc H3K9ac/H3 total: 6-OHDA: $108,4 \pm 41,2$ vs. veículo: $100,0 \pm 81,2$ % do controle, $t_{(5,5)}=0,2071$, $p=0,8411$) (Fig. 1 A); NTSi H3K9ac/H3 total: 6-OHDA: $18,07 \pm 11,08$ vs. veículo: $100,0 \pm 54,9$ % do controle, $t_{(6,5)}=3,255$, $p=0,0099$ (Fig. 14B); rVRG/preBotC H3K9ac/H3 total: 6-OHDA: $31,3 \pm 8,41$ vs. veículo: $100,0 \pm 62,3$ % do controle, $t_{(4,5)}=2,481$, $p=0,0416$ (Fig. 14C); RTN: H3K9ac/H3 total: 6-OHDA: $100,8 \pm 27,8$ vs. veículo: $100,0 \pm 38,8$ % do controle, $t_{(5,5)}=0,03945$, $p=0,9695$ (Fig. 14D)).

□ Vehicle (rat)
 ■ 6-OHDA 30 days (rat)

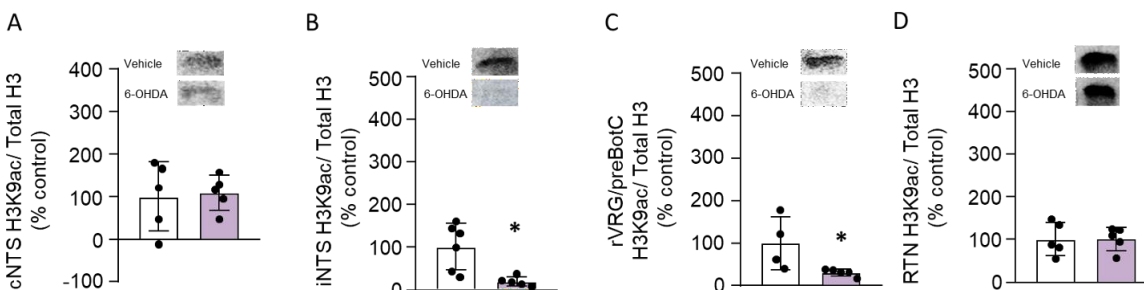


Figura 14: Expressão da H3K9ac nos núcleos respiratórios nos grupos veículo e 6-OHDA em ratos.

A-D) Representação gráfica da expressão da H3K9ac normalizada pela H3 total nos núcleos respiratórios nos grupos veículo e 6-OHDA. A) NTSc H3K9ac/H3 total (6-OHDA: 5/veículo:5); B) NTSi H3K9ac/H3 (6-OHDA: 6/veículo:5); C) rVRG/preBotC H3K9ac/H3 total (6-OHDA: 4/veículo:5); D) RTN H3K9ac/H3 (6-OHDA: 5/veículo:5); * Diferente do veículo, $p<0,05$ (Teste T de Student).

5.3 Alterações na atividade da HDAC Sirtuína 2 (SIRT 2) nos núcleos respiratórios no modelo de DP

Os camundongos foram divididos em 3 grupos experimentais, veículo (n=8), 6-OHDA 4 dias (n=7) e 6-OHDA 6 dias (n=8). Os grupos 6-OHDA foram confirmados através da técnica de imuno-histoquímica para TH (6-OHDA 4 dias $3,3 \pm 1,03$; 6-OHDA 6 dias: $3,27 \pm 0,42$ vs. veículo $13,34 \pm 1,8$ neurônios, $F_{(2,20)}=210,4$, $p<0,0001$) (Fig. 15A-D) e como esperado, os animais dos grupos 6-OHDA apresentaram redução do peso corporal comparado ao veículo (6-OHDA 4 dias: $-7,28 \pm 3,81$, 6-OHDA 6 dias: $-7,62 \pm 3,20$ vs. veículo: $-0,62 \pm 0,74$ gramas, $F_{(2,20)}=14,99$, $p=0,0001$) (Fig. 15E). Na avaliação do ELISA, observamos, aos 6 dias após indução do modelo de DP, o aumento da atividade da SIRT2 no rVRG/preBotC em relação ao grupo veículo (6-OHDA 4 dias: $0,62 \pm 0,11$; 6 dias: $0,98 \pm 0,10$ vs. veículo: $0,76 \pm 0,11$ % de inibição/ativação, $F_{(2,17)}=14,22$, $p=0,0003$) (Fig. 15G). Já na região do RTN observamos a redução da atividade enzimática aos 4 dias após indução da DP em relação ao grupo veículo (6-OHDA 4 dias: $0,59 \pm 0,11$; 6 dias: $0,86 \pm 0,17$ vs. veículo $0,91 \pm 0,17$ % de inibição/ativação; $F_{(2,12)}=12,08$, $p=0,0013$) (Fig. 15H). Como controle positivo, na região do córtex observamos o aumento da atividade da SIRT2 no grupo 6 dias após indução da DP em relação ao grupo veículo (6-OHDA 4 dias: $0,51 \pm 0,11$; 6 dias: $0,84 \pm 0,17$ vs. veículo: $0,62 \pm 0,06$ % de inibição/ativação; $F_{(2,8)}=8,512$, $p=0,0104$) (Fig. 15I) e como controle negativo, na região do NTS não observamos diferenças entre os grupos (6-OHDA 4 dias: $0,69 \pm 0,20$; 6 dias: $0,84 \pm 0,13$ vs. veículo: $0,62 \pm 0,06$ % de inibição/ativação; $F_{(2,15)}=0,4382$, $p=0,6532$) (Fig. 15F).

