

SILVIO DE ARAÚJO FERNANDES JUNIOR

**Análise da ativação seletiva de neurônios bulbares
em modelo experimental de Doença de Parkinson:
um estudo temporal dos possíveis mecanismos para
restauração da função respiratória**

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Ana Carolina Takakura

Versão original

São Paulo

2019

RESUMO

Fernandes-Junior SA. **Análise da ativação seletiva de neurônios bulbares em modelo experimental de Doença de Parkinson: um estudo temporal dos possíveis mecanismos para restauração da função respiratória.** 2019. 123 f. Dissertação (Doutorado em Farmacologia). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2019.

A doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa associada à perda de neurônios dopaminérgicos (DA) na porção compacta da substância negra (SNc). No entanto, outros neurônios do tronco encefálico também podem estar degenerados. O objetivo do presente trabalho foi correlacionar as alterações neuroanatômicas e biomoleculares às alterações respiratórias observadas no modelo experimental para DP. Ainda, observar se a ativação farmacológica ou optogenética é capaz de restaurar a função respiratória destes animais. Foram utilizados ratos Wistar adultos e o modelo experimental foi de injeção bilateral da toxina 6-OHDA nas regiões dos núcleos Caudado e Putâmen (CPu). Os parâmetros respiratórios foram avaliados por pletismografia, além da análise eletrofisiológica dos músculos respiratórios. Foram realizadas injeções bilaterais de NMDA ou unilaterais do promotor viral PRSx8 no RTN a fim de verificar se a ativação destes neurônios poderia restaurar a função respiratória neste modelo. Os resultados mostraram que os animais que receberam 6-OHDA, apresentaram redução no número de neurônios em importantes regiões bulbares associados ao controle da respiração, como o núcleo retrotrapezóide (RTN). As análises biomoleculares demonstraram haver um remodelamento proteico na região do RTN após a indução do modelo. Foi possível observar redução na frequência respiratória (f_R) e ventilação (V_E) 40 e 60 dias após a lesão. A estimulação farmacológica no RTN em ratos não anestesiados, promoveu aumento na ventilação. A estimulação optogenética em animais anestesiados ou não, resultou em respostas maiores nos animais do grupo experimental. Concluímos que a injeção de 6-OHDA no CPu promove alterações neuroanatômicas e biomoleculares que precedem as funcionais e que a estimulação farmacológica e optogenética é capaz de aumentar a ventilação nos animais submetidos ao modelo experimental para DP. Os resultados obtidos com a combinação de técnicas de proteômica e optogenética, poderão abrir caminho para futuras linhas de pesquisa associadas às doenças neurodegenerativas.

Palavras-Chaves: Doença de Parkinson. Núcleo retrotrapezóide. Optogenética. Respiração.

ABSTRACT

Fernandes-Junior SA. **Analysis of selective activation of medulary neurons in an experimental model of Parkinson's disease: a temporal study of possible mechanisms for restoration of respiratory function.** 2019. 123 f. Dissertation (PhD in pharmacology). São Paulo: Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo; 2019.

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder associated with loss of dopaminergic neurons (DA) in the compact portion of the substantia nigra (SNc). However, other brainstem neurons may also be degenerate. The aim of the present study was to correlate the neuroanatomic and biomolecular changes to the respiratory changes observed in the experimental model for PD. Also, observe whether the pharmacological or optogenetic activation is able to restore the respiratory function of these animals. Adult Wistar rats were used and the experimental model was bilateral injection of the 6-OHDA toxin in the Caudado and Putâmen (CPu) regions. The respiratory parameters were evaluated by plethysmography, in addition to the electrophysiological analysis of the respiratory muscles. Bilateral NMDA or unilateral injections of the PRSx8 viral promoter into the RTN were performed to verify whether the activation of these neurons could restore respiratory function. The results showed that animals receiving 6-OHDA showed a reduction in the number of neurons in important regions associated with respiratory control, such as the retrotrapezoid nucleus (RTN). The biomolecular analyzes showed a protein remodeling in the region of the RTN after the induction of the model. Reduction in respiratory rate (f_R) and ventilation (V_E) 40 and 60 days after injury were observed. Pharmacological stimulation in the RTN in non-anesthetized rats promoted an increase in ventilation. Optogenetic stimulation in anesthetized or non-anesthetized animals resulted in larger responses in experimental group animals. We conclude that the 6-OHDA injection in CPu promotes neuroanatomical and biomolecular alterations that precede the functional alterations and that the pharmacological and optogenetic stimulation is able to increase the ventilation in the animals submitted to the experimental model for PD. The results obtained in this work with the combination of proteomics and optogenetic techniques, can open the way for future lines of research associated with neurodegenerative diseases.

Keywords: Parkinson's disease. Retrotrapezoid nucleus. Optogenetics. Respiration.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Doença de Parkinson

O fenômeno do envelhecimento populacional e o maior acesso aos serviços de saúde a partir do século XX evidenciaram condições patológicas associadas ao processo senil. Em especial nas últimas duas décadas, após o aperfeiçoamento de técnicas para diagnóstico, as doenças neurodegenerativas tornaram-se um desafio para a ciência, tanto pela preocupante incidência quanto pelo grau de morbidade que elas apresentam. Já no início do século XIX, o médico inglês James Parkinson descreveu em seu trabalho, intitulado “*An essay on the shaking palsy*”, os sintomas de uma alteração neurológica peculiar, caracterizada por tremor e rigidez dos movimentos (revisado por Blum et al., 2001; Parkinson, 1817). Posteriormente, em sua homenagem, o neurologista francês Jean-Martin Charcot nomearia este conjunto de sinais e sintomas como parkinsonismo (revisado por Blum et al., 2001). Nos dias atuais, a patologia que possui os sintomas primeiramente descritos por James Parkinson é conhecida como Doença de Parkinson (DP).

De distribuição universal, capaz de atingir pessoas de diferentes níveis socioeconômicos e de todos os grupos étnicos, a DP pode acarretar relevante impacto social, assim como graves e irreversíveis consequências para a saúde (Reeve et al; 2014). De acordo com os mais recentes estudos populacionais prospectivos, a DP é a mais prevalente desordem do movimento e sua incidência anual está entre 8 e 18 casos por 100 mil pessoas (de Lau e Breteler, 2006; Lee e Gilbert, 2016; Lill, 2016). Estima-se que nas 10 nações mais populosas do mundo o número de casos irá mais que dobrar, passando de 4 milhões de doentes diagnosticados em 2005 para aproximadamente 9 milhões de indivíduos em 2030 (Dorsey et al., 2007). Um fator que correlaciona a ocorrência da doença com a progressão de fatores senis é sua rara manifestação antes da quinta década de vida. Contudo, a DP pode ser observada em 1% da população com idade entre 50 e 55 anos, passando a aproximadamente 4% dos indivíduos com mais de 80 anos (Hughes et al., 1993; de Lau e Breteler, 2006).

Partindo do pressuposto que a DP é uma doença crônica e neurodegenerativa com sintomas que acompanham os pacientes no decurso de décadas, podemos imaginar que os custos nas esferas governamental, social e familiar aumentam proporcionalmente à medida que os casos se multiplicam. Por

essa razão, cresce o interesse de gestores em políticas públicas e da comunidade científica em reduzir os impactos negativos da DP, tanto por uma questão humanística, quanto econômica.

Estimativas do custo anual da DP demonstraram que em 2002, somente no continente Europeu, foi gasto o equivalente a 10.000 euros por paciente (Lindgren et al., 2005). No Brasil, ainda não existem dados oficiais sobre o impacto socioeconômico direto e indireto da DP, porém, o custo da doença em todos os países ocidentais já foi estimado em 25 bilhões de dólares por ano (Scheife et al., 2000). Enquanto os serviços públicos de saúde arcam com despesas relacionadas ao tratamento, internação, medicamentos e suporte aos pacientes, setores privados sofrem com o absenteísmo ao trabalho do paciente ou de seus familiares e cuidadores. Com o avançar dos sintomas, torna-se inevitável o abandono definitivo de suas ocupações laborais (Carod-Artal et al., 2007).

