

**CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO**  
**Biomedicina**

**Nayani Gomes de Lira Soares**

**AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS DA GLIA NOS NÚCLEOS RESPIRATÓRIOS NO  
MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON FRENTE AO TRATAMENTO  
COM APOCININA**

**São Paulo**  
**2023**

**Nayani Gomes de Lira Soares**

**AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS DA GLIA NOS NÚCLEOS RESPIRATÓRIOS NO  
MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON FRENTE AO TRATAMENTO  
COM APOCININA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pela Prof. Dr. Beatriz Duarte Palma Xylaras, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Coorientadora: Barbara Falchetto

**São Paulo**

**2023**

**Ficha catalográfica elaborada pelas Bibliotecas São Camilo**

Soares, Nayani Gomes de Lira

Avaliação das células da glia nos núcleos respiratórios no modelo animal de Doença de Parkinson frente ao tratamento com apocinina / Nayani Gomes de Lira Soares. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2023.

40 p.

Orientação de Beatriz Duarte Palma Xylaras.

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2023.

1. Astrócitos 2. Doença de Parkinson 3. Doenças neuroinflamatórias 4. Microglia I. Xylaras, Beatriz Duarte Palma II. Centro Universitário São Camilo III. Título

CDD: 616.833

**Nayani Gomes de Lira Soares**

**AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS DA GLIA NOS NÚCLEOS RESPIRATÓRIOS NO  
MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON FRENTE AO TRATAMENTO  
COM APOCININA**

---

**Orientador (Prof<sup>a</sup>. Beatriz Duarte Palma Xylaras)**

---

**Examinador (Dr<sup>a</sup>. Priscila Kalil Morelhão)**

---

**Examinador (Prof. Ronaldo Luís da Silva)**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao grupo de pesquisa NeuroBreath, em especial aos meus colegas de laboratório, Pamela, Luiz, André e Isabella, que ao longo da minha jornada na Iniciação Científica me ensinaram e me ajudaram em todos os momentos. Obrigada pelos ensinamentos e pelas risadas sempre sinceras.

Agradeço a minha co-orientadora Barbara, que me acolheu, ensinou e aos longos dos anos sob sua orientação me fez amadurecer e crescer através de seus conselhos e broncas. À professora Beatriz Xylaras, que mesmo sem me conhecer e com apenas 5 minutos de conversa, aceitou me orientar e participar da execução desse trabalho. À FAPESP que financiou esta pesquisa e tornou a execução desse projeto possível (nº do processo 2022/02165-6).

Aos amigos Anna, Mariana, Karolina, Samara e Lucas que fiz durante a graduação que tornaram meus dias mais leves, as provas mais fáceis, os TIUs mais tranquilos e as risadas mais frequentes. Obrigada por toda ajuda e apoio aos longo dos anos.

À toda minha família, o meu muito obrigada. Agradeço especialmente ao meu pai, mãe e irmãos que sempre entenderam, respeitaram e me apoiaram na minha decisão de ser biomédica. Ao Pedro, que sempre com carinho e amor me apoiou e me motivou.

“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido.  
Agora é hora de compreender mais para temer menos.”

Marie Curie

## RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos da Substância Negra (SN). Apresenta sintomas não motores e motores não clássicos, como distúrbios de sono e disfunções cardiorrespiratórias. Os sintomas respiratórios são desencadeados pela obstrução das vias aéreas superiores e pela degeneração de neurônios presente nos núcleos respiratórios, estes localizados no tronco encefálico e responsáveis pelo controle neural da respiração. Atualmente, sabe-se que os astrócitos, presentes no tronco encefálico, desempenham papel na quimiorrecepção e na modulação da atividade respiratória neuronal. Além disso, a resposta inflamatória observada na DP ativa astrócitos e microglia provocando a produção excessiva de moléculas neurotóxicas, que resultam na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) favorecendo a neurodegeneração presente na DP. Em contrapartida, sabe-se que a apocinina, que atua como inibidor inespecífico da NADPH oxidase, é capaz de impedir a formação de superóxidos e prevenir danos na DP. Portanto, o objetivo desse projeto foi avaliar a participação das células da glia nas regiões de controle respiratório no modelo animal de DP e se o tratamento com apocinina é capaz de promover alterações nas mesmas e prevenir o dano respiratório, visto que estas células expressam a enzima NADPH oxidase. O modelo de DP foi gerado com ratos Wistar machos (CEUA Nº 2740200319) por injeção de 6-OHDA ou veículo no corpo estriado. Após 20 dias os animais foram tratados com apocinina. Cortes do tronco encefálico foram submetidos a imunohistoquímica. O modelo da doença e os déficits respiratórios foram confirmados, onde observamos mais de 70% da lesão dos neurônios da SN. Em relação aos astrócitos, não foram observadas diferenças na densidade dos mesmos entre o animal 6-OHDA e controle, entretanto os animais tratados apocinina obtiveram astrogliose no grupo 6-OHDA em relação ao tratamento no grupo veículo no NTSc, NTSi e RTN. Em relação a microglia, foram observados aumento no número de prolongamentos no NTSc no grupo veículo em relação ao grupo 6-OHDA após o tratamento e, aumento no número de células do RTN após o tratamento com apocinina. No preBotC, o tratamento com a apocinina foi capaz de aumentar a densidade da microglia no grupo 6-OHDA em comparação ao grupo veículo. Em resumo, esses dados mostraram que no modelo de DP, a neuroinflamação pode estar relacionada com processos de apoptose nos núcleos respiratórios no modelo de DP.

**Palavras-chaves:** Astrócitos; microglia; neuroinflamação.

## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease characterized by the loss of dopaminergic neurons in the Black Substance (NS). It presents non-motor and non-classical motor symptoms, such as sleep disorders and cardiorespiratory dysfunctions. Respiratory symptoms are triggered by the obstruction of the upper airways and the degeneration of neurons present in the respiratory nuclei, which are located in the brainstem and are responsible for the neural control of breathing. It is now known that astrocytes in the brainstem play a role in chemoreception and in modulating neuronal respiratory activity. In addition, the inflammatory response observed in PD activates astrocytes and microglia, causing excessive production of neurotoxic molecules, which result in the formation of reactive oxygen species (ROS), favoring the neurodegeneration present in PD. In contrast, it is known that apocynin, which acts as a non-specific inhibitor of NADPH oxidase, is able to prevent the formation of superoxides and prevent damage in PD. Therefore, the aim of this project was to evaluate the participation of glia cells in respiratory control regions in the animal model of PD and whether treatment with apocynin is capable of promoting changes in them and preventing respiratory damage, given that these cells express the enzyme NADPH oxidase. The PD model was generated in male Wistar rats (CEUA No. 2740200319) by injecting 6-OHDA or vehicle into the striatum. After 20 days, the animals were treated with apocynin. Brainstem sections were subjected to immunohistochemistry. The disease model and respiratory deficits were confirmed, where we observed more than 70% damage to SN neurons. With regard to astrocytes, no differences were observed in their density between the 6-OHDA and control animals; however, the apocynin-treated animals showed astrogliosis in the 6-OHDA group in relation to treatment in the vehicle group in the NTSc, NTSi and RTN. With regard to microglia, there was an increase in the number of extensions in the NTSc in the vehicle group compared to the 6-OHDA group after treatment and an increase in the number of RTN cells after treatment with apocynin. In preBotC, treatment with apocynin was able to increase the density of microglia in the 6-OHDA group compared to the vehicle group. In summary, these data showed that in the PD model, neuroinflammation may be related to apoptosis processes in the respiratory nuclei in the PD model.

**Keywords:** Astrocytes; microglia; neuroinflammation.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
1.1 DOENÇA DE PARKINSON .....	11
1.2 CONTROLE NEURAL DA RESPIRAÇÃO .....	12
1.3. DEGENERAÇÃO NEURONAL NA DOENÇA DE PARKINSON E SUA RELAÇÃO COM O ESTRESSE OXIDATIVO .....	12
1.4. AÇÃO DAS CÉLULAS DA GLIA COMO MODELO DE NEUROINFLAMAÇÃO NA DP .....	13
<b>2 OBJETIVO</b> .....	<b>15</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
3.1 ANIMAIS UTILIZADOS.....	15
3.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS – LESÕES QUÍMICAS DA SN. ....	15
3.3 INJEÇÕES CEREBRAIS.....	16
3.4 FÁRMACOS UTILIZADOS .....	16
3.5 TRATAMENTO CONTRA ESTRESSE OXIDATIVO – APOCININA.....	17
3.6 IMUNO-HISTOQUÍMICA .....	17
3.7 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA MICROGLIA .....	18
<b>3.7.1 Esqueletonização</b> .....	<b>18</b>
<b>3.7.2 Fractal</b> .....	<b>19</b>
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	19
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>20</b>
4.1 COMPROVAÇÃO DO MODELO DE DP, ATRAVÉS DE IMUNO-HISTOQUÍMICA, EM ANIMAIS 30 DIAS APÓS A INJEÇÃO DE 6-OHDA NO CPU .....	20
4.2 ANÁLISE DOS ASTRÓCITOS EM ANIMAIS 30 DIAS APÓS A INJEÇÃO DE 6- OHDA NO CPU .....	20
4.3 ANÁLISE DA MICROGLIA.....	23
<b>4.3.1 Análise da esqueletonização</b> .....	<b>23</b>
<b>4.3.2 Análise da fractal</b> .....	<b>27</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>33</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>36</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>36</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1. DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson (DP) é o segundo distúrbio neurológico mais comum no mundo e afeta 1% da população mundial acima dos 65 anos de idade (Percário et al, 2020; Poewe et al, 2017). A DP é caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos ventrolaterais da Substância Negra pars compacta (SNpc) e pelo acúmulo de  $\alpha$ -sinucleína nos neurônios, estando associada a sintomas motores clássicos, como bradicinesia, tremor de repouso, rigidez de movimento, e sintomas motores não clássicos progressivos, como disfunções respiratórias (Falquetto et al, 2020; Fernandes-júnior et al, 2018; Poewe et al, 2017). Segundo Braak e colaboradores (2003), a DP se desenvolve em seis estágios neuropatológicos, sendo que, a neurodegeneração se inicia pela presença de corpos de Lewy na porção caudal do tronco encefálico, mais especificamente no bulbo e, a partir do estágio 3 atinge a SNpc, e conseqüentemente suas projeções para o núcleo putâmen, que determina o início da fase clínica e o aparecimento dos sintomas motores e cognitivos em humanos (Braak et al., 2003).