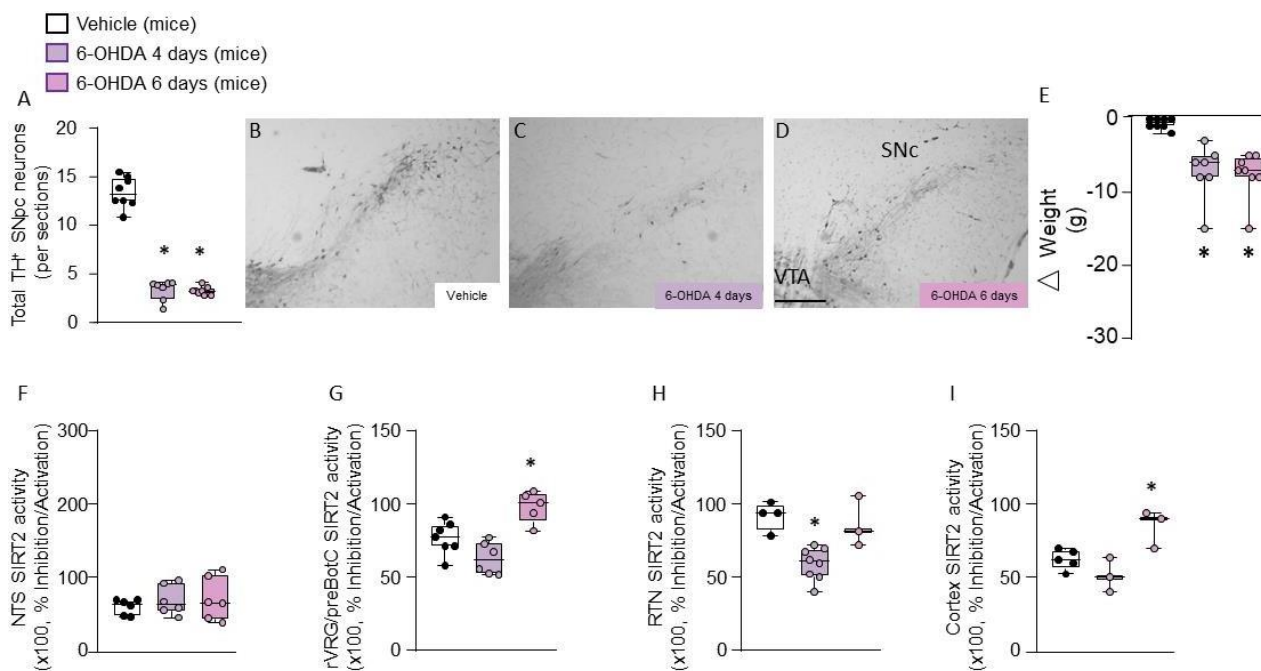


Figura 15: 6-OHDA promoveu neurodegeneração na SN, levou a perda de peso nos grupos 6-OHDA e alterações na atividade da SIRT2 nos núcleos respiratórios em camundongos.

A) Representação gráfica da contagem total de neurônios TH imunorreativos na região da SN nos grupos veículo (n=8), 6-OHDA 4 dias (n=7) e 6-OHDA 6 dias (n=7). B-D) Fotomicrografias representativas dos neurônios TH⁺ na SN nos grupos veículo, 6-OHDA 4 dias e 6 dias, respectivamente. E) Gráfico representativo do peso, em grama, dos animais dos grupos veículo, 6-OHDA 4 dias e 6 dias. Escala em D= 300µm também se aplica a B-C. F-I) Atividade da SIRT2 nos núcleos respiratórios (F) NTS, (G) rVRG/preBotC, (H) RTN e (I) Córtex. * Diferente do veículo, p<0,05 (One-way ANOVA). Abreviações: VTA: Área tegmental ventral; SNC: Substância negra, parte compacta.

6 DISCUSSÃO

Utilizando o modelo animal 6-OHDA da DP obtivemos dados importantes em relação as modificações epigenéticas nos núcleos respiratórios, tendo em vista que nosso trabalho é o primeiro a realizar esta caracterização. Foi visto por imunofluorescência que ocorreu uma diminuição da H3K27me3 na região do preBotC após 10 dias de indução do modelo de DP e aumento da atividade de SIRT2 na região do rVRG/preBotC aos 6 dias, redução na região do RTN aos 4 dias e aumento da atividade no córtex aos 6 dias após indução do modelo de DP em camundongos. Em ratos observamos diminuição da H3K9ac na região do NTSi e rVRG/preBotC após 30 dias de indução do modelo de DP.

O modelo animal de 6-OHDA leva a uma lesão neuroquímica dos neurônios catecolaminérgicos da via nigro-estriatal pelo acúmulo da toxina e alterações na homeostase celular, como a produção excessiva de radicais livres (GLINKA; GASSEN; OUDIM, 1997). A droga 6-OHDA apresenta estrutura análoga as catecolaminas (dopamina e noradrenalina), e quando inserida na região do estriado é capaz de realizar a lesão retrógrada dos neurônios catecolaminérgicos desta região para a SNc para que ocorra a perda progressiva dos neurônios, já que a administração local na SN promoveria a morte rápida destes neurônios. A droga é incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica e sua toxicidade só ocorre quando injetada estereotaxicamente nas regiões cerebrais (SIMOLA; MORELLI; CARTA, 2007).

No momento em que injetamos a droga, a neurodegeneração já se inicia. Para a neurodegeneração completa dos núcleos respiratórios, precisamos de 10 dias para a perda da capacidade funcional respiratória (OLIVEIRA et al., 2021). Para comprovar a perda dos neurônios catecolaminérgicos da SN, foi realizada a imuno-histoquímica desta região. No nosso modelo de camundongo observamos uma redução significativa na contagem de neurônios catecolaminérgicos onde os animais também perderam peso e a taxa de mortalidade do grupo 6-OHDA foi alta durante a execução do protocolo. A alta taxa de mortalidade está relacionada com a alta neurotoxicidade causada pela 6-OHDA (SIMOLA; MORELLI; CARTA, 2007). Dois dias após a indução do modelo, os animais apresentavam-se arqueados, pelos eriçados e tinham dificuldade de se erguer para pegar alimento e água. Contudo, a lesão destes neurônios leva a alterações motoras, rigidez muscular, bradicinesia, acinesia, comprometimento sensorial e neurológico (MORENO CATALÁ; WOITALLA; ARAMPATZIS, 2016; SCHWARTING; HUSTON, 1996), alterações bem comuns vistas clinicamente. Além destes sintomas, clinicamente pacientes com a DP

podem desenvolver anormalidades respiratórias (REYES; ZIMAN; NOSAKA, 2013), as quais são responsáveis por grande parte da morbidade e mortalidade dos pacientes (MEHANNA; JANKOVIC, 2010). Conforme a doença progride, encontramos comprometimento motor e fraqueza dos músculos que auxiliam a ventilação (HAMMER; BARLOW, 2010; TROCHE et al., 2010), mas somente esses dois comprometimentos não são capazes de justificar as alterações nos padrões ventilatórios observados nos pacientes com DP. Assim, Seccombe e colaboradores, 2011 demonstraram em seu estudo que a fraqueza nos músculos é comum, mas isoladamente não é capaz de gerar restrição na ventilação, tendo em vista que não foi observada nenhuma disfunção nos músculos respiratórios. Com isso, foi sugerido pelos autores de que as alterações ventilatórias estavam relacionadas com a parte neural, principalmente na região da coluna respiratória ventral (SECCOMBE et al., 2011).

Estudos realizados em nosso grupo de pesquisa demonstraram, no modelo 6-OHDA em ratos, a perda de neurônios *phox2b* em regiões do RTN, NTSi, NTSc e em camundongos no mesmo modelo a perda de neurônios no RTN e em ambos os modelos a perda da densidade dos receptores de NK1 na região do rVRG e preBotC (OLIVEIRA et al., 2019; TUPPY et al., 2015). A perda destes neurônios reflete diretamente nos padrões ventilatórios, os quais analisamos por pletismografia de corpo inteiro. Em nossos dados, o grupo de camundongos que recebeu 6-OHDA e tiveram uma redução de 70% ou mais dos neurônios da SN, apresentaram uma redução de padrões como a redução da frequência respiratória (F_R) pelo aumento do tempo inspiratório (T_i) e expiratório (T_e) com consequente redução na ventilação minuto (V_e) sem que houvesse alterações no volume corrente (V_t), quando expostos a normóxia comparados ao grupo veículo. Já quando foram expostos a hipercapnia o grupo 6-OHDA apresentou redução da F_R e T_e juntamente com a redução na V_e e também sem alterações no V_t . Levando em consideração a redução do número de neurônios do RTN e a redução da densidade dos receptores NK1 na região do rVRG e preBotC, o comprometimento da ventilação fica evidenciado na normóxia onde temos o disparo dos neurônios glutamatérgicos das regiões do rVRG e preBotC, e na hipercapnia através da ativação do RTN, o qual envia suas projeções excitatórias para os outros núcleos respiratórios, fazendo com que ocorra um rápido aumento na atividade ventilatória. Nossos dados funcionais confirmam os déficits anatômico e funcional ventilatório no modelo de 6-OHDA em camundongos, os quais corroboram com estudos prévios (OLIVEIRA et al., 2019, 2021).