Cumprido salientar que a maior expectativa de vida não necessariamente deva ser acompanhada com o prolongar de sofrimento físico e mental com subsequente ônus para sociedade. Portanto, enquanto não existirem formas efetivas de cura, todos os esforços em direção a políticas públicas, sejam no que se refere ao diagnóstico correto e precoce, ou no investimento em pesquisas de ponta, serão fundamentais para diminuir os impactos da DP na sociedade como um todo.

1.2 Neuropatologia da Doença de Parkinson

No início da década de 1990, foi apresentado um modelo neuroanatômico para descrever o que poderia estar ocorrendo na circuitaria do sistema nervoso central (SNC) durante a evolução do processo neurodegenerativo relacionado à DP. Neste modelo, ocorreria uma alteração funcional na transmissão entre estruturas subcorticais e talâmicas que influenciam o controle dos movimentos (Alexander e Crutcher, 1990). Atualmente, sabe-se que estas estruturas são compostas por um conjunto de núcleos subcorticais denominados de *núcleos da base* (NB). Os sinais e sintomas motores da DP decorrem após uma disfunção em regiões específicas destes núcleos, com diminuição de neurônios dopaminérgicos ventrolaterais da parte compacta da substância negra (SNc) no mesencéfalo (Spillantini et al., 1998). O termo *substância negra* deriva da presença maciça do pigmento escuro neuromelanina nesta região. Partindo deste contexto, a dopamina (DA), pertencente à família das catecolaminas, representa o neurotransmissor chave nesse sistema.

A primeira etapa na síntese da DA consiste na conversão da tirosina em L-DOPA por oxidação. Essa reação é catalisada pela enzima *tirosina hidroxilase* (TH), constituindo a etapa que limita a velocidade de produção dopaminérgica. A próxima e última etapa consiste na conversão da L-DOPA em DA pela enzima *aminoácido aromático descarboxilase* (AACD) (Figura 1).

Após a liberação da DA na fenda sináptica, este neurotransmissor poderá se ligar em receptores específicos (*D1, D2, D3, D4, D5*) tanto em neurônios pré quanto pós-sinápticos. As subcategorias de receptores foram propostas levando em conta suas características funcionais. Todos os receptores dopaminérgicos são acoplados a proteína G e estão espalhados por uma vasta região cerebral. Os receptores dos tipos D1 e D5 são excitatórios, pois uma vez ativos, aumentam os níveis de AMPc e cálcio intracelular, ao passo que os inibitórios (D2, D3 e D4) reduzem esses níveis, além de hiperpolarizar a célula (Standaert e Galanter, 2012; Mann et al., 2018).

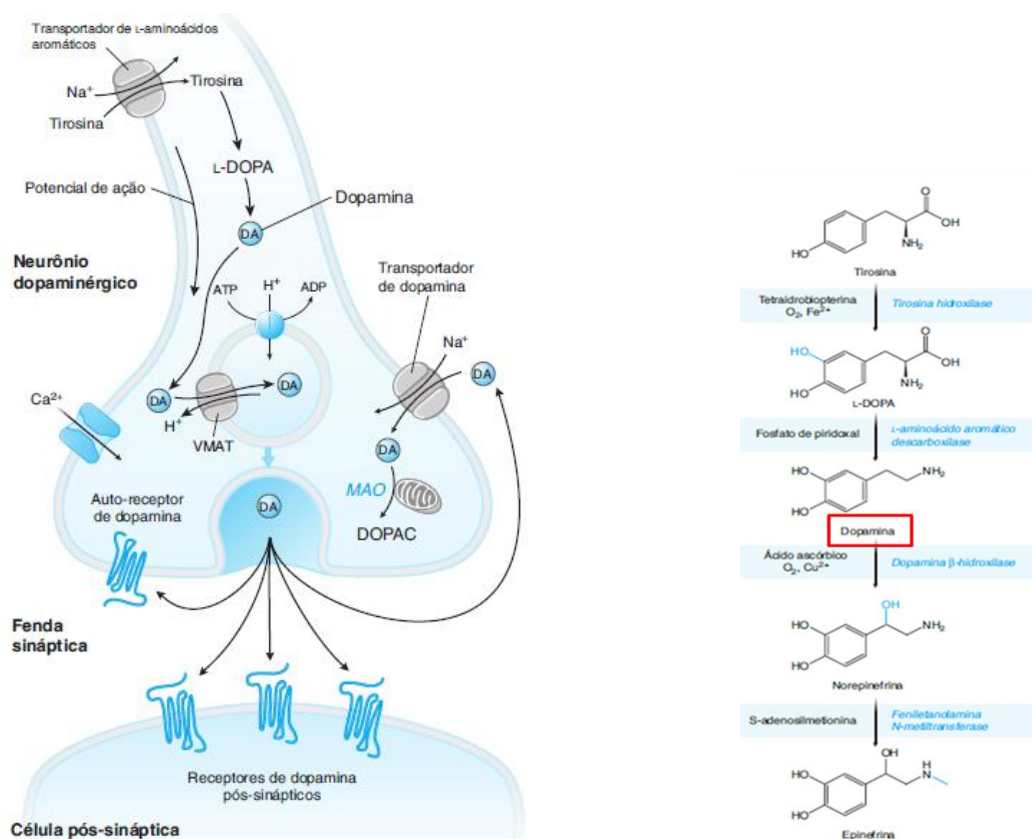


Figura 1: Síntese dos neurotransmissores catecolaminérgicos. A hidroxilase do aminoácido tirosina e a descarboxilase da L-DOPA são etapas precursoras do neurotransmissor dopamina em neurônios dopaminérgicos. Já nos demais neurônios catecolaminérgicos, a hidroxilase da dopamina sintetiza a norepinefrina e sua acetiltransferase possibilita a síntese de epinefrina. Adaptado de Standaert e Galanter, in: Golan D, Tashjian AH, Armstrong, EJ. Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacologia, 2012, p 165-185.

A morte neuronal de origem idiopática dos neurônios dopaminérgicos da SNc na DP pode chegar a 5% ao ano (Spillantini et al., 1998). Um dos fatores associados à causa desta redução e descrito como um marcador neuropatológico para a DP, se acumula ao longo do axônio e no citoplasma na forma de um agregado proteico (α -sinucleína) nos neurônios dos NB, mais especificamente os remanescentes da SNc, conhecido como *corpúsculo de Lewy* (Braak et al., 2003). Anatomicamente, os NB são descritos como três categorias estruturais distintas (Figura 2):

Núcleos de entrada (input), compostos pelos núcleos aferentes que incluem o caudado, putâmen e acumbens, que coletivamente são chamados de *estriado*; *Núcleos de saída (output)*, compostos pelo globo pálido interno (GPi), globo pálido em sua porção ventral (GPv) e a porção reticulada da substância negra (SNr); *Núcleos intrínsecos*, compostos pela porção compacta da substância negra (SNc), porção externa do globo pálido (GPe), pelos núcleos subtalâmicos (NST) e pela área tegmentar ventral (VTA) (Martin, 1998; Mann et al., 2018).

O estriado recebe projeções excitatórias oriundas de todo o córtex cerebral e então se projeta para os núcleos de saída (SNr, GPi e GPv) por uma via inibitória. Já os núcleos de saída se projetam também por uma via inibitória, para núcleos talâmicos específicos. A porção desta circuitaria que se comunica diretamente por meio de projeções entre o estriado e os núcleos de saída é conhecida como *projeção direta ou via direta* (Alexander et al., 1986). Para ativação desta via, observa-se que da SNc partem neurônios dopaminérgicos para o estriado. Esta *via direta* contém neurônios que expressam predominantemente receptores excitatórios do tipo D1 (Mann et al., 2018). A ligação da DA nestes receptores, ativa uma projeção inibitória (GABAérgica) do estriado para os núcleos de saída. Estes núcleos inibem tonicamente os núcleos talâmicos, portanto, o bloqueio inibitório destes núcleos irá “desinibir” o tálamo. Como consequência, uma projeção glutamatérgica partirá dos núcleos talâmicos para o córtex frontal, liberando os movimentos por meio dos motoneurônios periféricos. A *via direta*, portanto, estimula o movimento (Figura 2Aa).