Para a indução da DP utiliza-se, classicamente, um modelo experimental com injeções bilaterais de 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) no estriado que induz a degeneração de neurônios dopaminérgicos da substância negra (SN), retrogradamente, devido a uma deficiência respiratória mitocondrial e ao estresse oxidativo (Noor et al., 2016). A 6-OHDA é uma neurotoxina catecolaminérgica que é captada nos neurônios catecolaminérgicos através de um transportador de dopamina de alta afinidade, concentrando-se no citoplasma e inibindo os complexos I e IV da cadeia respiratória mitocondrial afetando, portanto, o processo de respiração celular desses neurônios (Krasko et al., 2021; Noor et al., 2016). Ademais, a 6-OHDA é oxidada no interior da célula gerando espécies reativas de oxigênio (EROs), o que afeta a estrutura e o metabolismo celular causando a morte neuronal (Noor et al., 2016). As alterações estruturais e metabólicas que ocorrem devido ao aumento de EROs estimulados pela 6-OHDA, são resultados da disfunção de enzimas mitocondriais, como os complexos I e IV, e de alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial interrompendo a produção de ATP, promovendo uma neurotoxicidade ampliada induzindo a morte celular por apoptose (Iravanpour et al., 2021; Hwang, 2013; Noor et al., 2016). Além disso, a elevação na concentração de EROs provoca a abertura do mPTP (poro de transição da permeabilidade mitocondrial) presente na membrana interna da mitocôndria permitindo a saída de substâncias antioxidantes, como o GSH, diminuindo a capacidade da

mitocôndria de neutralizar o EROs aumentando ainda mais sua produção (Iravanpour et al., 2021).

## 1.2. CONTROLE NEURAL DA RESPIRAÇÃO

Nos mamíferos, a ventilação é um processo modulado por núcleos respiratórios presentes no tronco encefálico, em especial no bulbo, que coordenam a contração rítmica dos músculos regulando o volume pulmonar e a desobstrução das vias aéreas superiores para manter a homeostase (Wu et al., 2017).

O controle da respiração é coordenado por neurônios localizados no bulbo, estes sendo divididos em grupamentos respiratórios dorsal (DRG) e ventral (VRG) (Guyenet; Bayliss, 2015; Wu et al., 2017). Composto o DRG, o núcleo do trato solitário (NTS) processa as informações advindas dos receptores de estiramento pulmonar e dos quimiorreceptores periféricos, detectando alterações de CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> e pH no sangue (Furuya et al., 2014) e informa os núcleos da VRG a fim de alterar o padrão e ritmo respiratório frente alterações da demanda metabólica. Na VRG, o complexo pré-Bötzinger (preBötC) possui neurônios glutamatérgicos excitatórios que participam da geração do ritmo inspiratório (Fernandes-junior et al., 2018; Ikeda et al., 2017; Yuan; Xu; Chen, 2021). O Complexo de Bötzinger (BötC), contém neurônios inibitórios e, é responsável pela expiração passiva pela inibição do preBötC (IKEDA et al., 2017). Os neurônios do preBötC se comunicam com o grupamento respiratório rostral ventral (rVRG), localizado mais caudalmente no VRG, e abriga neurônios pré-motores inspiratórios que enviam eferências para o nervo frênico, permitindo a modulação da atividade diafragmática durante a respiração (Charsar et al., 2019; Fernandes-junior et al., 2018). Na porção caudal do grupo respiratório ventral (cVRG) há a presença de neurônios pré-motores expiratórios (Guyenet; Bayliss, 2015). Na região mais rostral do VRG, os neurônios presentes no núcleo retrotrapezóide (RTN) contêm quimiorreceptores respiratórios centrais, que se comunicam com toda a VRG em resposta a alterações nas concentrações de CO<sub>2</sub> e no pH no sangue arterial (Cleary et al., 2021).

No modelo experimental de 6-OHDA são observados redução no número de neurônios que expressam Phox2b no RTN e NTS aos 30 dias após a indução da DP. A degeneração de neurônios do NTS afeta a função adequada dos reflexos cardiovasculares e a ablação de neurônios phox2b está associada a síndrome de hipoventilação central congênita (CCHS) e alguns dos seus sintomas respiratórios como a apneia central relacionada ao sono e a resposta ventilatória hipercápnica prejudicada

(Fernandes-junior et al., 2018). Ademais, há a diminuição nos receptores de neurocinina 1 (NK1R) no preBötC e rVRG associados a disfunções respiratórias, como alteração do ritmo respiratório, através da diminuição da frequência respiratória e da ventilação minuto basal e frente ao estímulo hipercápnico a partir do 40º dia após a indução ao modelo experimental de DP (Fernandes-junior et al., 2018; Tuppy et al., 2015).

### 1.3. DEGENERAÇÃO NEURONAL NA DOENÇA DE PARKINSON E SUA RELAÇÃO COM O ESTRESSE OXIDATIVO

As espécies reativas de oxigênio são moléculas pró-oxidantes sintetizadas durante o metabolismo do oxigênio (Hendrix et al., 2020). Embora esse processo seja fisiológico e regulado, um desbalanço entre EROS e substâncias antioxidantes provoca um quadro de estresse oxidativo nas células causando danos potenciais no DNA, lipídios e proteínas (Hendrix et al., 2020).

Nas células eucarióticas, há precursores das espécies reativas de oxigênio como a família das oxidases de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato hidrogênio (NADPH) oxidases (NOX) (Vermot et al., 2021). Além disso, homólogos de proteínas da família de óxido de nitrogênio (NOx) foram descritos como enzimas capazes de produzirem íons superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila (Singh et al., 2021). A família NOX possui sete subunidades homólogas de proteínas (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5 e oxidases duplas - Duox1 e Duox2) do complexo enzimático NADPH oxidase, sendo que NOX 1, 2 e 4 são altamente expressas em tecidos cerebrais humanos e responsáveis por induzir a degradação neuronal (Singh et al., 2021).

A NOX2 é uma proteína formada por subunidades citosólicas (p47phox e p67phox) e membranares (gp91 phox e p22phox) presente nas membranas biológicas, que, quando ativas, formam um complexo funcional de NOX capaz de reduzir o oxigênio a ânion superóxido (Ma et al., 2017). Estudos indicam que a ativação da NOX2, presente na microglia, é neurotóxica pela produção de EROs extracelular que danificam neurônio próximos, inclusive os dopaminérgicos da SN, mas também pela iniciação da sinalização redox microglial que amplifica a resposta pró-inflamatória (Surace; Block, 2012).

Estudos realizados por Falquetto e colaboradores, evidenciaram que, nos núcleos respiratórios, o estresse oxidativo no modelo de DP está associado à mobilização de vias de sinalização pró-apoptótica intracelulares, alterando os níveis de Bcl-2 e Bax que são proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas, respectivamente, que comprometem a integridade da membrana mitocondrial liberando citocromo C para o

citossol, aumentando a atividade da caspase-3 e provocando apoptose de neurônios responsáveis pelo controle neural da respiração (Falquetto et al., 2020), mas pouco se sabe no contexto do controle da respiração os mecanismos responsáveis pela neurodegeneração nesses núcleos. Recentemente, um estudo do nosso grupo mostrou que o tratamento com a droga inibidora não seletiva da NOX, apocinina, foi capaz de prevenir a degeneração neuronal nos núcleos respiratórios e consequentemente prevenir o déficit funcional respiratório no modelo de DP (Nascimento et al., 2022).

#### 1.4. AÇÃO DAS CÉLULAS DA GLIA COMO MODELO DE NEUROINFLAMAÇÃO NA DP

Os astrócitos são células da glia presentes no sistema nervoso central (SNC) que modulam a atividade neuronal, fornecendo suporte estrutural e metabólico, facilitando o tráfego e a reciclagem de neurotransmissores (Sheikhbaei et al., 2018). No tronco cerebral de roedores, os astrócitos têm demonstrado desempenhar um papel na quimiorrecepção e modulação da atividade respiratória neuronal, incluindo na geração do ritmo respiratório pelo complexo preBötC (Sheikhbaei et al., 2018).