Atualmente não se sabe qual o mecanismo que leva a degeneração da SN na DP, muito menos destes neurônios da coluna respiratória ventral. Dentre as diversas hipóteses, as alterações epigenéticas são consideradas como possível mecanismo de perda da homeostase neural. Estudos sobre mecanismos epigenéticos emergiram como um importante fator relacionado ao desenvolvimento e progressão de doenças neurodegenerativas (COBOS; BENNETT; TORRENTE, 2019; PARK et al., 2022).

Nesta pesquisa, selecionamos 3 alterações epigenéticas que são encontradas na DP, então, iniciamos os experimentos de imunofluorescência para identificar se as alterações nessas três histonas (H3K4me3, H3K27me3 e H3K9ac) estariam presentes nos núcleos respiratórios após 10 dias da indução do modelo de PD. Na região do preBotC encontramos uma menor expressão da H3K27me3 no grupo 6-OHDA em relação ao veículo. Como já descrito na literatura por Falquetto e colaboradores, a injeção de 6-OHDA induz ao estresse oxidativo na região da coluna respiratória e contribui para os déficits respiratórios, e dessa forma, o estresse oxidativo está relacionado com as alterações da cromatina, as quais podem levar a alterações na expressão gênica e a morte celular (KREUZ; FISCHLE, 2016). Estudos realizados com Sequenciamento de Nova Geração (NGS) demonstraram que quando há uma diminuição da metilação da H3K27 no modelo da DP, a expressão gênica torna-se alterada (TOKER et al., 2021). Em mesencéfalos pós-mortem de pacientes com DP, Guhathakurta e seus colaboradores, 2021, viram um aumento da H3K27me3 em regiões regulatórias do gene *SNCA* (GUHATHAKURTA et al., 2021), porém no modelo 6-OHDA não há inclusões de aglomerados de alfa-sinucleína. No entanto, em células de neuroblastoma SH-SY5Y, a 6-OHDA também promoveu a redução na H3K27me3 e a inibição da demetilase foi capaz de resgatar essa alteração (MU et al., 2020). Deste modo, a desregulação da metilação das histonas desempenha um papel crítico na patologia da DP. Outras alterações na H3K27, como a acetilação, também está presente no desenvolvimento da DP como por exemplo, analisando o córtex de pacientes com DP, Toker e seus colaboradores, 2021 observaram que a hiperacetilação da H3K27 estava aumentada, o que gerou a hipótese de que genes nocivos estariam sendo ativados, como *PARK7*, *SNCA* e *PRKN*, todos envolvidos com diversas doenças neurodegenerativas (TOKER et al., 2021). Huang e seus colaboradores demonstraram um aumento do processo de acetilação da H3K27 em células dopaminérgicas tratadas com rotenona e na SN de pacientes com DP. Realizando o Chip-Seq foi observado que a disfunção mitocondrial gerada pelo modelo de DP induz a acetilação da histona aumentando genes de apoptose neural, ativação neural de ERK1/2, ativação de NFkB e alterações na via de sinalização

Wnt (HUANG et al., 2021). No entanto não avaliamos a acetilação da H3K27 nos neurônios respiratórios. Assim, com a redução da H3K27me3 na região do preBotC 10 dias após a indução do modelo, momento em que os neurônios desta região já estão degenerados, sugerimos a hipótese que provavelmente há uma tentativa de sobrevivência possivelmente através da redução da repressão gênica como Akt e *Bcl-2* e de fatores neurotróficos como o *BDNF* e neuroprotetores como o *GDNF* na tentativa de prevenção da morte dos neurônios do preBotC. Esta hipótese se baseia no trabalho anterior do grupo que mostrou que nos núcleos respiratórios, como o RTN e NTS em ratos, após a degeneração dos mesmos no modelo da DP, a sinalização intracelular apresenta-se como neuroprotetora, por meio da resposta de aumento da fosforilação da Akt juntamente a sinalização anti-apoptótica pelo aumento da expressão da proteína Bcl-2 e redução da Bax. Acreditamos que esta sinalização se dá como resposta do organismo às alterações nestes núcleos encontrada no modelo de DP já aos 30 dias como um sinal de tentativa de sobrevivência à injúria celular (FALQUETTO et al., 2020).

Em relação as demais alterações, como a H3K9ac e H3k4me3, não observamos diferenças nos núcleos respiratórios após 10 dias da indução do modelo de DP comparado ao veículo.

Para saber ao certo quais genes estão envolvidos, seria necessária a realização do ensaio de imunoprecipitação de cromatina (ChiP) seguido de um sequenciamento de DNA para saber quais os possíveis genes que estão envolvidos com a sobrevivência ou morte dos neurônios dos núcleos respiratórios. A técnica de imunofluorescência apesar de sensível, apresenta limitações como marcações inespecíficas, presença de “*background*”, as fotos das regiões precisam ser tiradas no mesmo local, com a mesma iluminação e de preferência no mesmo microscópio. A contagem das histonas foi realizada por densidade através do *software ImageJ*, onde cada neurônio remanescente da região do preBotC foi marcado com DAPI. As células que apresentavam dupla marcação eram circuladas e mensuradas através do programa, porém, esse método por não ser automatizado pode induzir ao erro da contagem. Além disso, a marcação com DAPI não é específica para o grupamento preBotC, sendo assim, sobreposto nas mesmas regiões existem neurônios cardiovasculares, como o CVLM, os quais não se sabe como se comportam no modelo de DP em camundongos.

Após a análise por imunofluorescência, realizamos a quantificação das histonas através da técnica de *Western Blot*. De início, realizamos a indução do modelo 6-OHDA em camundongos como descrito (OLIVEIRA et al., 2019) e separamos os animais em grupos

de 4 dias, 6 dias após indução e veículo. Para realizar a técnica, o tecido coletado dos animais foi colocado em “pools” de 4 camundongos, para que assim gerasse o n=1. Isto se dá pelo fato de que os núcleos respiratórios são extremamente pequenos e a quantidade de proteínas não seriam o suficiente para análise. Realizamos diversos testes para a padronização do protocolo, mas a proteína beta-actina (controle endógeno) não expressou como esperado, logo, não pudemos utilizar os resultados obtidos no modelo de camundongo. Para melhor obtenção dos resultados, um *pool* de em média 6 a 8 camundongos seria necessário para análise (KREBS et al., 2006).

Como a padronização do *Western Blot* nos camundongos não funcionou, foi realizada a indução do modelo de 6-OHDA da DP em ratos Wistar para avaliar a expressão das alterações nas histonas estudadas. Após 30 dias da indução (antes da morte dos neurônios dos núcleos rVRG e preBotC), os tecidos foram coletados e congelados e o modelo confirmado por imuno-histoquímica (TH+) (TUPPY et al., 2015). Após a confirmação, um pool de 3 ratos foi feito para gerar n=1 e a padronização do protocolo foi realizada com a beta-actina (FALQUETTO et al., 2020) e a H3 total.