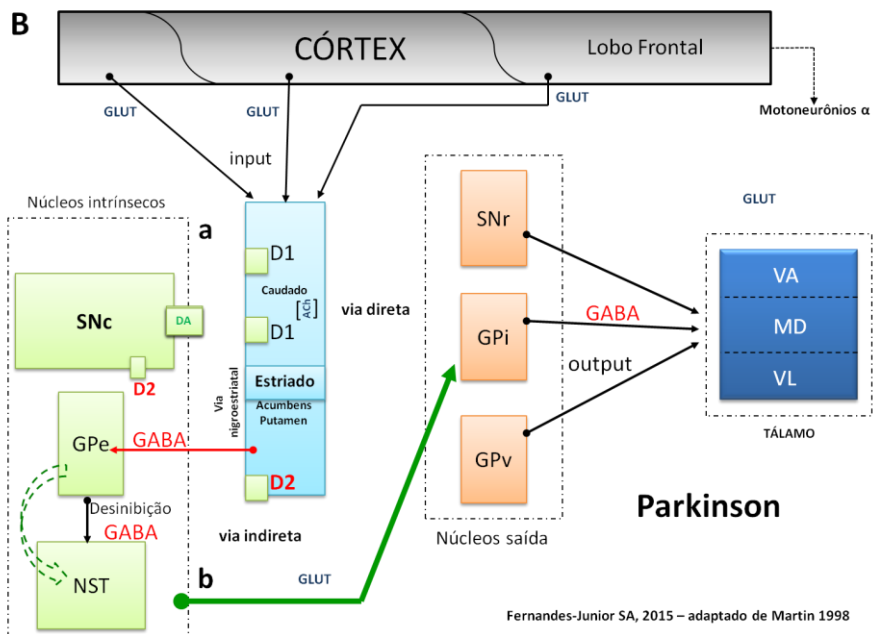
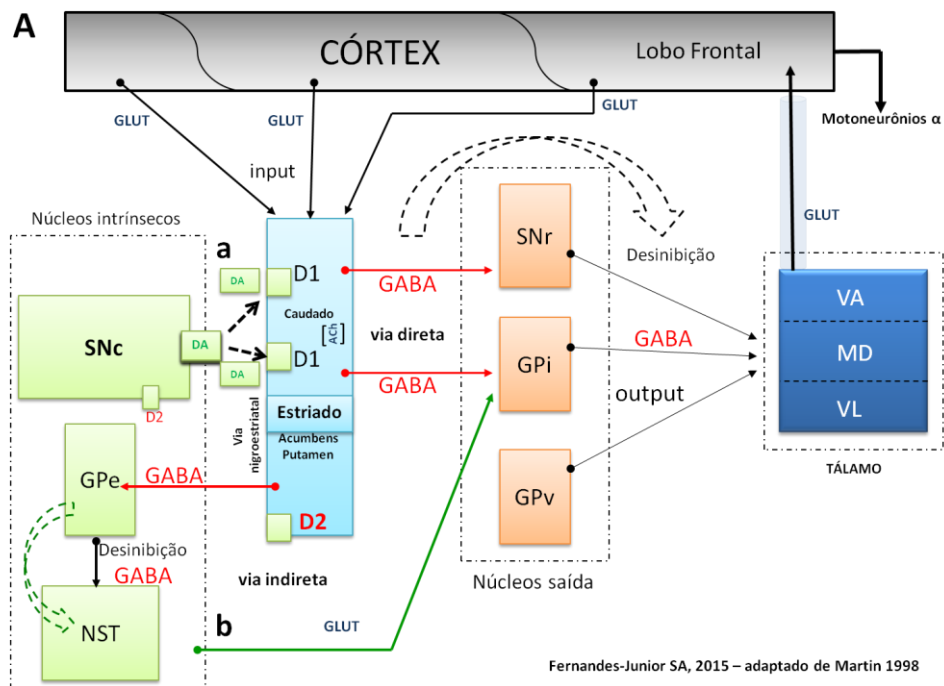


Figura 2: Modelos esquemáticos dos mecanismos fisiológicos e na DP entre os núcleos da base, tálamo e córtex cerebral para o controle motor.

Aa) Desinibição talâmica por meio da via direta (setas vermelhas contínuas e curva pontilhada preta) com liberação dos movimentos após a ativação das projeções nigroestriatais dopaminérgicas pelos receptores D1 (setas pretas tracejadas). **Ab)** Ativação dos núcleos inibitórios de saída, inibindo os movimentos (via indireta – setas verdes, curva pontilhada e contínua). **B)** Na DP ocorre redução progressiva de DA nesta via, aumentando a atividade das projeções inibitórias ao tálamo, com consequente déficit na função motora. **Abreviações:** D1= receptores dopaminérgicos do tipo 1; D2= receptores dopaminérgicos do tipo 2; GABA= neurotransmissor inibitório ácido gama-aminobutírico; GLUT= neurotransmissor excitatório glutamato; GPe= globo pálido externo; GPi= globo pálido interno; GPv= globo pálido ventral; MD= região médio-dorsal do tálamo; NST=núcleo subtalâmico; SNc= substância negra parte compacta; SNr= substância negra parte reticulada; VA= região ventro-anterior do tálamo; VL= região ventro-lateral do tálamo. Figura adaptada de Martin 1998.

Existe ainda outra porção desta circuitaria denominada de *via indireta*, também responsável pela comunicação entre o estriado e os núcleos de saída, porém, não diretamente, mas via núcleos intrínsecos. A ativação desta via promoverá uma desinibição dos núcleos subtalâmicos (NST). Assim, esse núcleo desinibido envia projeções glutamatérgicas para os núcleos de saída (Alexander et al., 1986) (Figura 2Ab). A ativação dos núcleos de saída pela *via indireta* irá inibir novamente os núcleos talâmicos, reduzindo as projeções glutamatérgicas ao córtex cerebral e conseqüentemente para os motoneurônios periféricos. Deste modo, a *via indireta* inibe o movimento (Alexander et al., 1986). A dopamina inibe a via indireta e estimula a via direta, resultando em uma tendenciosidade efetiva que permite o movimento voluntário. Esse complexo sistema mantém uma retroalimentação em equilíbrio neste circuito como um todo, entre as vias direta e indireta (Figura 2A, a e b).

Considerando a importância dos NB para a integração das atividades somatomotoras, diversas pesquisas demonstraram que qualquer alteração nestas estruturas poderá ocasionar distúrbios motores (Fearnley and Lees, 1991; Calne, 1994; Mink, 1999). Com a morte dos neurônios dopaminérgicos e conseqüente redução da oferta de DA neste circuito, haveria aumento na atividade de neurônios que expressam receptores dopaminérgicos do tipo D2 (inibitórios) no estriado, além de reforçar a ativação da *via indireta* com excessiva inibição dos sistemas motores (Figura 2B, a e b). Segundo Obeso e colaboradores, os sintomas da DP só aparecem após redução de 40-60% dos neurônios nigrais e de 80% de redução dos níveis dopaminérgicos no estriado (Obeso et al., 2000).

Nas últimas décadas começaram a ser explorados com mais destaque outros fatores, além do déficit motor, que impactam negativamente na qualidade de vida destes pacientes. Na DP também podem estar presentes sintomas não motores, como disautonomia, disfunção cognitiva, lentidão nos pensamentos, algum grau de demência e quadro depressivo em aproximadamente 40% dos pacientes (Cummings, 1992). Mais recentemente, um crescente número de pesquisas busca compreender as alterações respiratórias envolvidas na DP, porém, focam suas investigações nas alterações musculares (mecânica respiratória) e principalmente nos distúrbios respiratórios relacionados ao sono, como a apnéia obstrutiva do sono (AOS) (Tzelepis et al., 1988; Solomon e Hixon, 1993; Gilman et al; 2003; Bunton, 2005; Mehanna et al; 2010; Troche et al., 2010; Hammer e Barlow, 2010). No

entanto, ainda são escassos os dados relacionados às alterações respiratórias de origem central observadas na DP. Cumpre destacar que o decurso final das patologias degenerativas é acompanhado de deteriorização progressiva da capacidade funcional geral, agravada pelas complicações respiratórias.