Mudanças na pressão parcial de CO<sub>2</sub> (pCO<sub>2</sub>) e no pH são monitoradas por uma sofisticada rede de neurônios no RTN que modulam a ventilação, nomeados quimiorreceptores centrais (Kasymov et al., 2013). Entretanto, há evidências que a resposta do RTN às alterações no pH é mediada pelos estímulos quimiossensoriais dos astrócitos na mesma região (Turovsky et al., 2016). Experimentos conduzidos em ratos anestesiados e ventilados mecanicamente demonstraram que os astrócitos que estão localizados na região do RTN respondem a diminuições no pH com elevações robustas na concentração de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) intracelular desencadeando a liberação vesicular de ATP e ativando os neurônios do RTN, além de também possuírem mecanismo de detecção direta de CO<sub>2</sub> (MARINA et al., 2018). E dessa forma, os astrócitos diferentemente de outras regiões encefálicas, na região dos núcleos respiratórios como RTN e preBötC possuem importante função quimiorreceptora, os quais são estimulados frente ao aumento do CO<sub>2</sub> e queda do pH, liberando ATP que estimulou os neurônios da coluna respiratória, contribuindo para o aumento da atividade respiratória (Gourine et al., 2010).

Os astrócitos reativos liberam diversas quimiocinas e citocinas, como interleucina-1 β (IL-1β) e fator de necrose tumoral-α (TNFα), que são neurotóxicos e contribuem para o desenvolvimento da DP (Kam et al., 2020). Além disso, a microglia ativada, presente na DP, induz astrócitos reativos A1 que secretam uma neurotoxina

que induz a morte rápida de neurônios e oligodendrócitos, além de perderem muitas funções características dos astrócitos (Liddel et al., 2017).

Além dos astrócitos, as células microgliais também pertencem as células da glia e estão presentes no SNC (Rodríguez-gómez et al., 2020). A microglia é composta por células imunes residentes do tecido nervoso responsáveis por manter a homeostase em resposta a um estímulo deletério (RODRÍGUEZ-GÓMEZ et al., 2020). A resposta inflamatória aguda da microglia é um mecanismo de defesa necessário contra células próximas que estão infectadas ou danificadas, possibilitando a destruição de neurônios deteriorados e agregados neurotóxicos (RODRÍGUEZ-GÓMEZ et al., 2020). Entretanto, se essa resposta se tornar prolongada ou crônica pode agravar a neurodegeneração (Rodríguez-gómez et al., 2020).

Quando a microglia está ativada, situação encontrada na DP, ela apresenta alterações morfológicas formando células de-ramificadas e ameboides (Paasila et al., 2019). Além disso, ao reconhecer algum sinal deletério de origem endógena ou exógena pelos receptores de reconhecimento de padrões (RRPs), essas células desencadeiam uma cascata de sinalização que resulta na formação de fatores inflamatórios, como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , ciclooxigenase-2 (COX2), óxido nítrico sintase 2 (iNOS) e EROS, (Rodríguez-gómez et al., 2020). Essas moléculas inflamatórias ativam proteínas, como NADPH oxidases, que resultam na formação de EROs favorecendo a degeneração de neurônios dopaminérgicos na SN, contribuindo para a patogênese da DP (Tiwari; Pal, 2017; Walker et al., 2019).

## 2 OBJETIVO

Avaliar as alterações nas células da glia nos núcleos respiratórios no modelo animal de doença de Parkinson e se frente ao tratamento do inibidor não específico da NOX, apocinina é possível prevenir o dano respiratório.

Objetivos específicos:

- 1) Avaliar as células da glia frente à injúria causada pelo modelo 6-OHDA de DP nos núcleos respiratórios NTS, rVRG, preBotC e RTN.
- 2) Avaliar as células da glia no modelo de DP nos núcleos respiratórios NTS, rVRG, preBotC e RTN frente ao tratamento com apocinina.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizados ratos Wistar, adultos (n=32), 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 individuais 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 submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo (nº 2740200319).

### 3.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS – LESÕES QUÍMICAS DA SN

Em todos os procedimentos cirúrgicos foram utilizados métodos assépticos para evitar os riscos de infecções. Os animais foram, inicialmente, anestesiados intraperitonealmente (i.p.) com cetamina (100 mg/kg) e xilasina (7 mg/kg) e adaptados a um aparelho estereotáxico Kopf (Modelo 1760). Após uma incisão longitudinal na pele e no tecido subcutâneo para a exposição da calota craniana, o bregma foi utilizado como referência para medida de onde foram feitas as injeções bilaterais.

As injeções bilaterais (volume de 1 µl/injeção) de 6-OHDA dissolvida em salina (NaCl 0,9%) + 0,3% de ácido ascórbico (veículo) foram realizadas utilizando uma seringa Hamilton (10 µl) conectada a um polietileno (PE-10) e a uma injetora a fim de alcançar a região do corpo estriado (CPu). Após as injeções da toxina, as peles das 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 a 40 dias após a cirurgia no biotério.

### 3.3 INJEÇÕES CEREBRAIS

As injeções foram bilaterais e realizadas 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 e;
- 2) 3,2 mm lateral à linha média, 0,5 mm rostral ao bregma e 4,5 mm ventral à dura-máter.

### 3.4 FÁRMACOS UTILIZADOS

Os fármacos que foram utilizados são:

1) 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) (Hydrochloride-H4381– Sigma®, Saint Louis, MO, USA): toxina que não cruza a barreira hematoencefálica e deve ser administrada estereotóxicamente no próprio corpo estriado (CPu) bilateralmente para efetuar uma lesão retrógrada dos neurônios nigro-estriatais (24 µg/µl) (BLUM et al, 2001). A 6-OHDA será dissolvida em salina (NaCl 0,9%) + 0,3% de ácido ascórbico para diminuir a oxidação da droga. Foram realizadas 2 injeções por lado e o volume injetado será de 1/µl por injeção.

2) Apocinina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA): componente orgânico natural utilizado amplamente como inibidor da Nox por meio da prevenção da translocação das subunidades citosólicas para a subunidade gp91phox da membrana plasmática. Dessa forma leva à inibição da ativação do complexo catalítico da Nox, e conseqüentemente, da formação de superóxidos. Foi administrada na água de beber na dose de 50

mg/kg/dia, após 20 dias da injeção de 6-OHDA, por um período de 10 dias (Hernandes et al., 2013 e 2010).

### 3.5 TRATAMENTO CONTRA ESTRESSE OXIDATIVO – APOCININA

Após injeções cerebrais, os animais foram divididos em 4 grupos: 6-OHDA, veículo, 6-OHDA tratado, veículo tratado. Para o tratamento, os animais tiveram adicionados à água de beber a apocinina (50 mg/kg/dia) a partir do 20º dia após a injeção da 6-OHDA ou veículo no CPu, por um período de 10 dias. A cada 4 dias foram avaliados os volumes de água ingeridos pelos animais e seus pesos. Assim, aos 30 dias de injeção da 6-OHDA ou veículo os animais foram eutanasiados para posteriores análises.

### 3.6 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os animais foram profundamente anestesiados com pentobarbital de sódio (60 mg/kg, i.p.), sob prévia injeção de lidocaína (5mg/kg, i.p.), 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 encéfalos foram retirados e guardados nesse fixador por 4 horas a 4 °C. Após o período de fixação, o material será transferido para uma solução contendo sacarose a 20 % em PBS para crioproteção. Após 24 horas, os encéfalos foram cortados em microtômo numa espessura de 40 µm 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 imunohistoquímico (SCHREIHOFFER e GUYENET, 1997).

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 (BARNA et al., 2012, TUPPY et al., 2015) com anticorpo específico anti-tirosina-hidroxilase (TH) (1:1000, Chemicon, Temecula, CA, USA) para detecção da enzima limitante da síntese de dopamina feito em camundongo seguido do anticorpo secundário biotilado anti-camundongo feito em burro (1:500, Jackson, West Grove, PA, USA).

Para avaliação da glia nos núcleos respiratórios (NTSc, NTSi, rVRG, preBotC e RTN) serão detectadas, por peroxidase, duas diferentes proteínas, sendo elas: GFAP (coelho anti-GFAP; AB5804; Millipore; 1:1200) e Iba1 (coelho anti-Iba1; 019-19741; Wako; 1:2000) seguidos do anticorpo secundário biotilado anti-coelho feito em burro (1:500, Jackson, West Grove, PA, USA).

A GFAP é o principal filamento intermediário que está presente no citoesqueleto de astrócitos. Essas proteínas garantem a integridade e resiliência astrocitária,

compondo uma rede de filamentos intermediários no citoplasma, estando presentes em toda a extensão da célula, desde a região perinuclear até a sua periferia. Além disso, sabe-se que os astrócitos expressam dez diferentes isoformas de GFAP e que esta proteína está superexpressa em astrócitos reativos. Sendo assim, essas proteínas são classicamente utilizadas como marcadores de astrócitos (Brenner, 2014; Hol e Pekny, 2015; Middeldorp e Hol, 2011; Quinlan et al., 2007).

A Iba1 (molécula ionizada adaptadora da ligação de cálcio 1) é uma proteína ligante de actina cruzada especificamente expressa em membranas de macrófagos e microglias e é regulada positivamente quando estes estão ativos (Sasaki et al., 2001). Além disso, por estar distribuída ao longo de todo o citoplasma destas células, incluindo suas ramificações, a Iba1 é considerada um bom marcador para a realização de análises morfológicas da microglias e macrófagos (Sasaki et al., 2011).