A H3K9ac foi expressa nos núcleos respiratórios e foi observada redução nesta alteração da histona nos núcleos NTSi e rVRG/preBotC no grupo 6-OHDA. Sabemos que a acetilação está diretamente relacionada com a ativação gênica, logo, sua diminuição no rVRG/preBotC implica na hipótese da redução da expressão de proteínas pró-sobrevivência nestes neurônios, como as proteínas Akt e Bcl-2, visto que vias pró-apoptóticas estão ativadas no rVRG/preBotC aos 30 dias após a indução do modelo de DP (FALQUETTO et al., 2020; PEMBERTON; POGMORE; ANDREWS, 2021). Porém, dados da literatura mostram que a H3K9ac está aumentada na SN em cérebros pós-morte de pacientes com DP (Harrison et al., 2018), e no modelo de rotenona o aumento da H3K9ac em células SH-SY5Y promoveu a transcrição da p53 e consequente apoptose (FENG; JANKOVIC; WU, 2015b). Já em relação ao NTS, este núcleo é dividido em rostral, intermediário e caudal, onde contêm neurônios cardiovasculares, de estiramento pulmonar, além de receber outras diversas aferências da periferia, como de quimiorreceptores periféricos sensíveis a alterações dos gases e pH e de respostas gastrointestinais (CUTSFORTH-GREGORY; BENARROCH, 2017). Todas essas aferências tornam o NTS um *hub* de informações de todas as áreas citadas, e dessa forma a redução da H3K9ac neste núcleo implica em diversas hipóteses relacionadas a funções não respiratórias, visto que este núcleo não apresenta degeneração no modelo de DP em camundongos.

Vale ressaltar que as alterações nas histonas H3K4me3 e H3K27me3 não foram expressas nos núcleos respiratórios em ambos os grupos em ratos. Porém, dados da literatura mostram que a H3K4me3 foi encontrada aumentada na região promotora do gene *SNCA* na SN de cérebros de pacientes com DP promovendo a uma maior expressão proteica de alfa-sinucleína (GUHATHAKURTA et al., 2021; LANORE et al., 2022). Entretanto, Mu e seus colaboradores observaram que o inibidor da demetilase, GSK-J4, promoveu aumento dos níveis de H3K4me3 e H3K27me3 em células SH-SY5Y tratadas com 6-OHDA e no modelo de 6-OHDA em ratos, em que também observaram o resgate da morte neuronal na SN e déficit motor por meio da eliminação do ferro (o acúmulo de ferro promove o estresse oxidativo e é um marcador na DP) promovendo a neuroproteção (MU et al., 2020). Ademais, na região do estriado de camundongos e primatas induzidos com MPTP, Nicholas e seus colaboradores observaram uma redução de H3K4me3 e fosforilação de ERK, relacionada com transdução de sinais como proliferação e resposta ao estresse (NICHOLAS et al., 2008).

Mesmo sem os resultados do *Western Blot* em camundongos, realizamos a análise da HDAC SIRT2, a qual tem sua expressão alterada na DP e é considerada alvo para o tratamento da DP (LIU et al., 2020). Na regulação epigenética, a HDAC SIRT2 tem por objetivo catalisar a desacetilação das caudas N-terminais das histonas, as quais levam a condensação da cromatina e a repressão gênica (HARRISON; DEXTER, 2013). Estudos sugerem que a inibição desta enzima é capaz de reverter os danos causados nas células pelo acúmulo de alfa sinucleína no modelo da DP (OUTEIRO; KONTOPOULOS; ALTMANN; KAZANTSEV, 2008). A SIRT2 é expressa em quase todas as células cerebrais e seus níveis aumentam de acordo com o envelhecimento, tornando-se um possível alvo terapêutico, tendo em vista que o desenvolvimento da DP está relacionado com o envelhecimento (LIU et al., 2020). Além dos efeitos diretos nas histonas, a SIRT2 regula estabilidade de microtúbulos, neuroinflamação, estresse oxidativo e autofagia (DE OLIVEIRA et al., 2012; KIDA; GOLIGORSKY, 2016; LIU et al., 2014; MAXWELL et al., 2011; ZHAO et al., 2010), processos que estão relacionados com a DP e as alterações respiratórias observadas no modelo. Foi demonstrado em modelo de DP por rotenona que os sintomas motores foram exacerbados pela atividade da SIRT2 e sua inibição diminuiu a depleção de dopamina no estriado e melhorou os déficits motores (WANG et al., 2015). Resultados similares foram obtidos no modelo de MPTP no contexto do agravamento do dano pelo estresse oxidativo pela ação da SIRT2 (GUAN et al., 2016). Além disso, o estresse oxidativo está intimamente relacionado com a apoptose, outro processo fisiológico

em que a SIRT2 está implicada. Como por exemplo, a SIRT2 desacetila a FOXO3a, ativando proteína pró-apoptótica-Bim, inibindo a atividade anti-apoptótica de Bcl-2, ativando a caspase-3 e iniciando a morte neuronal apoptótica. Isso eventualmente resulta em menos células produtoras de dopamina na SN em células tratadas com MPTP ou injeção de MPTP em camundongos; e a exclusão ou silenciamento de SIRT2 previne morte de células neuronais neste modelo (LIU et al., 2014; 2016).

Após a indução do modelo 6-OHDA da DP, os camundongos foram divididos em grupos de 4 e 6 dias, para a análise da atividade da SIRT2, períodos pressupostos anteriores a degeneração do núcleo RTN e do rVRG/preBotC, respectivamente (CABRAL et al., 2022 em preparação). Na região do RTN, o grupo 6-OHDA 4 dias apresentou uma redução dos níveis de SIRT2 em relação ao grupo controle. Acreditamos que o tempo de análise deste núcleo não foi ideal, pois 4 dias é muito próximo ao quinto dia, no qual ocorre a morte desses neurônios no modelo de DP. Com isso, temos a hipótese de que a redução da atividade da SIRT2, neste período em que os neurônios do RTN estão praticamente já degenerados e não em um período anterior a degeneração, promoveria aumento da acetilação de outra histona que não avaliamos e assim promoveria ativação de genes pró-sobrevivência, como por exemplo que culminaria no aumento das proteínas Akt e Bcl-2. Além disso, outra alteração epigenética poderia promover a repressão gênica que culminaria na redução de proteína pró-apoptóticas, como a p-p38 e Bax (Falquetto et al., 2020). Por fim, esses núcleos apresentam uma sinalização anti-apoptótica na tentativa de sobrevivência e resgate da neurodegeneração e déficit funcional respiratório observado mais tardiamente no modelo de DP. Esta hipótese, além de corroborar com os dados anteriores do grupo (FALQUETTO et al., 2020), vai ao encontro da literatura que mostra que a inibição da atividade da SIRT é alvo terapêutico contra a neurodegeneração da DP (HARRISON; SMITH; DEXTER, 2018; LIU et al., 2012; MAXWELL et al., 2011; OUTEIRO et al., 2007).