1.3 Modelos experimentais

Com o intuito de compreender melhor as alterações neuroanatômicas e funcionais que estão associadas à DP, alguns modelos experimentais foram propostos. Atualmente, existem diversos métodos que promovem a degeneração dos neurônios dopaminérgicos da SNc. Os modelos mais frequentes são os que utilizam injeção periférica de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidrofiridina (MPTP), injeção central de lipopolissacarídeo (LPS), injeção central de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Hald e Lotharius, 2005; McDowell et al., 2012), ou mais recentemente, modelos utilizando organismos geneticamente modificados (OGM), especialmente em camundongos (Minakaki et al., 2018; Huang et al., 2018).

O MPTP é uma substância lipossolúvel, desta forma, tem a capacidade de cruzar a barreira hematoencefálica e penetrar nas células gliais e neurônios dopaminérgicos. Entretanto, por facilmente sofrer oxidação, o seu produto final produz degeneração de células por interferência no metabolismo oxidativo, dando origem a uma elevada toxicidade. E isto tem sido um dos agravantes para a escolha desse modelo, representando um risco para os próprios pesquisadores (Kumar et al., 2009; McDowell et al., 2012).

A administração de LPS nos encéfalos de roedores tem sido utilizada para o entendimento da participação das células gliais no processo neurodegenerativo da DP (Reale et al., 2009). Por ser uma endotoxina presente na parede celular de bactérias gram-negativas, é capaz de promover uma potente estimulação de células do sistema imunológico. Com isso, a infusão intra-nigral dessa toxina induz a degeneração dopaminérgica em ratos. As consequências relacionadas ao processo inflamatório poderiam influenciar nas respostas ventilatórias basais, o que dificultaria as interpretações de protocolos funcionais. Já os modelos geneticamente modificados possibilitam, por exemplo, avaliar animais *knockout* ou *knockin* para expressão de α - sinucleína. Colônias inteiras de animais são preparadas e suas respectivas linhagens são avaliadas com uma determinada condição patológica

desde o nascimento. A engenharia genética apesar de permitir avaliações diretas, ideais para objetivos mais específicos, não eliminam por completo o viés temporal, assim como também não garante um fenótipo característico da DP humana (Patil et al., 2014), por vezes limitando protocolos experimentais que preconizam o acompanhamento lento, progressivo e/ou com início tardio, peculiares às doenças neurodegenerativas.

Sendo assim, a técnica eleita para o presente trabalho foi a que induz um modelo de DP por meio da injeção da toxina 6-OHDA no estriado, o que resulta numa lesão retrógrada dos neurônios nigro-estriatais (Blum et al., 2001). A 6-OHDA é uma neurotoxina que possui uma estrutura análoga à das catecolaminas, captada pelos neurônios catecolaminérgicos por meio de transportadores específicos. Dentro dos neurônios, a neurotoxina é acumulada como um falso neurotransmissor (Schwartz e Huston, 1996; Bové et al., 2005). Sendo um composto muito eletroativo, a 6-OHDA é rapidamente oxidada, levando à produção de vários compostos neurotóxicos que irão ser responsáveis pela degradação neuronal progressiva, interferindo nos processos de respiração celular. A administração sistêmica de 6-OHDA não é capaz de produzir destruição dos neurônios do mesencéfalo, já que esse composto é incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica (Bové et al., 2005).

Uma vez injetada diretamente nas estruturas encefálicas de interesse, a 6-OHDA é capaz de destruir seletivamente neurônios catecolaminérgicos, levando a uma depleção de dopamina, noradrenalina e adrenalina nas regiões encefálicas que apresentam imunorreatividade para a enzima TH (Schwartz e Huston, 1996; Mann et al., 2018). Com relação à escolha do sítio de injeção da toxina 6-OHDA, na presente pesquisa, optamos pela injeção bilateral na região do estriado (núcleos Caudado e Putamem - CPu) a fim de promover uma lesão retrógrada gradativa e temporal dos neurônios dopaminérgicos da região da SNc. De acordo com a literatura, a neurodegeneração observada na SNc, quando a toxina 6-OHDA é aplicada na região do CPu, inicia-se aproximadamente após vinte dias (Przedborski et al., 1995; Spillantini et al., 1998). Com isso, buscamos uma maior aproximação ao padrão clássico da DP, que se caracteriza por uma lenta e progressiva degeneração bilateral destes neurônios. Outras regiões encefálicas como, por exemplo, a própria SNc ou o feixe prosencefálico podem ser escolhidas para a realização da injeção de 6-OHDA com o mesmo objetivo de promover a lesão dos neurônios dopaminérgicos

dessas estruturas. Entretanto, esses dois sítios levam a uma rápida e agressiva degeneração dos neurônios dopaminérgicos da SNc, com elevada taxa de mortalidade dos animais (Faull e Laverty, 1969; Zuch et al., 2000).

1.4 Alterações funcionais na DP, resultados prévios obtidos em laboratório e o controle neural da respiração.

Além dos sintomas motores e déficits cognitivos observados na DP, uma alteração que acomete um importante e vital sistema do organismo, o respiratório, vem despertando interesse nas últimas décadas.

Sabe-se que as disfunções respiratórias representam uma das possíveis manifestações clínicas dos distúrbios neurológicos (Nogues et al, 2002). No entanto, pouco se sabe a respeito do controle central da respiração frente à DP. Acredita-se que em patologias neurodegenerativas, diferentes componentes do sistema respiratório possam ser afetados, como: receptores sensoriais, vias aferentes, interneurônios da região do tronco encefálico e neurônios pré-motores, vias motoras descendentes, neurônios motores, junções neuromusculares, assim como os próprios músculos respiratórios, seja os da via respiratória superior ou os associados à mecânica respiratória (Feldman et al, 1986; Feldman et al, 1988; Richter e Spyer, 2001; Nogues et al, 2002).

Entre os distúrbios respiratórios que afetam os pacientes portadores de doenças neurodegenerativas talvez o mais crítico clinicamente seja a pausa temporária da atividade respiratória a qual pode evoluir ou não para uma parada respiratória definitiva (Nashef et al, 1996; Nogues et al, 2002). Neste sentido, o aparecimento dos problemas respiratórios pode ser responsável por substancial mortalidade e morbidade associadas à DP. Clinicamente, é possível observar que o decurso da DP é acompanhado por um decréscimo proporcional da capacidade funcional respiratória, obstrução das vias aéreas superiores, diminuição da complacência da caixa torácica e discinesias musculares (Wermuth et al; 1995). O conjunto destas alterações pode acarretar dispneia, hipoventilação e atelectasias, facilitando assim um grave quadro de pneumonia (Wermuth et al; 1995).

De acordo com alguns trabalhos clínicos, também pode ocorrer apnéia obstrutiva do sono em pacientes com DP, caracterizando uma das principais causas de elevada morbidade nestes pacientes (Lees et al; 1988, Gjerstad et al; 2007). Já existem especulações sobre degenerações no SNC, mais o foco dos pesquisadores

foi explorar a base neuroquímica da apneia obstrutiva do sono (OSA), especificamente em circuitarias tálamos-corticais em atrofia de múltiplos sistemas (MSA) (Gilman et al; 2003), porém, estas afirmações ainda carecem de dados confirmatórios e complementares.

Trabalho realizado em nosso laboratório com modelo de DP induzido pela injeção de 6-OHDA no CPu, demonstrou alterações respiratórias basais a partir do 40º dia após a lesão e esse efeito durou pelo menos até o 60º dia (Figura 3). Ao serem analisados os encéfalos dos animais após 60 dias da lesão, observou-se, como esperado, uma intensa redução no número de neurônios catecolaminérgicos da SNc, mas também de regiões bulbares, como o núcleo retrotrapezóide (RTN), o complexo de Pré-Botzinger (preBotC), núcleo do trato solitário (NTS) e grupamento respiratório ventrolateral rostral (rVRG) (Figura 3, Tuppy et al; 2015). A função na respiração de cada uma dessas regiões será explicada mais adiante.