Finalmente, os cortes encefálicos foram montados em sequência caudo-rostral em lâminas que foram desidratadas com álcool e xilol e cobertas com D.P.X (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). A imunorreatividade foi analisada em microscópio de campo claro, conforme proteína avaliada, e para análise quantitativa capturamos imagens digitais dos cortes selecionados para cada grupo para a contagem do número de neurônios para os tratamentos imuno-histoquímicos para TH. As quantificações dos astrócitos por densidade foram realizadas com o programa ImageJ (programa de domínio público disponibilizado pelo NIH; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). A quantificação de células da microglia e a análise morfológica destas células foram feitas utilizando o mesmo software por meio dos plug-in AnalyzeSkeleton e FracLac. Os parâmetros analisados foram: o número de células da microglia, a quantidade de pontos de ramificação, a quantidade de ramos, densidade, a razão da amplitude, circularidade, dimensão do fractal e a lacunaridade (Morrison et al., 2017). Toda a nomenclatura anatômica foi baseada no Atlas de Paxinos e Watson (Paxinos e Watson, 1998). A quantificação foi feita em 5 cortes da SN, 4 cortes do RTN, 4 cortes do NTS, 2 cortes do pré-Botzinger e 2 cortes do rVRG.

### 3.7 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA MICROGLIA

#### 3.7.1 Esqueletonização

Uma alteração na ramificação das células da microglia indica ativação celular em resposta a um estado fisiológico alterado, promovendo a ativação de moléculas neurotóxicas que resultam na formação de EROs favorecendo a neurodegeneração e contribuindo para a patogênese da DP (MORRISON et al., 2017; YOUNG; MORRISON, 2018). Para análises de esqueletonização é utilizado o software ImageJ, por meio do

plug-in FFT Bandpass que remove ruídos das imagens, como rachaduras do tecido que podem aparecer e dificultar a análise do esqueleto, além disso outros plug-in apropriados, como nitidez e fechamento, foram utilizados antes de converter todas as fotomicrografias em imagens binárias e esqueletizadas. Com as imagens esqueletizadas, o plug-in Analyze Skeleton é aplicado a fotomicrografia e marca as características do esqueleto relevantes para a ramificação da microglia: comprimento de ramificação e endpoints voxels, esses dados são utilizados como medida da morfologia da microglia (Morrison et al., 2017; Young; Morrison, 2018).

### 3.7.2 Fractal

A análise fractal é uma medida da complexidade da microglia, que quantifica o contorno de cada célula delimitado pelos terminais e comprimentos do processo, a densidade e a razão de amplitude (MORRISON et al., 2017; YOUNG; MORRISON, 2018). No software ImageJ, primeiramente as micróglia individuais são tornadas binárias em um processo semelhante ao utilizado na esqueletonização, em seguida as imagens binárias são convertidas em contornos. Utilizando o plug-in FracLac, são obtidas medidas para analisar o casco convexo e o círculo delimitador da célula que fornecem dados de amplitude e densidade. A amplitude indica a forma da célula e é a relação entre o comprimento mais longo da elipse do casco convexo e a largura mais longa. Já a densidade indica o tamanho da célula e é a razão do número de pixels englobados pelo contorno da célula para a área (em pixels) do casco convexo. Ademais, a análise fractal é calculada pelo plug-in usando um protocolo de plotagem de caixa que determina a quantidade de detalhes de pixel com escala crescente (Morrison et al., 2017; Young; Morrison, 2018).

## 3.8 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 como média  $\pm$  desvio padrão da média. ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni foram utilizados para a comparação das médias dos grupos. O índice de significância foi fixado em  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

#### 4.1 COMPROVAÇÃO DO MODELO DE DP, ATRAVÉS DE IMUNO-HISTOQUÍMICA, EM ANIMAIS 30 DIAS APÓS A INJEÇÃO DE 6-OHDA NO CPU

Através da quantificação dos neurônios catecolaminérgicos na SN, 30 dias após a indução de DP por injeções bilaterais de 6-OHDA, foi possível avaliar, através da expressão de TH, a neurodegeneração dos grupos 6-OHDA comparado ao grupo veículo (6-OHDA:  $21,5 \pm 9,5$  vs. veículo:  $102,5 \pm 11,91$  neurônios,  $F_{1,18}=112,1$ ;  $p<0,0001$ ) (Fig. 1A-E). Ainda, não houve regeneração dos neurônios TH<sup>+</sup> nos grupos de animais tratados com apocinina (6-OHDA + APO:  $51 \pm 13,6$  vs. 6-OHDA:  $21,5 \pm 9,5$  neurônios,  $F_{1,18}= 15,83$ ;  $p=0,0730$ ) (Fig. 1 A-E), o que era esperado, visto que o objetivo não era de impedir a neurodegeneração da SNpc induzida por 6-OHDA.

**Figura 1 - Quantificação de neurônios TH na SNpc após 30 dias de lesão.**

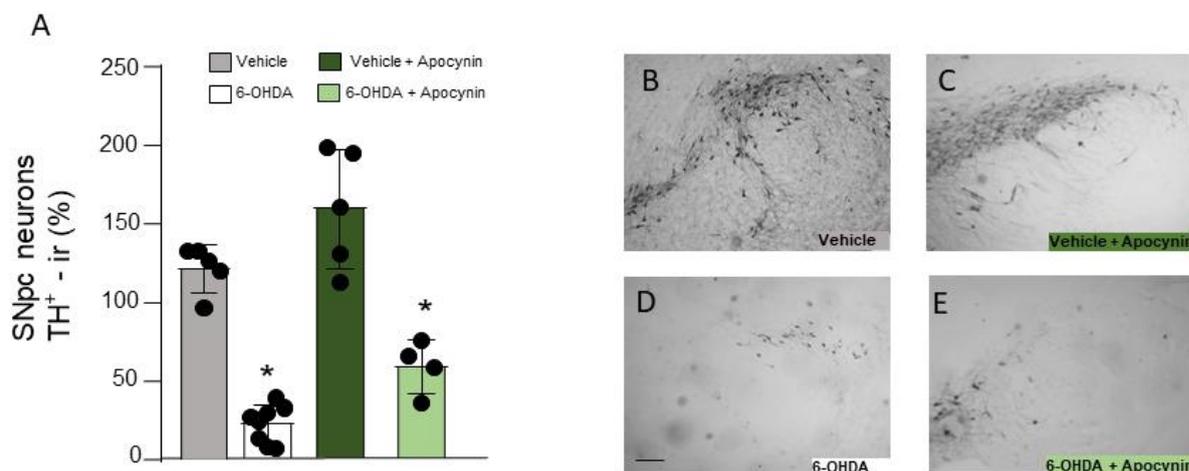


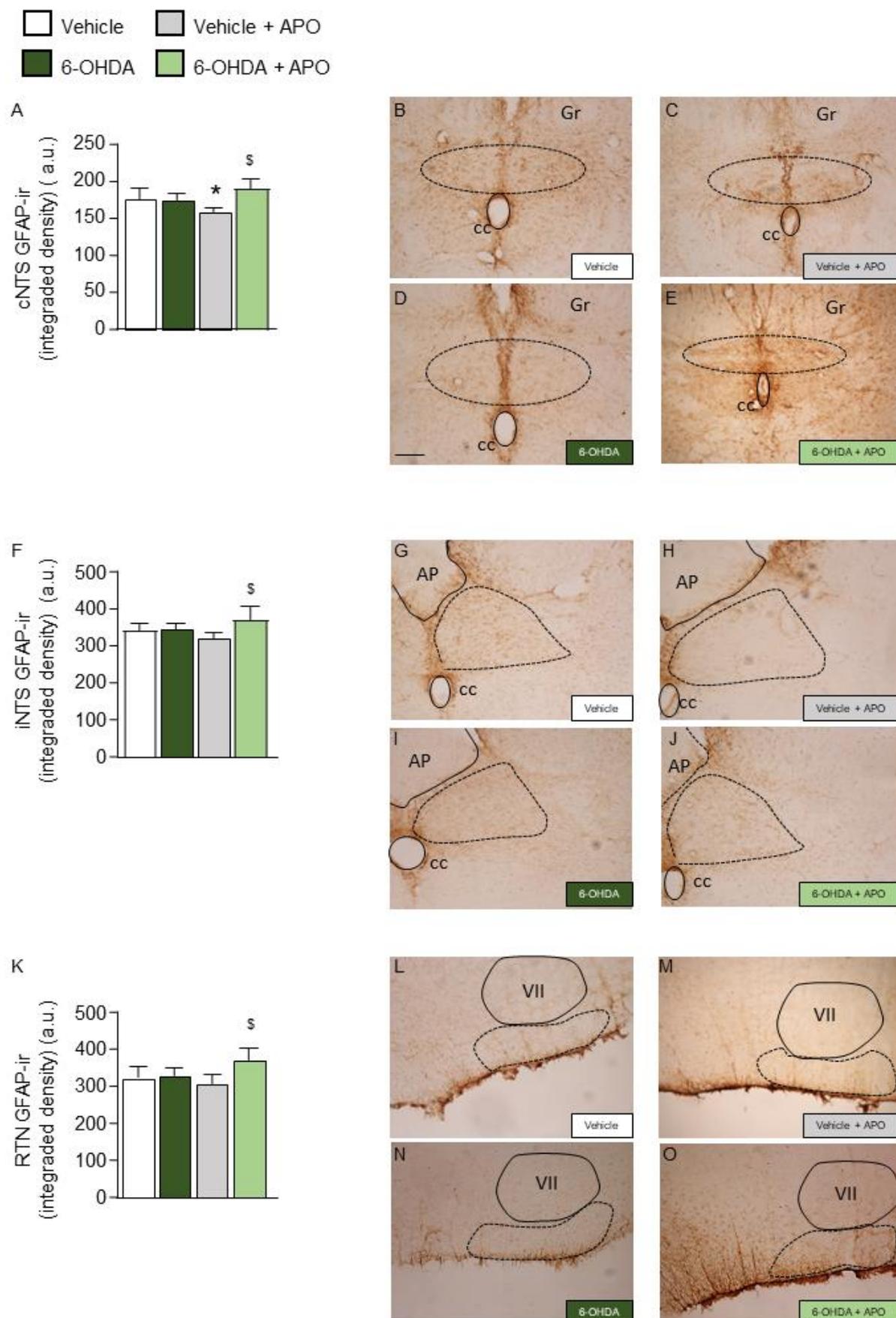
Gráfico representativo das contagens dos neurônios TH<sup>+</sup> dos grupos de animais veículo e 6-OHDA tratados e não tratados com apocinina. Fotomicrografias representativas da imunorreatividade de TH na SNpc nos grupos B) veículo, C) veículo tratado com apocinina, D) 6-OHDA e E) 6-OHDA tratado com apocinina. Escala em E = 200 μm (se aplica a B-D). N=4-8/grupo; \* diferente de veículo (Two-way ANOVA,  $p<0,05$ ).