Nos núcleos rVRG/preBotC observamos o aumento da atividade da SIRT2 4 dias após indução do modelo de DP, período anterior a sua degeneração e déficit respiratório funcional. Os dados de redução da atividade da SIRT2 no rVRG/preBotC corroboram com a diminuição da H3K9ac observada em ratos no período de 30 dias após indução do modelo de DP, período em que estes núcleos não sofreram degeneração e apresentam perfil de sinalização intracelular de pró-apoptose e redução de proteínas neuroprotetoras. Assim, nossa hipótese é que no período prévio a degeneração dos núcleos rVRG/preBotC, o modelo de DP apresenta aumento da atividade da SIRT2, a qual aumenta a desacetilação

da H3K9, ou seja, reduzindo a acetilação da mesma, e dessa forma, promove a redução da transcrição de genes pró-sobrevivência, como por exemplo, que culminaria na redução das proteínas Akt e Bcl-2. Por fim, esses núcleos apresentam uma sinalização pró-apoptótica com a consequente neurodegeneração e déficit funcional respiratório (FALQUETTO et al., 2020).

7 CONCLUSÃO

Com os dados apresentados neste estudo, podemos concluir que o modelo 6-OHDA da DP em camundongos e ratos de fato é bem estabelecido para a análise de déficits respiratórios.

O aumento da SIRT2 e consequente redução da histona H3K9ac nos núcleos rVRG/preBotC demonstra um possível mecanismo epigenético que justifica a redução de proteínas de sobrevivência, o que leva a neurodegeneração destes núcleos e déficit funcional respiratório observado mais tardiamente no modelo 6-OHDA de DP. Bem como a redução da SIRT2 no núcleo RTN e redução da H3k27me3 nos núcleos rVRG/preBotC após a degeneração dos mesmos demonstra o possível mecanismo epigenético na promoção do aumento de proteínas de sobrevivência e redução de pró-apoptóticas, na tentativa de resgatar da neurodegeneração e déficit funcional respiratório observado no modelo 6-OHDA de DP.

Estes resultados abrem um leque de oportunidades para novos estudos, tendo em vista que nossos dados corroboraram com a literatura da DP e sugere a inibição da HDAC SIRT2 como alvo na neuroproteção também dos núcleos respiratórios no modelo 6-OHDA de DP. Dessa forma, esta pesquisa é pioneira na caracterização das alterações epigenéticas encontradas nos núcleos respiratórios no modelo de DP, e a determinação dos genes que estão sendo regulados por tais alterações epigenéticas necessitam estudos posteriores para que assim novas hipóteses possam ser estabelecidas a respeito do controle neural da respiração na doença de Parkinson.

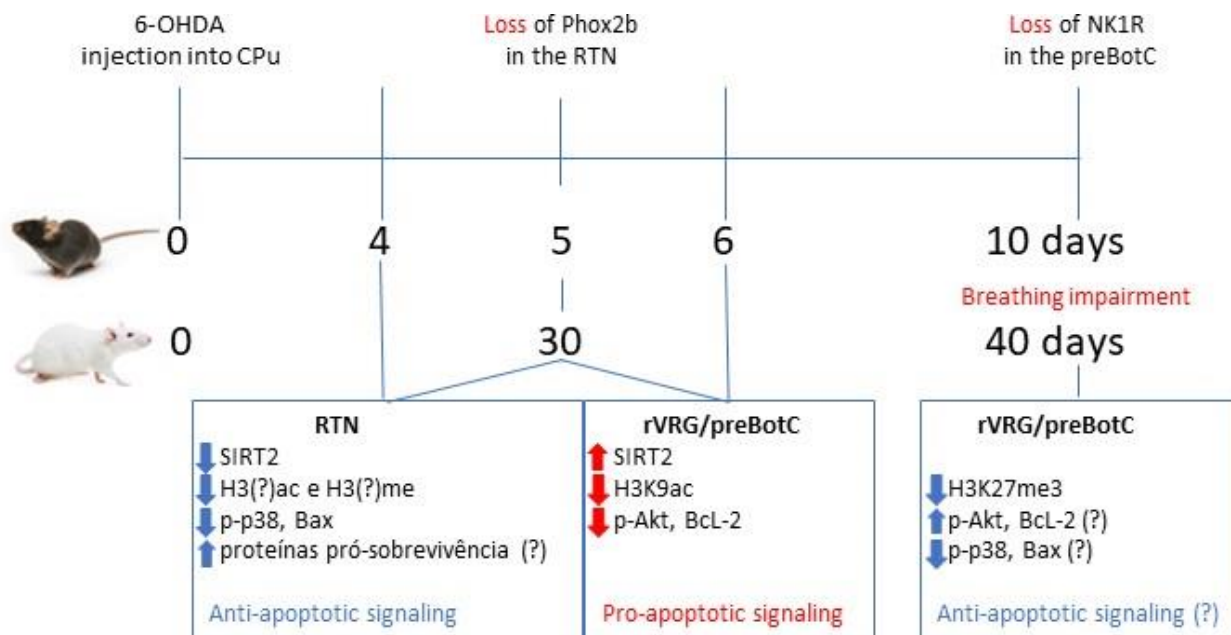


Figura 16: Regulação epigenética e sinalização intracelular nos núcleos respiratórios no modelo de DP.

O aumento da SIRT2 e consequente redução da histona H3K9ac nos núcleos rVRG/preBotC demonstra um possível mecanismo epigenético que justifica a redução de proteínas de sobrevivência como Akt e Bcl2, o que leva a neurodegeneração destes núcleos (redução de NK1R) e déficit funcional respiratório observado mais tardiamente no modelo 6-OHDA de DP. Bem como a redução da SIRT2 no núcleo RTN e redução da H3K27me3 nos núcleos rVRG/preBotC após a degeneração dos mesmos (redução de Phox2b e redução de NK1R) demonstra o possível mecanismo epigenético na promoção do aumento de proteínas de sobrevivência (Akt e Bcl2) e redução de proteínas pró-apoptóticas (p-p38 e Bax), na tentativa de resgatar da neurodegeneração e déficit funcional respiratório observado no modelo 6-OHDA de DP.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, S. B. G. et al. Phox2b-expressing neurons of the parafacial region regulate breathing rate, inspiration, and expiration in conscious rats. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 45, p. 16410–16422, 9 nov. 2011.

AIRES, M. DE M. **Fisiologia**. 4ª edição ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

ANGELOVA, P. R. et al. Functional oxygen sensitivity of astrocytes. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 29, p. 10460–10473, 22 jul. 2015.

ARISTIZABAL, M. J. et al. **Biological embedding of experience: A primer on epigenetics**. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** National Academy of Sciences, , 22 set. 2020.

BALESTRINO, R.; SCHAPIRA, A. H. V. **Parkinson disease**. **European Journal of Neurology** Blackwell Publishing Ltd, , 1 jan. 2020.

BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. **Regulation of chromatin by histone modifications**. **Cell Research**, mar. 2011.

BENNETT, D. **Roadmap Epigenomics Project**.

BIANCHI, A. L.; DENAVIT-SAUBIFI, M.; CHAMPAGNAT, J. **Physiological Reviews Central Control of Breathing in Mammals: Neuronal Circuitry, Membrane Properties, and Neurotransmitters**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.physiology.org/journal/physrev>.