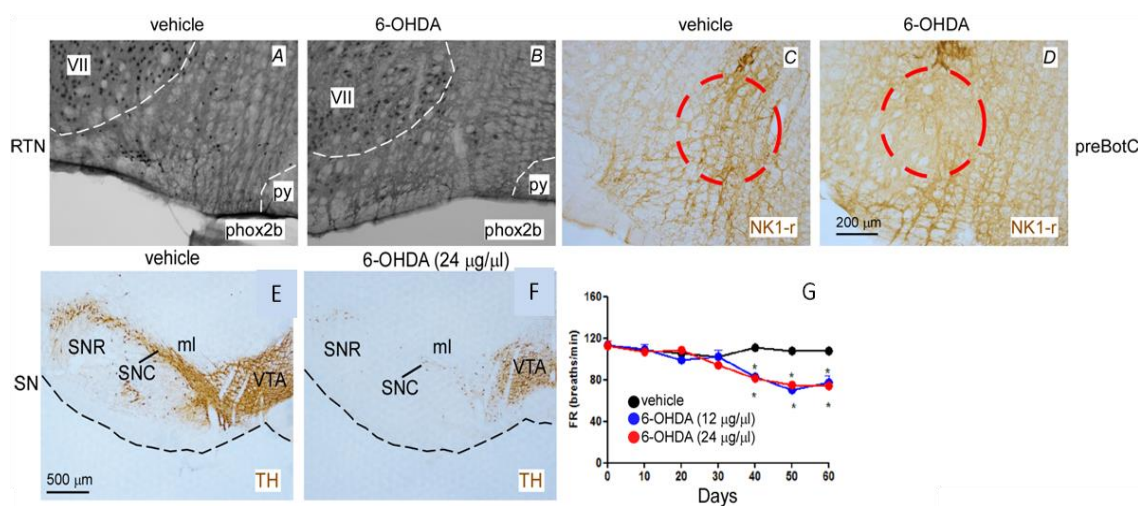


Figura 3: Fotomicrografias com resultados prévios mostrando os efeitos da injeção bilateral de 6-OHDA (24 µg/µl) ou veículo no CPu.

Imunoreatividade de **A e B**) neurônios phox2b do RTN; **C e D**) receptores NK1 de neurônios no pré-Botzinger; **E e F**) neurônios catecolaminérgicos da SNc. **G**) Efeitos da injeção bilateral de 6-OHDA (12 e 24 µg/µl) ou veículo no CPu na frequência respiratória de animais não-anestesiados. Dados exibidos em média ± SD. *Abreviações:* SNr: substância negra parte reticular; SNC: substância negra parte compacta; ml: leminiscu medial; VTA: área tegmental ventral; VII: núcleo motor do nervo facial; py: trato piramidal; NK1-r: receptor de neuroquinina 1. *diferença estatística em relação ao veículo (Tuppy et al; 2015).

O controle neural respiratório se faz por um conjunto de estruturas bulbares interligadas em uma rede neural complexa e altamente precisa, sem a qual a manutenção da vida não seria possível. No primeiro século da era cristã, o médico romano Claudio Galeno (129-199), já havia notado que a secção medular paralisaria os movimentos torácicos. Mas foi em 1811 que o fisiologista francês Julien César LeGallois demonstrou pela primeira vez em coelhos a existência de uma área

específica no bulbo que controlava a respiração (LeGallois, 1812). Dados de inúmeros trabalhos na literatura estabelecem que os neurônios envolvidos no controle da respiração se localizam na superfície ventrolateral do bulbo (Loeschcke, 1982). O complexo de preBotC é composto por neurônios excitatórios e inibitórios essenciais para a geração do ritmo respiratório (Guyenet et al., 2002; Stornetta et al., 2003). Já o rVRG contém neurônios em sua maioria glutamatérgicos pré-motores excitatórios, controlando a atividade dos músculos inspiratórios (Liu et al., 1990; Smith et al., 2007). Na porção mais dorsal da coluna respiratória, mais precisamente no núcleo do trato solitário (NTS), existem neurônios que expressam o fator de transcrição Phox2b e modulam a respiração por enviar projeções para a coluna respiratória ventral (Kang et al., 2007; Stornetta et al., 2006). Por fim, na porção mais rostral da coluna respiratória ventral, existem os neurônios Phox2b na região do RTN. Esses neurônios estão associados à quimiorrecepção central, são excitatórios, contêm Neuromedina B e também se projetam para as porções um pouco mais caudais da coluna respiratória ventral, como preBotC e rVRG (Mulkey et al., 2004; Takakura et al., 2008; Guyenet, 2015; Takakura et al., 2014).

Como as alterações neuroanatômicas no modelo da DP investigado no laboratório só foram avaliadas ao final dos 60 dias e as alterações funcionais apareceram a partir do 40º dia após a injeção da toxina, uma das questões a ser respondida refere-se à relação temporal entre estes achados. Torna-se importante avaliar se as alterações funcionais que foram observadas ocorrem antes, simultaneamente ou após o início das alterações neuroanatômicas.

Por fim, considerando o elevado impacto social e suas drásticas consequências aos portadores de DP, se faz fundamental investir esforços na melhor compreensão dos processos neurodegenerativos envolvidos no controle neural respiratório, assim como, os possíveis mecanismos para restauração da função respiratória, o que poderia em última análise contribuir para a sobrevida destes pacientes.

CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste trabalho forneceram a primeira evidência de que em animais submetidos ao modelo experimental para Doença de Parkinson, as alterações neuroanatômicas precederam as alterações funcionais. A redução de neurônios da SNc foi correlacionada às reduções de estruturas bulbares críticas para o controle neural da respiração. O comprometimento da atividade respiratória observada neste modelo poderá servir de parâmetro translacional à medida que demonstra um déficit na resposta ventilatória, que em pacientes com DP, pode representar um dos fatores de risco associados ao decurso final da doença.

Ainda, a observação neste modelo de que mesmo com redução no número de neurônios que expressão o fator de transcrição Phox2b no RTN e existindo uma assinatura biomolecular que demonstra um processo de remodelamento proteico, a estimulação farmacológica e a foto-estimulação desta região foi capaz de promover um aumento na resposta ventilatória. Deste modo, a combinação de técnicas específicas de proteômica e optogenética, apresentou resultados que acreditamos abrir um promissor caminho para futuras linhas de pesquisa associadas às doenças neurodegenerativas.

REFERÊNCIAS*

- Abbott SB, Stornetta RL, Coates MB, Guyenet PG. Phox2b-Expressing Neurons of the Parafacial Region Regulate Breathing Rate, Inspiration, and Expiration in Conscious Rats. *Journal of Neuroscience*. 2011; November 9, 31(45):16410–16422.
- Abbott SB, Depuy SD, Nguyen T, Coates MB, Stornetta RL, Guyenet PG. Selective optogenetic activation of rostral ventrolateral medullary catecholaminergic neurons produces cardiorespiratory stimulation in conscious mice. *J Neurosci*. 2013; February 13; 33(7): 3164–3177
- Akita T, Aoto K, Kato M, Shiina M, Mutoh H, Nakashima M, Kuki I, Okazaki S, Magara S, Shiihara T, Yokochi K, Aiba K, Tohyama J, Ohba C, Miyatake S, Miyake N, Ogata K, Fukuda A, Matsumoto N, Saitsu H. De novo variants in CAMK2A and CAMK2B causes neurodevelopmental disorders. *Ann Clin Transl Neurol*. 2018; Jan 29;5(3):280-296.
- Alexander GE, Crutcher MD. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci*. 1990; Jul;13(7):266-71. Review.
- Alexander GE, DeLong MR, Strick RL. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Ann. Rev. Neurosci*. 1986; 9:357-381.
- Aravanis AM, Wang LP, Zhang F, Meltzer LA, Mogri MZ, Schneider MB, Deisseroth K. An optical neural interface: in vivo control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology. *J. Neural Eng*. 2007; 4, S143–S156.
- Bassetti, CL. Nonmotor disturbances in Parkinson's disease. *Neurodegener. Dis*. 2011; 8, 95–108.
- Benarroch, E. E., Schmeichel, A. M., Parisi, J. E. Involvement of the ventrolateral medulla in parkinsonism with autonomic failure. *Neurology*. 2000; 54(4), 963–968.
- Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B Stat Methodol*. 1995; 57:289-300.
- Berger, A. J., Cooney, K. A. Ventilatory effects of kainic acid injection in the ventrolateral solitary nucleus. *Journal of Applied Physiology*. 1982; 52(1), 131–140.
- Biancardi V, Bicego KC, Almeida MC & Gargaglioni LH. Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO2 drive to breathing. *Pflugers Arch*. 2008; 455, 1119–1128.
- Bianchi AL, Denavit-Saubie M, Champagnat J. Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiol Rev*. 1995; 75, 1-45.