#### 4.2 ANÁLISE DOS ASTRÓCITOS EM ANIMAIS 30 DIAS APÓS A INJEÇÃO DE 6-OHDA NO CPU

A análise dos astrócitos foi feita a partir da marcação das células com ensaio de imuno-histoquímica com peroxidase para GFAP, e as imagens foram capturadas em microscópio de campo claro. Não foi observado diferença significativa nos animais induzidos com 6-OHDA, em relação ao grupo controle, nos núcleos respiratórios após 30 dias da injeção de 6-OHDA, incluindo o NTSc (6-OHDA:  $174,75 \pm 8,26$  vs. veículo:  $176,78 \pm 14$  densidade integrada/área;  $F_{(1,19)}= 12,22$ ;  $p>0,9999$ ) (Fig. 2A-E), NTSi (6-

OHDA:  $347,24 \pm 12,12$  vs. veículo:  $343,56 \pm 16,49$  densidade integrada/área;  $F_{(1,19)} = 10,87$ ;  $p > 0,9999$ ) (Fig. 2F-J), RTN (6-OHDA:  $329,26 \pm 21,88$  vs. veículo:  $323,69 \pm 29,49$  densidade integrada/área;  $F_{(1,18)} = 8,591$   $p > 0,9999$ ) (Fig. 2K-O), rVRG (6-OHDA:  $373,24 \pm 24,42$  vs. veículo:  $344,91 \pm 35,55$  densidade integrada/área;  $F_{(1,19)} = 1,92$ ;  $p = 0,5098$ ) (Fig. 3A-E) e preBötC (6-OHDA:  $377,02 \pm 25,06$  vs. veículo:  $354,27 \pm 15,80$  densidade integrada/área;  $F_{(1,19)} = 3,001$ ;  $p > 0,9999$ ) (Fig. 3F-J). Entretanto, os animais tratados com o inibidor inespecífico da NADPH oxidase, apocinina, obtiveram um aumento dos astrócitos (astroglíose) no grupo 6-OHDA em relação ao tratamento no grupo veículo, do NTSc (6-OHDA + APO:  $190,82 \pm 11,54$  vs. veículo + APO:  $158,76 \pm 5,43$  densidade integrada/área;  $F_{(1,19)} = 15,76$ ;  $p = 0,0003$ ) (Fig. 2A-E), NTSi (6-OHDA + APO:  $373,29 \pm 34,96$  vs. veículo + APO:  $320,46 \pm 14,05$  densidade integrada/área;  $F_{(1,19)} = 8,221$ ;  $p = 0,0025$ ) (Fig. 2F-J) e RTN (6-OHDA + APO:  $369,80 \pm 32,45$  vs. veículo + APO:  $307,09 \pm 23,82$  densidade integrada/área;  $F_{(1,18)} = 6,018$ ;  $p = 0,0077$ ) (Fig. 2K-O). O tratamento com apocinina não alterou os resultados nos núcleos rVRG (6-OHDA + APO:  $366,17 \pm 28,84$  vs. veículo + APO:  $363,15 \pm 15,60$  densidade integrada/área;  $F_{(1,19)} = 1,254$ ;  $p > 0,9999$ ) (Fig. 3A-E) e preBötC (6-OHDA + APO:  $370,89 \pm 41,62$  vs. veículo + APO:  $343,79 \pm 47,23$  densidade integrada/área;  $F_{(1,19)} = 0,02290$ ;  $p > 0,9999$ ) (Fig. 3F-J).

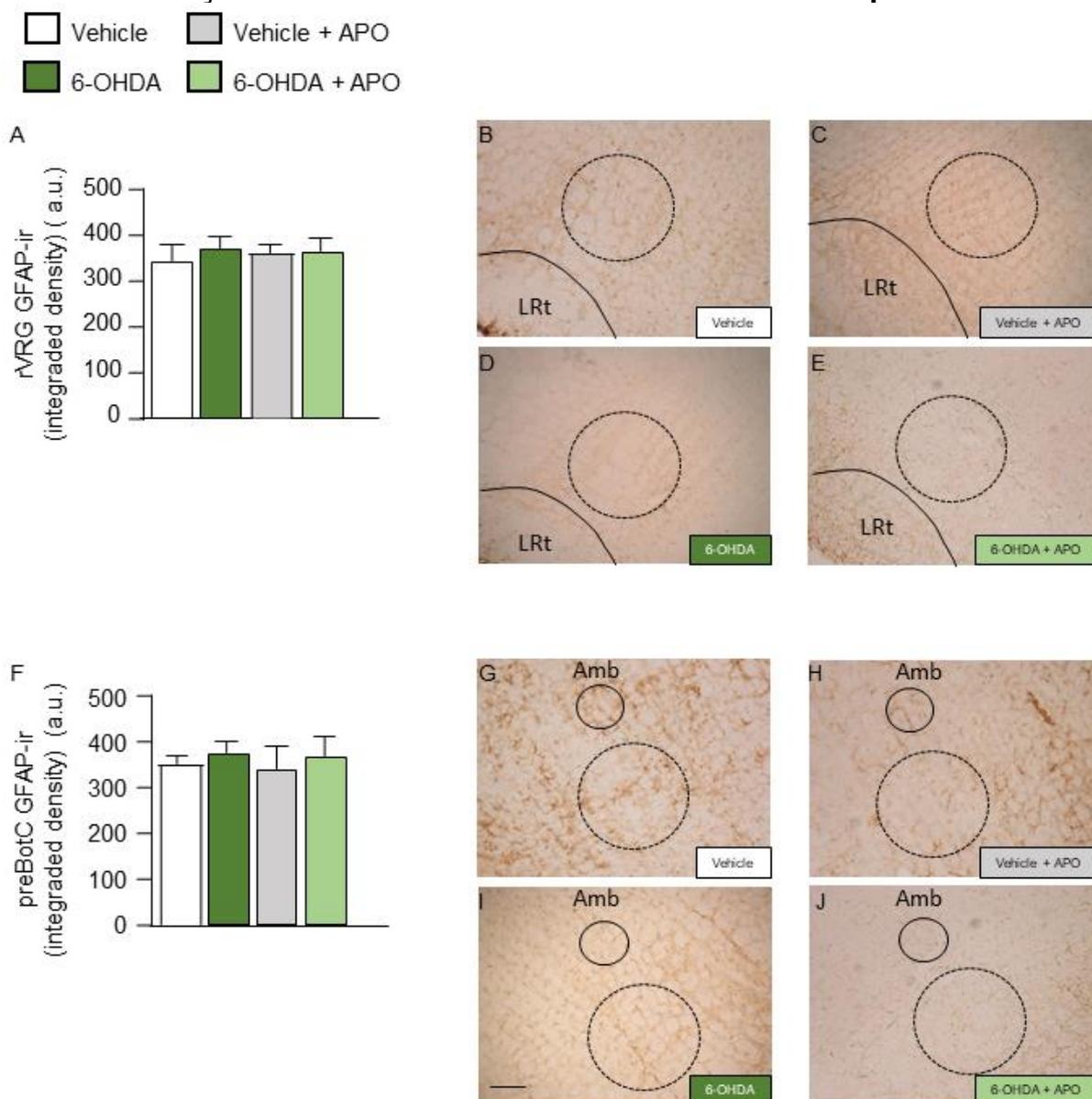
**Figura 2 - Análise dos astrócitos nos núcleos respiratórios NTS e RTN após 30 dias da indução do modelo do modelo de DP frente o tratamento com apocinina.**



A, F e K) Gráfico da densidade integrada pela área de células marcadas por GFAP no NTSc, NTSi e RTN, respectivamente. B-E, G-J, L-O) Fotomicrografias representativas da marcação com GFAP nos grupos veículo, veículo + APO, 6-OHDA e 6-OHDA + APO no NTSc, NTSi e RTN, respectivamente. Escala em

D=200 $\mu$ m. n=5-6, p<0,05; \* diferente do veículo, \$ diferente do veículo + APO (two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni).