BOHUSH, A.; NIEWIADOMSKA, G.; FILIPEK, A. **Role of mitogen activated protein kinase signaling in parkinson's disease**. **International Journal of Molecular Sciences** MDPI AG, , 1 out. 2018.

BRACCIALLI, A. L.; BONAGAMBA, L. G. H.; MACHADO, B. H. Glutamatergic and purinergic mechanisms on respiratory modulation in the caudal NTS of awake rats. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 161, n. 3, p. 246–252, 31 maio 2008.

CAPRIOTTI, T.; TERZAKIS, K. Parkinson Disease. **Wolters Kluwer Health**, v. 34, 2016.

CAROLINE ROUAUX, N. J. M. S. B.-P. L. ANDANNE-L. B. Critical loss of CBP/p300 histone acetylase activity by caspase-6 during neurodegeneration. **The EMBO Journal**, v. 22, p. 6537–6549, 2003.

CHEN, H. et al. SIRT2 is required for lipopolysaccharide-induced activation of BV2 microglia. **NeuroReport**, v. 26, n. 2, p. 88–93, 21 jan. 2015.

COBOS, S. N.; BENNETT, S. A.; TORRENTE, M. P. **The impact of histone post-translational modifications in neurodegenerative diseases. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease** Elsevier B.V., , 1 ago. 2019.

COPPEDÈ, F. The potential of epigenetic therapies in neurodegenerative diseases. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. JUL, 2014.

CUTSFORTH-GREGORY, J. K.; BENARROCH, E. E. Nucleus of the solitary tract, medullary reflexes, and clinical implications. **Neurology**, v. 88, n. 12, p. 1187–1196, 21 mar. 2017.

DART, A. **Epigenetics: Addicted to reading. Nature Reviews Cancer** Nature Publishing Group, , 1 abr. 2017.

DE LAU, L.; BRETELER, M. Epidemiology of Parkinson's disease. 2006.

DE OLIVEIRA, R. M. et al. SIRT2 as a therapeutic target for age-related disorders. **Frontiers in Pharmacology**, v. 3 MAY, 2012.

DEL POZO, C. H. et al. Modeling epigenetic modifications in renal development and disease with organoids and genome editing. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 11, n. 11, 1 nov. 2018.

DI FRUSCIA, P. et al. The discovery of a highly selective 5,6,7,8-Tetrahydrobenzo[4,5]thieno[2,3-d]pyrimidin-4(3H)-one SIRT2 Inhibitor that is Neuroprotective in an in vitro Parkinson's Disease Model. **ChemMedChem**, v. 10, n. 1, p. 69–82, 2015.

DIETZ, K. C.; CASACCIA, P. **HDAC inhibitors and neurodegeneration: At the edge between protection and damage. Pharmacological Research**, jul. 2010.

DONMEZ, G.; OUTEIRO, T. F. SIRT1 and SIRT2: Emerging targets in neurodegeneration. **EMBO Molecular Medicine**, v. 5, n. 3, p. 344–352, mar. 2013.

DUTSCHMANN, M. et al. Development of adaptive behaviour of the respiratory network: Implications for the pontine Kölliker-Fuse nucleus. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 143, n. 2–3, p. 155–165, 15 nov. 2004.

EZURE, K.; TANAKA, I.; SAITO, Y. **Brainstem and spinal projections of augmenting expiratory neurons in the rat.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/neures>.

FALQUETTO, B. et al. Oxidative stress in the medullary respiratory neurons contributes to respiratory dysfunction in the 6-OHDA model of Parkinson's disease. **Journal of Physiology**, v. 598, n. 22, p. 5271–5293, 1 nov. 2020.

FAMILY, A.; GAZEWOOD, J. D.; RICHARDS, D. R. **Parkinson Disease: An Update.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.aafp.org/afp>.

FELDMAN, J. L.; DEL NEGRO, C. A.; GRAY, P. A. **Understanding the rhythm of breathing: So near, yet so far.** **Annual Review of Physiology**, 10 fev. 2013.

FELDMAN, J. L.; MITCHELL, G. S.; NATTIE, E. E. **Breathing: Rhythmicity, plasticity, chemosensitivity.** **Annual Review of Neuroscience** Annual Reviews Inc., , 2003.

FENG, Y.; JANKOVIC, J.; WU, Y. C. **Epigenetic mechanisms in Parkinson's disease.** **Journal of the Neurological Sciences** Elsevier, , 15 fev. 2015a.

FENG, Y.; JANKOVIC, J.; WU, Y. C. **Epigenetic mechanisms in Parkinson's disease.** **Journal of the Neurological Sciences** Elsevier, , 15 fev. 2015b.

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.

FISCHLE, W.; WANG, Y.; ALLIS, C. D. Histone and chromatin cross-talk. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, n. 2, p. 172–183, 2003.

GARSKE, A. L.; SMITH, B. C.; DENU, J. M. Linking SIRT2 to Parkinson's disease. **ACS Chemical Biology**, v. 2, n. 8, p. 529–532, ago. 2007.

GEBREMEDHIN, K. G.; RADEMACHER, D. J. Histone H3 acetylation in the postmortem Parkinson's disease primary motor cortex. **Neuroscience Letters**, v. 627, p. 121–125, 3 ago. 2016.

GIBNEY, E. R.; NOLAN, C. M. **Epigenetics and gene expression.** **Heredity**, jul. 2010.

GILMAN, S. et al. **Obstructive sleep apnea is related to a thalamic cholinergic deficit in MSA.** [s.l: s.n.].

GLINKA, Y.; GASSEN, M.; OUDIM, M. B. H. Y. **Mechanism of 6~hydroxydopamine neurotoxicity.** [s.l: s.n.].

GOERS, J. et al. Nuclear localization of α -synuclein and its interaction with histones. **Biochemistry**, v. 42, n. 28, p. 8465–8471, 22 jul. 2003.

GUAN, Q. et al. Aging-related 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurochemical and behavioral deficits and redox dysfunction: Improvement by AK-7. **Experimental Gerontology**, v. 82, p. 19–29, 1 set. 2016.

GUHATHAKURTA, S. et al. Targeted attenuation of elevated histone marks at SNCA alleviates α -synuclein in Parkinson's disease. 2020.

GUHATHAKURTA, S. et al. Targeted attenuation of elevated histone marks at SNCA alleviates α -synuclein in Parkinson's disease. **EMBO Molecular Medicine**, v. 13, n. 2, 5 fev. 2021.

GUYENET, P. G. Regulation of breathing and autonomic outflows by chemoreceptors. **Comprehensive Physiology**, v. 4, n. 4, p. 1511–1562, 1 out. 2014.

GUYENET, P. G.; BAYLISS, D. A. **Neural Control of Breathing and CO₂ Homeostasis.** **Neuron** Cell Press, 2 set. 2015.

GUYENET, P. G.; STORNETTA, R. L.; BAYLISS, D. A. **Central respiratory chemoreception.** **Journal of Comparative Neurology**, 1 out. 2010.

GUYENET, P. G.; WANG, H. **Pre-Bötzingen Neurons With Preinspiratory Discharges "In Vivo" Express NK1 Receptors in the Rat.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.jn.org>.