*De acordo com: Internacional Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical journal: Sample references. 2003 [cited 2016 may 30]. Available from: https://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Blain GM, Smith CA, Henderson KS, Dempsey JA. Peripheral chemoreceptors determine the respiratory sensitivity of central chemoreceptors to CO₂. *J Physiol*. 2010; 588(Pt 13):2455–2471.

Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, Verna JM. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*. 2001; Oct;65(2):135-72. Review.

Bové J, Serrats J, Mengod G, Cortés R, Tolosa E, Marin C. Neuroprotection induced by the adenosine A_{2A} antagonist CSC in the 6-OHDA rat model of parkinsonism: effect on the activity of striatal output. *Exp Brain Res*. 2005 Sep;165(3):362-74.

Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RAI, Jansen Steur ENH, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003; Apr;24(2):197–211.

Braccialli AL, Bonagamba LG, Machado BH. Glutamatergic and purinergic mechanisms on respiratory modulation in the caudal NTS of awake rats. In *Respir Physiol Neurobiol*. 2008; pp. 246-252. Netherlands.

Bright R, Mochly-Rosen. The role of protein kinase C cerebral ischemic and reperfusion injury. *Stroke*. 2005; Dec;36 (12): 2781-90.

Budzinska K, Andrzejewski K. Respiratory activity in the 6-OHDA hydroxydopamine model of Parkinson's disease in the rat. *Acta 572 Neurobiol Exp (Wars)*. 2014; 74:67–81.

Bunton K. Patterns of lung volume use during an extemporaneous speech task in persons with Parkinson disease. *J Commun Disord*. 2005; 38:331–348.

Burke PGR, Kanbar R, Viar KE, Stornetta RL, Guyenet PG. Selective optogenetic stimulation of the retrotrapezoid nucleus in sleeping rats activates breathing without changing blood pressure or causing arousal or sighs. *J Appl Physiol*. 2015.118: 1491–1501.

Burke PGR, Kanbar R, Basting TM, Hodges WM, Viar KE, Stornetta RL, Guyenet PG. State-dependent control of breathing by the retrotrapezoid nucleus. *J Appl Physiol*. 2015.118: 1491–1501.

Colinge J, Chiappe D, Lagache S, Moniatte M, Bougueleret L. Differential proteomics via probabilistic peptide identification scores. *Anal Chem*. 2005; 77:596-606.

Calne DG. Is idiopathic parkinsonism the consequence of an event or a process? *Neurology Boston*. 1994; 44:5-10.

Carod-Artal FJ, Vargas AP, Martinez-Martin P. Determinants of quality of life in Brazilian patients with Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2007 Jul 30;22(10):1408-15.

Chaudhuri, KR., et al., Parkinson's Disease: The Non-Motor Issues. *Parkinsonism Relat Disord.* 2011. Dec;17(10):717-23.

Cruz-Orive LM. Stereology of single objects. *J Microsc.* 1997;186: 93–107.

Cummings JL. Depression and Parkinson's disease: a review. *Am J Psychiatry.* 1992; Apr;149(4):443-54. Review.

de Lau LML, Breteler MMB. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2006; Jun;5(6):525–35.

Deisseroth K, Feng G, Majewska AK, Miesenböck G, Ting A, Schnitzer MJ. Next-Generation Optical Technologies for Illuminating Genetically Targeted Brain Circuits. *J Neurosci.* 2006 October 11; 26(41).

Doi A, Ramirez JM. Neuromodulation and the orchestration of the respiratory rhythm. *Respir Physiol Neurobiol.* 2008; 164:96-104.

Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, Biglan KM, Holloway RG, Kieburtz K, Marshal FJ, Ravina BM, Schifitto G, Siderowf A, Tanner CM. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology.* 2007; 68, 384–386.

Drorbaugh JE and Fenn W. A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics.* 1955; Jul;16(1):81-7.
Editorial: Method of the Year 2010. *Nature Methods.* 2011; Jan, 8:1, 1.

Falquetto B, Tuppy M, Potje, RS, Moreira TS, Antoniali C, Takakura AC. Cardiovascular dysfunction associated with neurodegeneration in an experimental model of Parkinson's disease. *Brain Research.* 2017; 1657(15), 156–166.

Favero MT, Takakura AC, de Paula PM, Colombari E, Menani JV, Moreira TS. Chemosensory control by commissural nucleus of the solitary tract in rats. *Respiratory Physiology & Neurobiology.* 2011; 179(2–3), 227–234.

Faull RL, Lavery R. Changes in dopamine levels in the corpus striatum following lesions in the substantia nigra *Exp Neurol.* 1969 Mar;23(3):332-40.

Fearnley JM, Lees AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain.* 1991; Oct;114 (Pt 5):2283-301.

Feldman JL. Neurophysiology of breathing in mammals. In: Geiger SR (ed) *Handbook of Physiology: A critical, Comprehensive Presentation of Physiological Knowledge and Concepts*, section 1, the Nervous System, vol 4, American Physiological Society, Bethesda. 1986; pp 463–524.

Feldman JL, Ellenberger HH Central coordination of respiratory and cardiovascular control in mammals. *Annu Rev Physiol.* 1998; 50:593–606.

Feldman JL, Mitchell GS, Nattie EE. Breathing: Rhythmicity, Plasticity, Chemosensitivity. *Annual Review of Neuroscience*. 2003; Vol. 26: 239-266.

Feldman JL, Del Negro CA, Gray PA. Understanding the rhythm of breathing: so near, yet so far. *Annu Rev Physiol*. 2013; 75:423–452.

Fernandes-Junior SA, Carvalho KS, Moreira TS, Takakura AC. Correlation between neuroanatomical and functional respiratory changes observed in an experimental model of Parkinson's disease. *Experimental Physiology*. 2018; 103, 1377– 1389.

Gilman S, Chervin RD, Koeppe RA, Consens FB, Little R, An H. Obstructive sleep apnea is related to a thalamic cholinergic deficit in MSA. *Neurology*. 2003; 61(1):35-9.

Gjerstad M, Wentzel-Larsen T, Aarsland D, Larsen J. Insomnia in Parkinson's disease: frequency and progression over time. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007; 78:476-9.

Gonda X. Basic Pharmacology of NMDA Receptors. *Current Pharmaceutical Design*, San Francisco. 2012; v.18, n. 5, p. 1558-1567, 2012.

Gourine AV, Llaudet E, Dale N, Spyer KM. ATP is a mediator of chemosensory transduction in the central nervous system. *Nature*. 2005, v. 436(7047), p. 108-111.

Guyenet PG, Sevigny CP, Weston WC, and Stornetta RL. Neurokinin-1 Receptor-Expressing Cells of the Ventral Respiratory Group Are Functionally Heterogeneous and Predominantly Glutamatergic. *The Journal of Neuroscience*. 2002; May 1, 22(9):3806–3816.

Guyenet PG, Stornetta RL, Bochorishvili G, Depuy SD, Burke PG, Abbott SB. C1 neurons: the body's EMTs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013; 305(3):R187-204.

Guyenet PG, Bayliss DA. Neural Control of Breathing and CO₂ Homeostasis. *Neuron*. 2015; Sep 2;87(5):946-61.

Holloway BB, Viar KE, Stornetta RL, Guyenet PG. The retrotrapezoid nucleus stimulates breathing by releasing glutamate in adult conscious mice. *European Journal of Neuroscience*. 2015; Sep;42(6):2271-82.

Hald A, Lotharius J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? *Exp Neurol*. 2005 Jun;193(2):279-90.

Hammer MJ, Barlow SM. Laryngeal somatosensory deficits in Parkinson's disease: implications for speech respiratory and phonatory control. *Exp Brain Res*. 2010; 201:401–409.