**Figura 3 - Análise dos astrócitos nos núcleos respiratórios rVRG e PreBotC após 30 dias da indução do modelo de DP frente o tratamento com apocinina.**



A e F) Gráfico da densidade integrada pela área de células marcadas por GFAP no rVRG e preBotC, respectivamente. B-E, G-J) Fotomicrografias representativas da marcação com GFAP nos grupos veículo, veículo + APO, 6-OHDA e 6-OHDA + APO no rVRG e preBotC, respectivamente. Escala em l=200 $\mu$ m. n=5-6.

### 4.3 ANÁLISE DA MICROGLIA

A análise morfológica da microglia foi feita a partir da marcação das células com ensaio de imunohistoquímica com peroxidase para Iba, e as imagens foram capturadas em microscópio de campo claro.

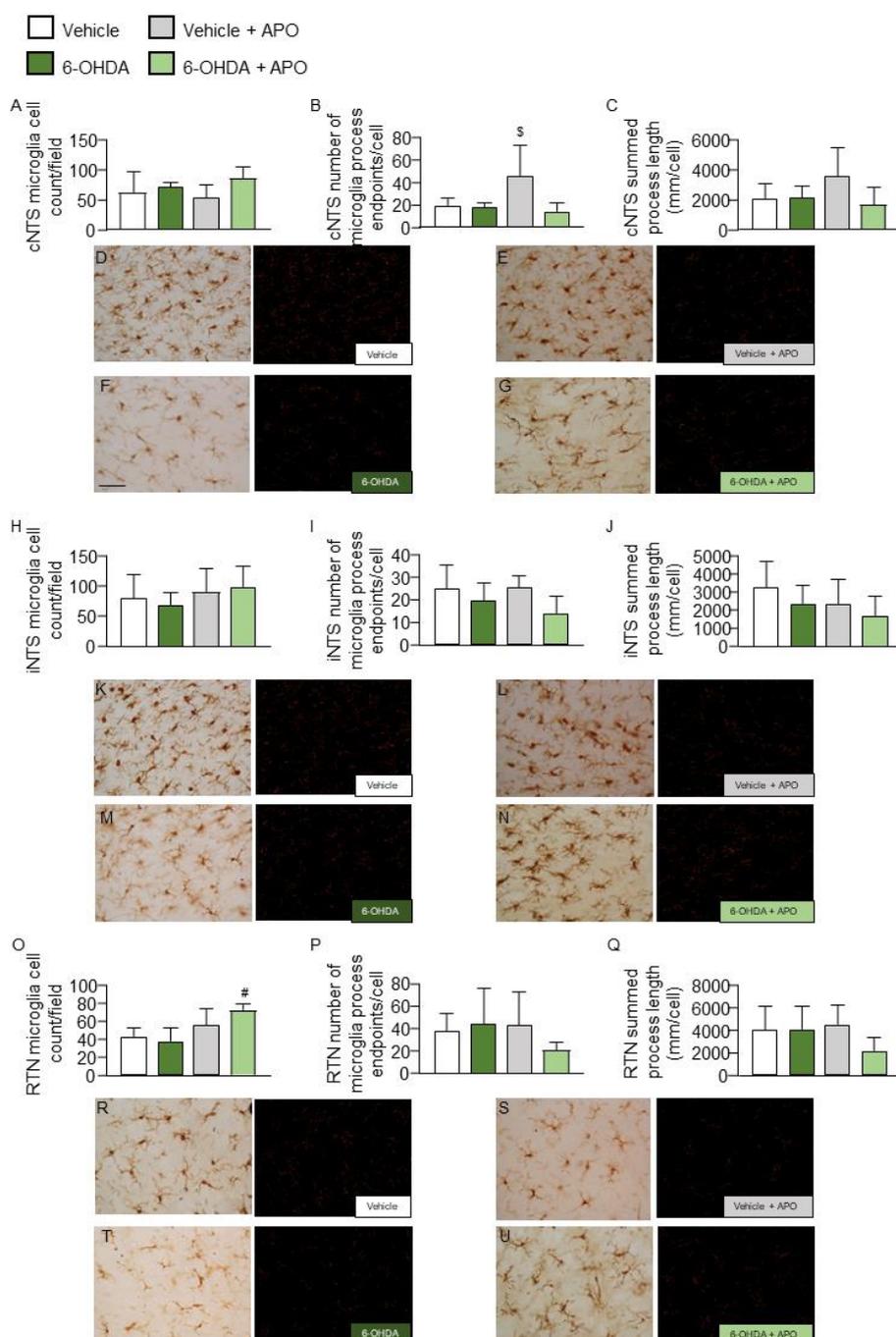
#### 4.3.1 Análise da eskeletonização

Nos grupos após 30 dias da injeção de 6-OHDA ou veículo no CPu não foi observado alterações na ativação da microglia, pelo número de prolongamentos (end points) e tamanho dos mesmos em micrômetros (branches) no NTSc (NTSc end points: 6-OHDA:  $17,70 \pm 4,19$  vs. veículo:  $19,48 \pm 6,87$ ;  $F(1,16)=6,388$ ;  $p>0,9999$  (Fig. 4C-G); NTSc branches: 6-OHDA:  $2134,18 \pm 787,94$  vs. veículo:  $2085,59 \pm 1011,64$ ;  $F(1,16)=2,690$ ;  $p>0,9999$  (Fig. 4B-G)), NTSi (NTSi end points: 6-OHDA:  $19,39 \pm 7,90$  vs. veículo:  $25,11 \pm 10,27$ ;  $F(1,16)=5,639$ ;  $p>0,9999$ , 6-OHDA + APO:  $13,65 \pm 7,60$  vs. veículo + APO:  $25,38 \pm 5,28$ ;  $F(1,16)=0,6694$ ,  $p=0,2195$  (Fig. 4I-N); NTSi branches: 6-OHDA:  $2377,19 \pm 1023,17$  vs. veículo:  $3258,31 \pm 1434,45$ ;  $F(1,16)=1,786$ ,  $p>0,9999$ , 6-OHDA + APO:  $1709,81 \pm 1065,75$  vs. veículo + APO:  $2351,67 \pm 1366,74$ ;  $F(1,16)=0,04408$ ;  $p>0,9999$  (Fig. 4J-N)), rVRG (rVRG end points: 6-OHDA:  $21,83 \pm 6,33$  vs. veículo:  $35,60 \pm 36,77$ ;  $F(1,15)=1,889$ ;  $p>0,9999$ , 6-OHDA + APO:  $17,23 \pm 9,65$  vs. veículo + APO:  $28,92 \pm 6,17$ ;  $F(1,15)=0,01258$ ,  $p>0,9999$  (Fig. 5B-G); rVRG branches: 6-OHDA:  $2363,92 \pm 1100,46$  vs. veículo:  $3970,69 \pm 4901,42$ ;  $F(1,15)=1,428$ ;  $p>0,9999$ , 6-OHDA + APO:  $2130,65 \pm 1415,41$  vs. veículo + APO:  $3559,53 \pm 1235,81$ ;  $F(1,15)=0,004905$ ;  $p>0,9999$  (Fig. 5C-G)), preBötC (preBötC end points: 6-OHDA:  $26,91 \pm 5,16$  vs. veículo:  $35,30 \pm 24,42$ ;  $F(1,16)=3,435$ ;  $p>0,9999$ , 6-OHDA + APO:  $19,09 \pm 10,78$  vs. veículo + APO:  $38,61 \pm 15,11$ ;  $F(1,16)=0,5469$ ,  $p=0,4950$  (Fig. 5I-N); preBötC branches: 6-OHDA:  $2953,13 \pm 1023,17$  vs. veículo:  $3258,31 \pm 1434,45$ ;  $F(1,16)=1,786$ ;  $p>0,9999$ , 6-OHDA + APO:  $2435,32 \pm 1617,86$  vs. veículo + APO:  $4446,51 \pm 1176,10$ ;  $F(1,16)=0,1910$ ;  $p=0,7705$  (Fig. 5J-N)) e RTN (RTN end points: 6-OHDA:  $44,26 \pm 31,32$  vs. veículo:  $37,74 \pm 16,00$ ;  $F(1,16)=0,6233$ ;  $p>0,9999$ , 6-OHDA + APO:  $20,43 \pm 7,48$  vs. veículo + APO:  $42,90 \pm 29,75$ ;  $F(1,16)=2,060$ ,  $p=0,7890$  (Fig. 4O-U); RTN branches: 6-OHDA:  $4064,975 \pm 2044,78$  vs. veículo:  $4013,01 \pm 2116,62$ ;  $F(1,16)=1,938$ ;  $p>0,9999$ , 6-OHDA + APO:  $2164,751 \pm 1174,89$  vs. veículo + APO:  $4500,17 \pm 1749,79$ ;  $F(1,16)=2,118$ ;  $p=0,3530$  (Fig. 4O-U)). Após o tratamento com apocinina, houve diferença estatística apenas no número de prolongamentos no NTSc no grupo veículo em relação ao grupo 6-OHDA tratado (NTSc end points: 6-OHDA + APO:  $13,86 \pm 8,12$  vs. veículo + APO:  $45,84 \pm 27,12$ ;  $F(1,16)=5,110$ ;  $p=0,0210$  (Fig. 4B-G)).