H. H. LOESCHCKE. CENTRAL CHEMOSENSITIVITY AND THE REACTION THEORY. p. 1–24, 1982.

HAMMER, M. J.; BARLOW, S. M. Laryngeal somatosensory deficits in Parkinson's disease: Implications for speech respiratory and phonatory control. **Experimental Brain Research**, v. 201, n. 3, p. 401–409, mar. 2010.

HARRISON, I. F. et al. Neurorestoration induced by the HDAC inhibitor sodium valproate in the lactacystin model of Parkinson's is associated with histone acetylation and up-regulation of neurotrophic factors. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 16, p. 4200–4215, 1 ago. 2015.

HARRISON, I. F.; DEXTER, D. T. **Epigenetic targeting of histone deacetylase: Therapeutic potential in Parkinson's disease? Pharmacology and Therapeutics** Elsevier Inc., , 2013a.

HARRISON, I. F.; DEXTER, D. T. **Epigenetic targeting of histone deacetylase: Therapeutic potential in Parkinson's disease? Pharmacology and Therapeutics** Elsevier Inc., , 2013b.

HARRISON, I. F.; SMITH, A. D.; DEXTER, D. T. Pathological histone acetylation in Parkinson's disease: Neuroprotection and inhibition of microglial activation through SIRT 2 inhibition. **Neuroscience Letters**, v. 666, p. 48–57, 14 fev. 2018.

HOLLOWAY, G. J. Phenotypic Plasticity: Beyond Nature and Nurture. **Heredity**, v. 89, n. 6, p. 410–410, dez. 2002.

HUANG, M. et al. Mitochondrial dysfunction-induced H3K27 hyperacetylation perturbs enhancers in Parkinson's disease. 2021.

HYUN, K. et al. **Writing, erasing and reading histone lysine methylations. Experimental and Molecular Medicine** Nature Publishing Group, , 7 abr. 2017.

KAUT, O.; SCHMITT, I.; WÜLLNER, U. Genome-scale methylation analysis of Parkinson's disease patients' brains reveals DNA hypomethylation and increased mRNA expression of cytochrome P450 2E1. **Neurogenetics**, v. 13, n. 1, p. 87–91, fev. 2012.

KIA, D. A. et al. Identification of Candidate Parkinson Disease Genes by Integrating Genome-Wide Association Study, Expression, and Epigenetic Data Sets. **JAMA Neurology**, v. 78, n. 4, p. 464–472, 1 abr. 2021.

KIDA, Y.; GOLIGORSKY, M. S. **Sirtuins, Cell Senescence, and Vascular Aging. Canadian Journal of Cardiology** Pulsus Group Inc., , 1 maio 2016.

KIERNAN, R. et al. Post-activation turn-off of NF- κ B-dependent transcription is regulated by acetylation of p65. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 4, p. 2758–2766, 24 jan. 2003.

KONTOPOULOS, E.; PARVIN, J. D.; FEANY, M. B. α -synuclein acts in the nucleus to inhibit histone acetylation and promote neurotoxicity. **Human Molecular Genetics**, v. 15, n. 20, p. 3012–3023, 15 out. 2006.

KORTEKAAS, R. et al. Blood-brain barrier dysfunction in Parkinsonian midbrain in vivo. **Annals of Neurology**, v. 57, n. 2, p. 176–179, fev. 2005.

KREBS, B. et al. A method to perform Western blots of microscopic areas of histological sections. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 54, n. 5, p. 559–565, maio 2006.

KREUZ, S.; FISCHLE, W. **Oxidative stress signaling to chromatin in health and disease. Epigenomics** Future Medicine Ltd., , 1 jun. 2016.

KUMAR, P.; PRABHAKAR, N. R. Peripheral chemoreceptors: Function and plasticity of the carotid body. **Comprehensive Physiology**, v. 2, n. 1, p. 141–219, jan. 2012.

KWOK, J. B. **Role of epigenetics in Alzheimers and Parkinsons disease. Epigenomics**, out. 2010.

LANORE, A. et al. **Does the Expression and Epigenetics of Genes Involved in Monogenic Forms of Parkinson's Disease Influence Sporadic Forms? Genes** MDPI, , 1 mar. 2022.

LARA SANTOS, V.; SILVA MILAGRES, B. **Perfil Epidemiológico da Doença de Parkinson no Brasil.** [s.l: s.n.].

LIU, L. et al. Sirtuin 2 (SIRT2) enhances 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced nigrostriatal damage via deacetylating forkhead box O3a (Foxo3a) and activating bim protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 39, p. 32307–32311, 21 set. 2012.

LIU, L. et al. SIRT2 enhances 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced nigrostriatal damage via apoptotic pathway. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 6, n. JUL, 2014.

LIU, Y. et al. **Emerging Role of Sirtuin 2 in Parkinson's Disease. Frontiers in Aging Neuroscience** Frontiers Media S.A., , 10 jan. 2020.

LUGER, K. et al. **Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution** Nature © Macmillan Publishers Ltd. [s.l: s.n.].

MAXWELL, M. M. et al. The Sirtuin 2 microtubule deacetylase is an abundant neuronal protein that accumulates in the aging CNS. **Human Molecular Genetics**, v. 20, n. 20, p. 3986–3996, out. 2011.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doença de Parkinson**.

MORENO CATALÁ, M.; WOITALLA, D.; ARAMPATZIS, A. Reactive but not predictive locomotor adaptability is impaired in young Parkinson's disease patients. **Gait and Posture**, v. 48, p. 177–182, 1 jul. 2016.

MU, M. D. et al. Therapeutic effect of a histone demethylase inhibitor in Parkinson's disease. **Cell Death and Disease**, v. 11, n. 10, 1 out. 2020.

NAVARRO-SÁNCHEZ, L. et al. Epigenetic study in parkinson's disease: A pilot analysis of dna methylation in candidate genes in brain. **Cells**, v. 7, n. 10, p. 1. – 10 of 10, 1 out. 2018.

NICHOLAS, A. P. et al. Striatal histone modifications in models of levodopa-induced dyskinesia. **Journal of Neurochemistry**, v. 106, n. 1, p. 486–494, jul. 2008.

NURSE, C. A. Synaptic and paracrine mechanisms at carotid body arterial chemoreceptors. **Journal of Physiology**, v. 592, n. 16, p. 3419–3426, 15 ago. 2014.

OLIVEIRA DA PAIXÃO, A. et al. DOENÇA DE PARKINSON: UMA DESORDEM NEURODEGENERATIVA. 2013.

OLIVEIRA, L. M. et al. Respiratory disturbances in a mouse model of Parkinson's disease. **Experimental Physiology**, v. 104, n. 5, p. 729–739, 1 maio 2019.

OLIVEIRA, L. M. et al. Unraveling the mechanisms underlying irregularities in inspiratory rhythm generation in a mouse model of Parkinson's disease. **Journal of Neuroscience**, v. 41, n. 21, p. 4732–4747, 26 maio 2021.

OUTEIRO, T. F. et al. Sirtuin 2 Inhibitors Rescue alpha-Synuclein-Mediates Toxicity in Models of Parkinson's Disease. **Science**, 2007.