Huang YR, Xie XX, Ji M, Yu XL, Zhu J, Zhang LX, Liu XG, Wei C, Li G, Liu RT. Naturally occurring autoantibodies against α -synuclein rescues memory and motor

deficits and attenuates α -synuclein pathology in mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2018; Nov 24; 124:202-217.

Hughes AJ, Daniel SE, Blankson S, Lees AJ. A clinicopathologic study of 100 cases of Parkinson's disease. *Arch Neurol.* 1993; Feb;50(2):140-8.

Hwang DY, Carlezon WA Jr, Isacson O, Kim KS. A high-efficiency synthetic promoter that drives transgene expression selectively in noradrenergic neurons. *Hum Gene Ther.* 2001; 12:1731–1740.

Idiaquez J, Benarroch EE, Rosales H, Milla P, Ríos L. Autonomic and cognitive dysfunction in Parkinson's disease. *Clin Auton Res.* 2007; 17:93–98.

Josselyn SA. The past, present and future of light-gated ion channels and optogenetics. *eLife.* 2018; Oct 22; 7: e42367. Published online.

Kang, BJ, Chang, DA, Mackay, DD, West, GH, Moreira, TS, Takakura, A C, Stornetta, RL (2007). Central nervous system distribution of the transcription factor Phox2b in the adult rat. *Journal of Comparative Neurology*, 503(5), 627–641. <https://doi.org/10.1002/cne.21409>.

Katagiri T, Hatano N, Aihara M, Kawano H, Okamoto M, Liu Y, Izumi T, Maekawa T, Nakamura S, Ishihara T, Shirai M, Mizukami Y. Proteomic analysis of proteins expressing in regions of rat brain by a combination of SDS-PAGE with nano-liquid chromatography quadrupole-time of flight tandem mass spectrometry. *Proteome Science.* 2010; Jul 27;8:41.

Kumar P, Kaundal RK, More S, Sharma SS. Beneficial effects of pioglitazone on cognitive impairment in MPTP model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res.* 2009; Feb 11;197(2):398-403.

Kury S, van Woerden GM, Besnard T, et al. De Novo Mutations in Protein Kinase Genes CAMK2A and CAMK2B Cause Intellectual Disability. *The American Journal of Human Genetics.* 2017; 101, 768–788.

Lee A, Gilbert RM. Epidemiology of Parkinson Disease *Neurol Clin.* 2016; Nov;34(4):955-965.

Lees AJ, Blackburn NA, Campbell VL. The nighttime problems of Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol* 1988; 11:512-9.

LeGallois. Expériences sur le Principe de la Vie, notamment sur celui des mouvemens du Coeur, et sur le siege de ce principe. A Paris: Chez D'Hautel; 1812.

Lill CM, Genetics of Parkinson's disease. *Molecular and Cellular Probes.* 2016; doi: 10.1016/j.mcp.2016.11.001.

Lindgren P, von Campenhausen S, Spottke E, Siebert U and Dodel R. Cost of Parkinson's disease in Europe. *European Journal of Neurology.* 2005; 12 (Suppl. 1): 68–73.

Liu G, Feldman JL, Smith JC. Excitatory amino acid-mediated transmission of inspiratory drive to phrenic motoneurons. *J Neurophysiol.* 1990;64(2):423-36.

Liu H, Sadygov RG, Yates III JR. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal Chem.* 2004; 76:4193-201.

Loeschcke HH. Central chemosensitivity and the reaction theory. *J Physiol.* 1982;332:1-24.

Malan A. Ventilation measured by body plethysmography in hibernating mammals and in poikilotherms. *Respir Physiol.* 1973;17, 32–44.

Mann T, Zilles K, Dikow H, Hellfritsch A, Cremer M, Piel M, Rösch F, Hawlitschka A, Schmitt O, Wree A. Dopamine, Noradrenaline and Serotonin Receptor Densities in the Striatum of Hemiparkinsonian Rats following Botulinum Neurotoxin-A Injection. *Neuroscience.* 2018; Mar 15; 374:187-204.

Martin, JH. *Neuroanatomia: texto e atlas.* 2° ed. Porto Alegre, RS: Artes Médicas, 1998. p.323-350.

Martinez-Martin, P. The importance of non-motor disturbances to quality of life in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 2011; 310, p. 12–16.

McDowell K, Chesselet MF. Animal models of the non-motor features of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2012; Jun;46(3):597-606.

Mehanna R, Jankovic J. Respiratory problems in neurologic movement disorders. *Parkinsonism Relat Disord.* 2010; Dec;16(10):628-38.

Menkes HA, DuBois AB. Subtraction of cardiopneumatic pulsations from body plethysmograph records. *Journal of Applied Physiology.* 1969; Vol. 27. n.6, 910-911.

Minakaki G, Canneva F, Chevessier F, Bode F, Menges S, Timotius IK, Kalinichenko LS, Meixner H, Müller CP, Eskofier BM, Casadei N, Riess O, Schröder R, Winkler J, Xiang W, von Hörsten S, Klucken J. Treadmill exercise intervention improves gait and postural control in alpha-synuclein mouse models without inducing cerebral autophagy. *Behav Brain Res.* 2018; Dec 29.

Mink JW. Basal Ganglia. In: Zigmund MJ; Bloon FE; Lands SC; Roberts JL; Squire LR. *Fundamental Neuroscience.* San Diego: Academic Press, 1999.

Mulkey DK, Stornetta, RL, Weston MC, Simmons JR, Parker A, Bayliss, DA, Guyenet PG. Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. *Nat Neurosci.* 2004; v. 7(12), p. 1360-1369.

Nashef L, Walker F, Allen P, Sander JW, Shorvon SD, Fish DR. Apnoea and bradycardia during epileptic seizures: relation to sudden death in epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1996; 60:297–300.

Nattie EE, Li A. Catecholamine neurones in rats modulate sleep, breathing, central chemoreception and breathing variability. *Journal of Physiology*. 2006; 570(2), 385–396.

Nogués MA, Roncoroni AJ, Benarroch EE. Breathing control in neurological diseases. *Clin Auton Res*. 2002; 12: 440–449.

Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC, Rodríguez M, Lanciego JL, Artieda J, Gonzalo N, Olanow CW. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neurosci*. 2000; Oct; 23(10 Suppl): S8-19. Review.

Oliveira LM, Tuppy M, Moreira TS, Takakura AC. Role of the locus coeruleus catecholaminergic neurons in the chemosensory control of breathing in a Parkinson's disease model. *Experimental Neurology*. 2017; 293, 172–180.

Pamenter ME, Powell FLP. Time Domains of the Hypoxic Ventilatory Response and Their Molecular Basis. *Compr Physiol*.; 6(3): 1345–1385.

Parkinson J. An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2002 Spring;14(2):223-36; discussion 222.

Patil DA, Patil VA, Bari SB, Surana SJ, Patil PO. Animal models for Parkinson's disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*. 2014; v. 13, n. 9, p. 1580-1594, 2014.

Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, New York, 1998.

Przedborski S, Levivier M, Jiang H, Ferreira M, Jackson-Lewis V, Donaldson D, Togasaki DM. Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience*. 1995; Aug;67(3):631-47.

Ramirez JM, Doi A, Garcia AJ, III, Elsen FP, Koch H, Wei AD. The cellular building blocks of breathing. 2012; *Compr Physiol* 2:2683-2731.

Reale M, Iarlori C, Thomas A, Gambi D, Perfetti B, Di Nicola M, Onofri M. Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease. *Brain Behav Immun*. 2009; Jan;23(1):55-63.

Reeve A, Simcox E, Turnbull D. Ageing and Parkinson's disease: Why is advancing age the biggest risk factor? *Ageing Research Reviews*. 2014; 14:19–30.

Reyes A, Ziman M, Nosaka K. Respiratory muscle training for respiratory deficits in neurodegenerative disorders: a systematic review. *Chest*. 2013; 143:1386–1394.

Richter DW. Generation and maintenance of the respiratory rhythm. *J Exp Biol*. 1982; 100, 93-107.

Richter DW e Spyer KM. Studying rhythmogenesis of breathing: comparison of in vivo and in vitro models. *Trends Neurosci*. 2001; 24, 464-472.

Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Gene expression*. 2010; Vol. 26(1): 139–140.

Rosin DL, Chang DA, Guyenet PG. Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus. *J. Comp. Neurol.* 2006; 499, 64–89.

Ross-Macdonald P, Coelho PS, Roemer T, Agarwal S, Kumar A, Jansen R, Cheung KH, Sheehan A, Symoniatis D, Umansky L, et al: Large-scale analysis of the yeast genome by transposon tagging and gene disruption. *Nature*. 1999; 402:413-418.

Roy S, Sen CK. Study of the human chronic wound tissue: addressing logistic barriers and productive use of laser capture microdissection. *Methods Mol Biol.* 2013; 1037: 233–243.

Scheife RT, Schumock GT, Burstein A, Gottwald MD, Luer MS. Impact of Parkinson's disease and its pharmacologic treatment on quality of life and economic outcomes. *Am J Health Syst Pharm.* 2000; May 15;57(10):953-62.

Schwartz RK, Huston JP Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of meso-striatal dopamine neurons and their physiological sequelae. *Prog Neurobiol.* 1996; Jun;49(3):215-66. Review.

Schreihofer AM, Guyenet PG. Identification of C1 presympathetic neurons in rat rostral ventrolateral medulla by juxtacellular labeling in vivo. *J Comp Neurol.* 1997; Nov 3;387(4):524-36.

Seccombe LM, Giddings HL, Rogers PG, Corbett AJ, Hayes MW, Peters MJ, Veitch EM. Abnormal ventilatory control in Parkinson's disease—further evidence for non-motor dysfunction. *Respir Physiol Neurobiol.* 2011; 179:300–304.

Shi Y, Stornetta RL, Stornetta DS, Onengut-Gumuscu S, Farber EA, Turner SD, Guyenet P, Bayliss DA. *J Neurosci.* 2017 Nov 29;37(48):11744-11757. Neuromedin B Expression Defines the Mouse Retrotrapezoid Nucleus.

Silva JN, Tanabe FM, Moreira TS, Takakura AC. Neuroanatomical and physiological evidence that the retrotrapezoid nucleus/parafacial region regulates expiration in adult rats. *Respir Physiol Neurobiol.* 2016;15;227:9-22.

Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW, Feldman JL. Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science.* 1991; 254: 726–729.

Smith JC, Abdala AP, Koizumi H, Rybak IA, Paton JF. (2007). Spatial and functional architecture of the mammalian brain stem respiratory network: a hierarchy of three oscillatory mechanisms. In *J Neurophysiol.* 2007; pp. 3370-3387.

Solomon NP, Hixon TJ. Speech breathing in Parkinson's disease. *J Speech Hear Res.* 1993; 36:294–310.

Sparta DR, Stamatakis AM, Phillips JL, Nanna Hovelsø, van Zessen R, Garret GD. Construction of implantable optical fibers for long-term optogenetic manipulation of neural circuits. *Nature Protocols*; 2012; vol.7 no.1.

Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Cairns NJ, Lantos PL, Goedert M. Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurosci Lett*. 1998; Jul 31;251(3):205-8.

Standaert e Galanter, in: Golan D, Tashjian AH, Armstrong, EJ. *Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacologia*, 2012, p 165-185.

Stornetta RL, Rosin DL, Wang H, Sevigny CP, Weston MC, Guyenet PG. A group of glutamatergic interneurons expressing high levels of both neurokinin-1 receptors and somatostatin identifies the region of the pre-Botzinger complex. *J. Comp. Neurol*. 2003; 455, 499–512.

Stornetta RL, Moreira TS, Takakura AC, Kang BJ, Chang DA, West GH, Brunet JF, Mulkey DK, Bayliss DA, Guyenet PG. Expression of Phox2b by brainstem neurons involved in chemosensory integration in the adult rat. *J Neurosci*. 2006; 26:10305–10314.

Stornetta RL, Spirovski D, Moreira TS, Takakura AC, West GH, Gwilt JM, Pilowsky PM, Guyenet PG. Galanin is a selective marker of the retrotrapezoid nucleus in rats. *J Comp Neurol*. 2009; 512:373–383.

Takakura AC, Moreira TS, Colombari E, West GH, Stornetta RL, Guyenet PG. Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats. *J Physiol*. 2006;572 (Pt2):503-23.

Takakura AC, Moreira TS, Stornetta RL, West GH, Gwilt JM, Guyenet PG. Selective lesion of retrotrapezoid Phox2b-expressing neurons raises the apnoeic threshold in rats. *J Physiol*. 2008;586(Pt 12):2975-91.

Takakura AC, Barna BF, Cruz JC, Colombari E, Moreira TS. Phox2b-expressing retrotrapezoid neurons and the integration of central and peripheral chemosensory control of breathing in conscious rats. *Exp Physiol*. 2014; Mar;99(3):571-85.

Troche MS, Okun MS, Rosenbek JC, Musson N, Fernandez HH, Rodriguez R, Romrell J, Pitts T, Wheeler-Hegland KM, Sapienza CM. Aspiration and swallowing in Parkinson disease and rehabilitation with EMST: a randomized trial. *Neurology*. 2010; 75:1912–1919.

Tuppy M, Barna BF, Alves-dos-Santos L, Britto LRG, Chiavegatto S, Moreira TS, Takakura AC. Respiratory deficits in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2015; 297, 194–204.

Tzelepis GE, McCool FD, Friedman JH, Hoppin FG. Respiratory muscle dysfunction in Parkinson's disease. *Am Rev Respir Dis*. 1998; 138:266–271.

Vaes E, Khan M, Mombaerts P. Statistical analysis of differential gene expression relative to a fold change threshold on NanoString data of mouse odorant receptor genes. *BMC Bioinformatics*. 2014; 15:39.

Wang H, Stornetta RL, Rosin DL, Guyenet PG. Neurokinin-1 receptor-immunoreactive neurons of the ventral respiratory group in the rat. *J.Comp. Neurol*. 2011; 434, 128–146.

Weibel ER. *Stereological methods*. Vol. 1: Practical methods for biological morphometry. Academic Press, London, 1979.

Wenker IC, Kreneisz O, Nishiyama A, Mulkey DK. Astrocytes in the retrotrapezoid nucleus sense H⁺ by inhibition of a Kir4.1-Kir5.1-like current and may contribute to chemoreception by a purinergic mechanism. *J Neurophysiol*. 2010; v. 104(6), p. 3042-3052.

Wenker IC, Abe C, Viar KE, Stornetta DS, Stornetta RL, Guyenet PG. Blood pressure regulation by the rostral ventrolateral medulla in conscious rats: effects of hypoxia, hypercapnia, baroreceptor denervation, and anesthesia. *The Journal of Neuroscience*. 2017; April 26, 37(17):4565– 4583.

Wermuth L, Stenager EN, Stenager E, Boldsen J. Mortality in patients with Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand*. 1995; 92:55-8.

Yao L, Zhou Q. Enhancing NMDA Receptor Function: Recent Progress on Allosteric Modulators. *Neural Plast*. 2017;2875904.

Zhang Y, Conti MA, Malide D, Dong F, Wang A, Shmist YA, Liu C, Zervas P, Daniels MP, Chan CC, Kozin E, Kachar B, Kelley MJ, Kopp JB, Adelstein RS. Mouse models of MYH9-related disease: mutations in nonmuscle myosin II-A. *Blood*. 2012; Jan 5;119(1):238-50.

Zhu Y, Das K, Wu J, Lee MH, Tan P. RNH1 regulation of reactive oxygen species contributes to histone deacetylase inhibitor resistance in gastric cancer cells. *Oncogene*. 2014; Mar 20;33(12):1527-37.

Zoccal DB, Paton JF, Machado BH. Do changes in the coupling between respiratory and sympathetic activities contribute to neurogenic hypertension? *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009;36(12):1188-96.

Zuch CL, Nordstroem VK, Briedrick LA, Hoernig GR, Granholm AC, Bickford PC. Time course of degenerative alterations in nigral dopaminergic neurons following a 6-hydroxydopamine lesion. *J Comp Neurol*. 2000; Nov 20;427(3):440-54.