Não foi observado alteração no total de células nos núcleos respiratórios estudados (NTSc: veículo:  $62 \pm 34,55$ ; 6-OHDA:  $71,25 \pm 8,05$ ; veículo + APO:  $52,8 \pm 21,93$ ; 6-OHDA + APO:  $85,2 \pm 18,51$ ;  $F(1,16)=1,110$ ;  $p=0,3078$  (Fig. 4A-G); NTSi: veículo:  $80 \pm 39,46$ ; 6-OHDA:  $68,5 \pm 21,01$ ; veículo + APO:  $89,6 \pm 39,51$ ; 6-OHDA + APO:  $98,6 \pm 35,67$ ;  $F(1,16)=0,4027$ ;  $p=0,5347$  (Fig. 4H-N), rVRG: veículo:  $38,2 \pm 16,48$ ; 6-OHDA:  $45,25 \pm 2,8$ ; veículo + APO:  $41 \pm 8,60$ ; 6-OHDA + APO:  $42,6 \pm 10,89$ ;  $F(1,15)=0,2784$ ,  $p=0,6055$  (Fig. 5A-G) e preBötC: veículo:  $45,5 \pm 8,04$ ; 6-OHDA:  $34 \pm$

6,05; veículo + APO:  $36,4 \pm 11,86$ ; 6-OHDA + APO:  $39,4 \pm 8,11$ ;  $F(1,16)=3,269$ ;  $p=0,0894$  (Fig. 5H-N). Porém, no RTN, o tratamento com apocinina resultou em aumento no número de células (veículo:  $42,83 \pm 9,10$ ; 6-OHDA:  $37,5 \pm 15,32$ ; veículo + APO:  $55,6 \pm 17,61$ ; 6-OHDA + APO:  $72 \pm 7,38$ ;  $F(1,16)=3,588$ ;  $p=0,0056$  (Fig. 4O-U)).

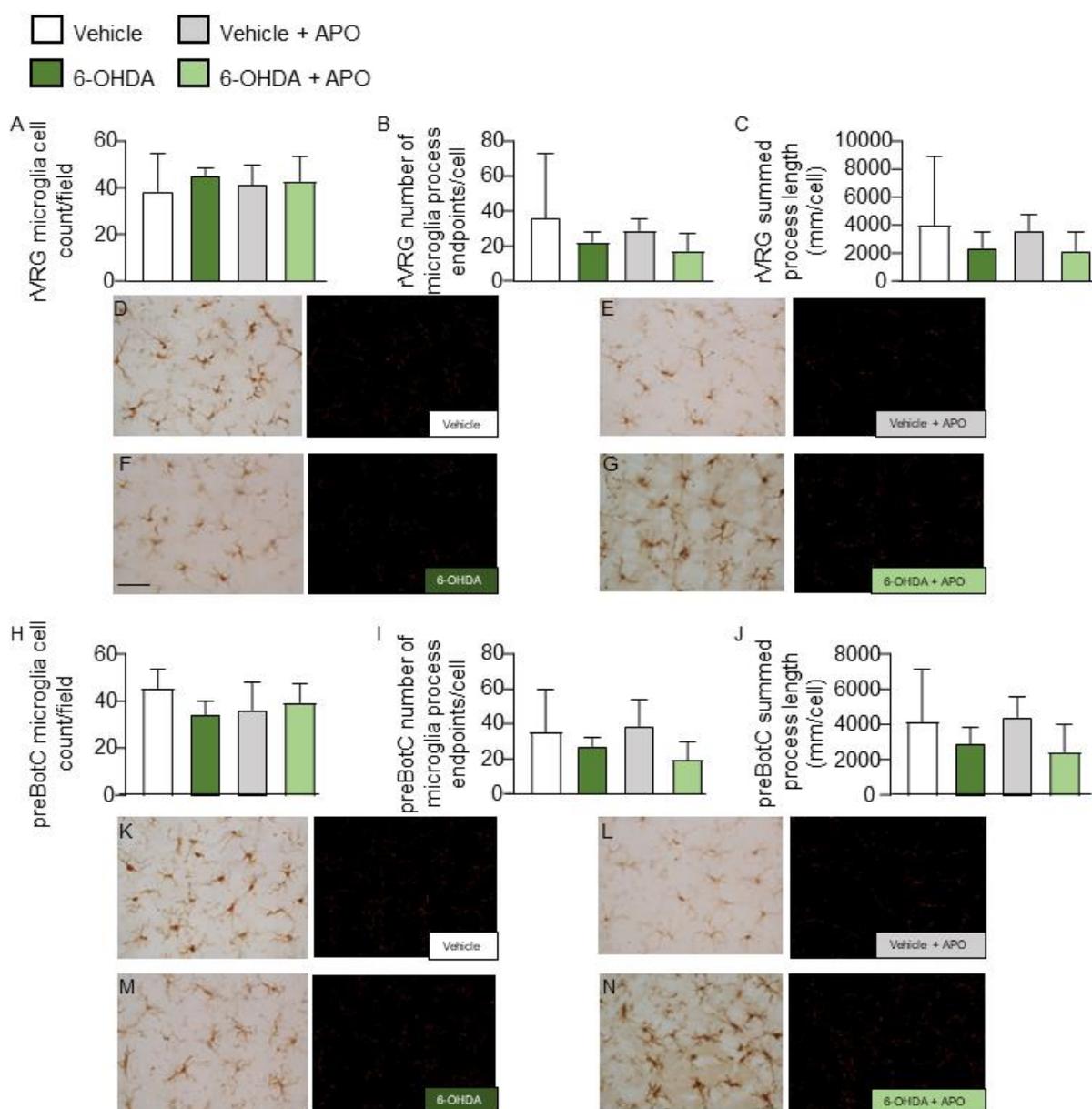
**Figura 4 - Análise da esqueletonização da morfologia da micróglia nos núcleos respiratórios NTS e RTN após 30 dias da indução do modelo de DP frente o tratamento com apocinina.**



A, H e O) Gráfico do total de células da micróglia no NTSc, NTSi e RTN, respectivamente. B, I e P) Gráfico do número de prolongamentos da micróglia no NTSc, NTSi e RTN, respectivamente. C, J e Q) Gráfico do tamanho dos prolongamentos da micróglia no NTSc, NTSi e RTN, respectivamente. D-G, K-N, R-U)

Fotomicrografias representativas da marcação com Iba1 e análise da eskeletonização nos grupos veículo, veículo + APO, 6-OHDA e 6-OHDA + APO no NTSc, NTSi e RTN, respectivamente. Escala em F=50µm. \$ diferente do 6-OHDA + APO e # diferente do 6-OHDA,  $p < 0,05$  (two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni).

**Figura 8 - Análise da eskeletonização da morfologia da micróglia nos núcleos respiratórios preBotC e rVRG após 30 dias da indução do modelo de DP frente o tratamento com apocinina.**

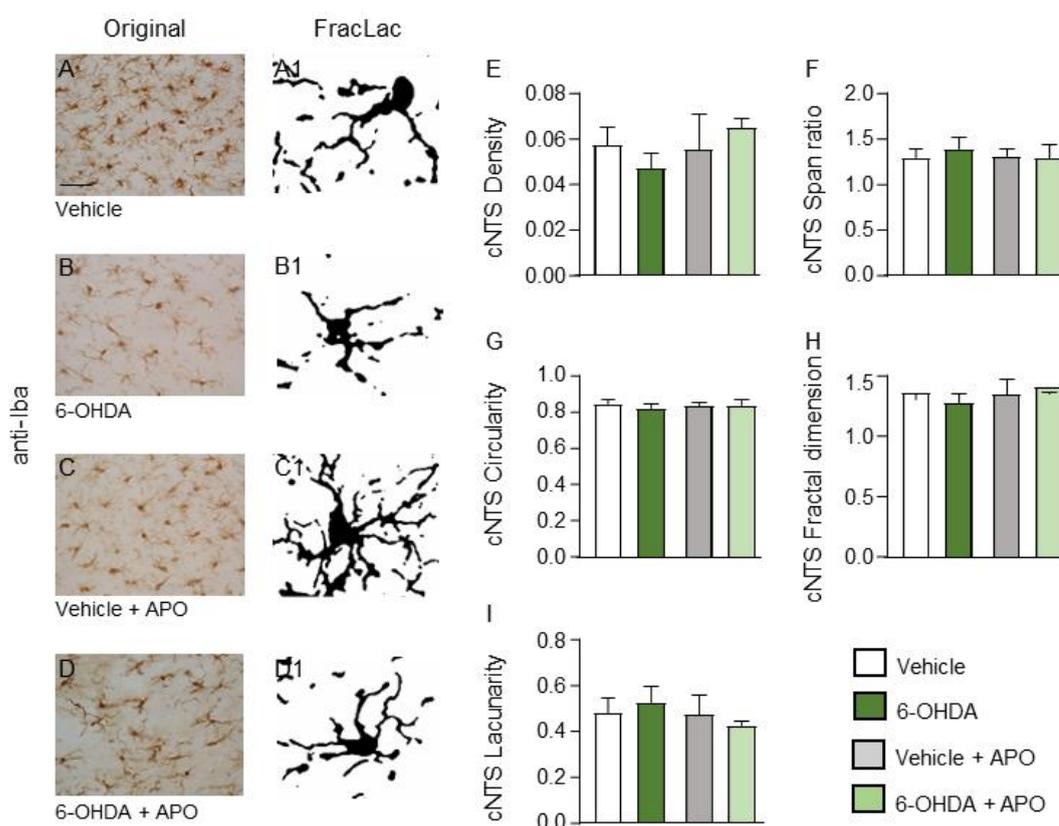


A e H) Gráfico do total de células da micróglia no preBotC e rVRG, respectivamente. B e I) Gráfico do número de prolongamentos da micróglia no preBotC e rVRG, respectivamente. C e J) Gráfico do tamanho dos prolongamentos da micróglia no preBotC e rVRG, respectivamente. D-G e K-N) Fotomicrografias representativas da marcação com Iba1 e análise da eskeletonização nos grupos veículo, veículo + APO, 6-OHDA e 6-OHDA + APO no preBotC e rVRG, respectivamente. Escala em F=50µm.