OUTEIRO, T. F.; MARQUES, O.; KAZANTSEV, A. **Therapeutic role of sirtuins in neurodegenerative disease. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, jun. 2008.

PARK, J. et al. **The role of histone modifications: from neurodevelopment to neurodiseases. Signal Transduction and Targeted Therapy** Springer Nature, , 1 dez. 2022.

PAVLOU, M. A. S.; OUTEIRO, T. F. Epigenetics in parkinson's disease. Em: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l.] Springer New York LLC, 2017. v. 978p. 363–390.

PEREIRA, B. M. V. et al. **Unraveling the epigenetic landscape of glomerular cells in kidney disease**. **Journal of Molecular Medicine** Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, , 1 jun. 2021.

PHILLIPSON, O. T. **Alpha-synuclein, epigenetics, mitochondria, metabolism, calcium traffic, & circadian dysfunction in Parkinson's disease. An integrated strategy for management**. **Ageing Research Reviews** Elsevier Ireland Ltd, , 1 nov. 2017.

PONZONI, S.; GARDIA-CAIRASCO, N. Neurobiologia do parkinsonismo. **Arquivo de neuropsiquiatria**, p. 711–717, 1995.

REKAIK, H. et al. Engrailed Homeoprotein Protects Mesencephalic Dopaminergic Neurons from Oxidative Stress. **Cell Reports**, v. 13, n. 2, p. 242–250, 13 out. 2015.

REYES, A.; ZIMAN, M.; NOSAKA, K. Respiratory muscle training for respiratory deficits in neurodegenerative disorders: A systematic review. **Chest**, v. 143, n. 5, p. 1386–1394, 2013.

RICHTER, D. W. **GENERATION AND MAINTENANCE OF THE RESPIRATORY RHYTHM**. **J. exp. Biol.** [s.l: s.n.].

RICHTER, D. W.; SPYER, K. M. **Studying rhythmogenesis of breathing: comparison of in vivo and in vitro models**. **TRENDS in Neurosciences**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://tins.trends.com/0166>>.

RICHTER, D. W.; SPYER, K. M. **Studying rhythmogenesis of breathing: comparison of in vivo and in vitro models**. **TRENDS in Neurosciences**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://tins.trends.com/0166>>.

ROSÉLIA DOS SANTOS DAMASCENO. **Envolvimento do núcleo Kölliker-Fuse e do núcleo parabraquial lateral no controle cardiorrespiratório promovido pela ativação dos quimiorreceptores centrais e periféricos**. São Paulo: [s.n.].

ROTHGIESSER, K. M. et al. SIRT2 regulates NF- κ B-dependent gene expression through deacetylation of p65 Lys310. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 24, p. 4251–4258, 15 dez. 2010.

SAHA, R. N.; PAHAN, K. **HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis.** [s.l: s.n.].

SCHREIHOFFER, A. M.; GUYENET, P. G. **Identification of C1 Presympathetic Neurons in Rat Rostral Ventrolateral Medulla by Juxtacellular Labeling In Vivo** Indexing terms: **adrenergic neurons; tyrosine hydroxylase; arterial pressure; sympathetic vasomotor tone; medulla oblongata** *J. Comp. Neurol.* [s.l.] Wiley-Liss, Inc, 1997.

SCHWARTING, R. K. W.; HUSTON, J. P. **THE UNILATERAL 6-HYDROXYDOPAMINE LESION MODEL IN BEHAVIORAL BRAIN RESEARCH. ANALYSIS OF FUNCTIONAL DEFICITS, RECOVERY AND TREATMENTS** *Progress in Neurobiology.* [s.l: s.n.].

SCUDERI, C. et al. Sirtuin modulators control reactive gliosis in an in vitro model of alzheimer's disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5 MAY, 2014.

SIMOLA, N.; MORELLI, M.; CARTA, R. A. **MECHANISMS OF NEUROTOXICITY OF 6-OHDA.** [s.l: s.n.].

SMITH, J. C. et al. Pre-Bötzinger Complex: A Brainstem Region That May Generate Respiratory Rhythm in Mammals. p. 726–729, 1991.

SMITH, J. C. et al. **Spatial and Functional Architecture of the Mammalian Brain Stem Respiratory Network: A Hierarchy of Three Oscillatory Mechanisms.** [s.l: s.n.].

SMITH, J. C. et al. **Brainstem respiratory networks: Building blocks and microcircuits.** *Trends in Neurosciences*, mar. 2013.

SÖDERSTEN, E. et al. Dopamine Signaling Leads to Loss of Polycomb Repression and Aberrant Gene Activation in Experimental Parkinsonism. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 9, 1 set. 2014.

SOUZA, G. M. P. R. et al. Breathing regulation and blood gas homeostasis after near complete lesions of the retrotrapezoid nucleus in adult rats. **Journal of Physiology**, v. 596, n. 13, p. 2521–2545, 1 jul. 2018.

STEIDL, E.; ZIEGLER, J.; VARGAS, F. Doença de Parkinson: Revisão bibliográfica. **Disc. Scientia**, v. 8, n. 1, p. 115–129, 2007.

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.

TAKAKURA, A. C. T. et al. Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats. **Journal of Physiology**, v. 572, n. 2, p. 503–523, 2006.

TANG, Y. et al. Jmjd3 is essential for the epigenetic modulation of microglia phenotypes in the immune pathogenesis of Parkinson's disease. **Cell Death and Differentiation**, v. 21, n. 3, p. 369–380, mar. 2014.

TOKER, L. et al. Genome-wide histone acetylation analysis reveals altered transcriptional regulation in the Parkinson's disease brain. **Molecular Neurodegeneration**, v. 16, n. 1, 1 dez. 2021.

TROCHE, M. S. et al. **Aspiration and swallowing in Parkinson disease and rehabilitation with EMST A randomized trial**. [s.l: s.n.].

TUPPY, M. et al. Respiratory deficits in a rat model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 297, p. 194–204, 5 jun. 2015.

VERVERIS, K.; KARAGIANNIS, T. C. Overview of the Classical Histone Deacetylase Enzymes and Histone Deacetylase Inhibitors. **ISRN Cell Biology**, v. 2012, p. 1–12, 30 jan. 2012.

WAKINO, S.; HASEGAWA, K.; ITOH, H. **Sirtuin and metabolic kidney disease**. **Kidney International** Nature Publishing Group, , 3 out. 2015.

WANG, F. et al. SIRT2 deacetylates FOXO3a in response to oxidative stress and caloric restriction. **Aging Cell**, v. 6, n. 4, p. 505–514, ago. 2007.

WANG, X. et al. Aging-related rotenone-induced neurochemical and behavioral deficits: Role of SIRT2 and redox imbalance, and neuroprotection by AK-7. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 9, p. 2553–2563, 7 abr. 2015.

WEI, J. W. et al. Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review). **Oncology Reports**, v. 37, n. 1, p. 3–9, 1 jan. 2017.

ZHAO, Y. et al. Cytosolic FoxO1 is essential for the induction of autophagy and tumour suppressor activity. **Nature Cell Biology**, v. 12, n. 7, p. 665–675, jul. 2010.

ZHU, H. et al. The QKI-PLP pathway controls SIRT2 abundance in CNS myelin. **GLIA**, v. 60, n. 1, p. 69–82, jan. 2012.