### 4.3.2 Análise de fractal.

Em relação a análise fractal da microglia, após 30 dias da indução do modelo de DP, no núcleo NTSc não foi possível observar alterações nos parâmetros avaliados em nenhum dos grupos experimentais (densidade/tamanho: veículo:  $0,057 \pm 0,008$ , 6-OHDA:  $0,047 \pm 0,006$ , veículo + APO:  $0,055 \pm 0,015$  e 6-OHDA + APO:  $0,065 \pm 0,004$ ;  $F(1,15)= 4,457$ ,  $P=0,0519$ ; span ratio/alongamento: veículo:  $1,29 \pm 0,09$ , 6-OHDA:  $1,39 \pm 0,11$ , veículo + APO:  $1,30 \pm 0,08$  e 6-OHDA + APO:  $1,29 \pm 0,14$ ;  $F(1,15)= 1,308$ ,  $p= 0,2707$ ; circularidade: veículo:  $0,84 \pm 0,02$ , 6-OHDA:  $0,81 \pm 0,02$ , veículo + APO:  $0,83 \pm 0,019$  e 6-OHDA + APO:  $0,83 \pm 0,029$ ;  $F(1,15)= 1,124$ ,  $p=0,3058$ ; dimensão fractal/complexidade: veículo:  $1,35 \pm 0,05$ , 6-OHDA:  $1,27 \pm 0,068$ , veículo + APO:  $1,34 \pm 0,12$  e 6-OHDA + APO:  $1,40 \pm 0,017$ ;  $F(1,15)= 3,484$ ,  $p=0,0816$ ; e lacunaridade/heterogeneidade: veículo:  $0,48 \pm 0,063$ , 6-OHDA:  $0,52 \pm 0,069$ , veículo + APO:  $0,47 \pm 0,08$  e 6-OHDA + APO:  $0,42 \pm 0,016$ ;  $F(1,15)= 1,892$ ,  $p= 0,1892$ ) (Fig. 9A-I).

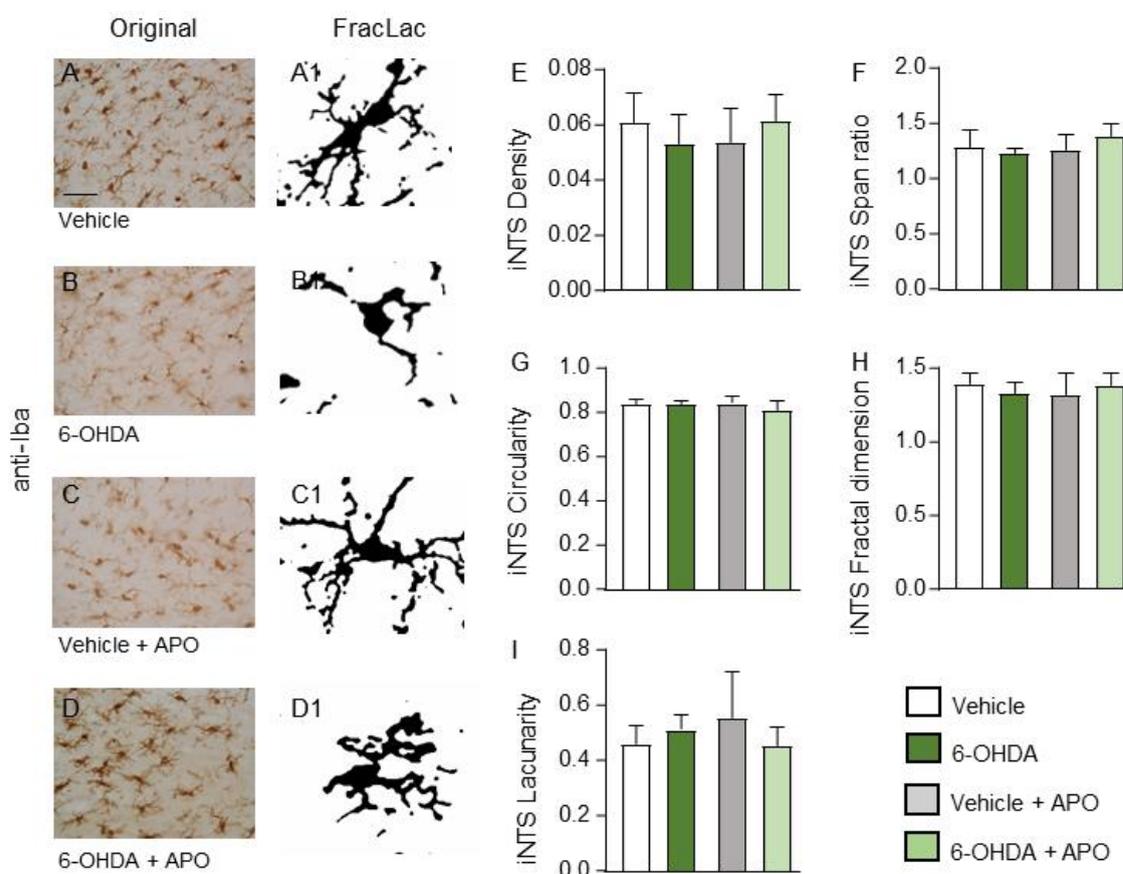
**Figura 9 - Efeitos após 30 dias da injeção de 6-OHDA no CPu na morfologia da microglia no NTSc frente ao tratamento com apocinina.**



Fotomicrografias representativas da imuno-histoquímica para Iba1 no NTSc do (A) veículo, (B) 6-OHDA, (C) veículo + APO e (D) 6-OHDA + APO. As fotomicrografias originais foram modificadas no software ImageJ para a realização das análises morfológicas. Em um primeiro momento, as fotomicrografias foram convertidas em imagens binárias e a análise fractal foi feita por meio de imagens como em A1-3, B1-3, C1-3 e D1-3 (representativas de um animal dos grupos veículo, 6-OHDA, veículo + APO e 6-OHDA + APO, respectivamente) e os resultados dessa análise estão representados nos gráficos de (E) densidade/tamanho, (F) span ratio/alongamento, (G) circularidade, (H) dimensão fractal/complexidade, e (I) lacunaridade/heterogeneidade.

Na análise da microglia no núcleo NTSi, não foi possível observar alterações nos parâmetros avaliados em nenhum dos grupos experimentais (densidade/tamanho: veículo:  $0,06 \pm 0,01$ , 6-OHDA:  $0,05 \pm 0,01$ , veículo + APO:  $0,05 \pm 0,012$  e 6-OHDA + APO:  $0,061 \pm 0,009$ ;  $F(1,15) = 2,408$ ,  $p = 0,1416$ ; span ratio/alongamento: veículo:  $1,29 \pm 0,14$ , 6-OHDA:  $1,24 \pm 0,035$ , veículo + APO:  $1,26 \pm 0,13$  e 6-OHDA + APO:  $1,38 \pm 0,10$ ;  $F(1,15) = 2,512$ ,  $p = 0,1338$ ; circularidade: veículo:  $0,83 \pm 0,024$ , 6-OHDA:  $0,84 \pm 0,011$ , veículo + APO:  $0,84 \pm 0,029$  e 6-OHDA + APO:  $0,81 \pm 0,039$ ;  $F(1,15) = 1,876$ ,  $p = 0,1909$ ; dimensão fractal/complexidade: veículo:  $1,39 \pm 0,069$ , 6-OHDA:  $1,32 \pm 0,078$ , veículo + APO:  $1,32 \pm 0,14$  e 6-OHDA + APO:  $1,38 \pm 0,085$ ;  $F(1,15) = 1,892$ ,  $p = 0,1891$ ; e lacunaridade/heterogeneidade: veículo:  $0,46 \pm 0,064$ , 6-OHDA:  $0,51 \pm 0,054$ , veículo + APO:  $0,55 \pm 0,16$  e 6-OHDA + APO:  $0,45 \pm 0,068$ ;  $F(1, 15) = 2,574$ ,  $p = 0,1295$ ) (Fig. 10A-I).

**Figura 10 - Efeitos após 30 dias da injeção de 6-OHDA no CPu na morfologia da microglia no NTSi frente ao tratamento com apocinina.**

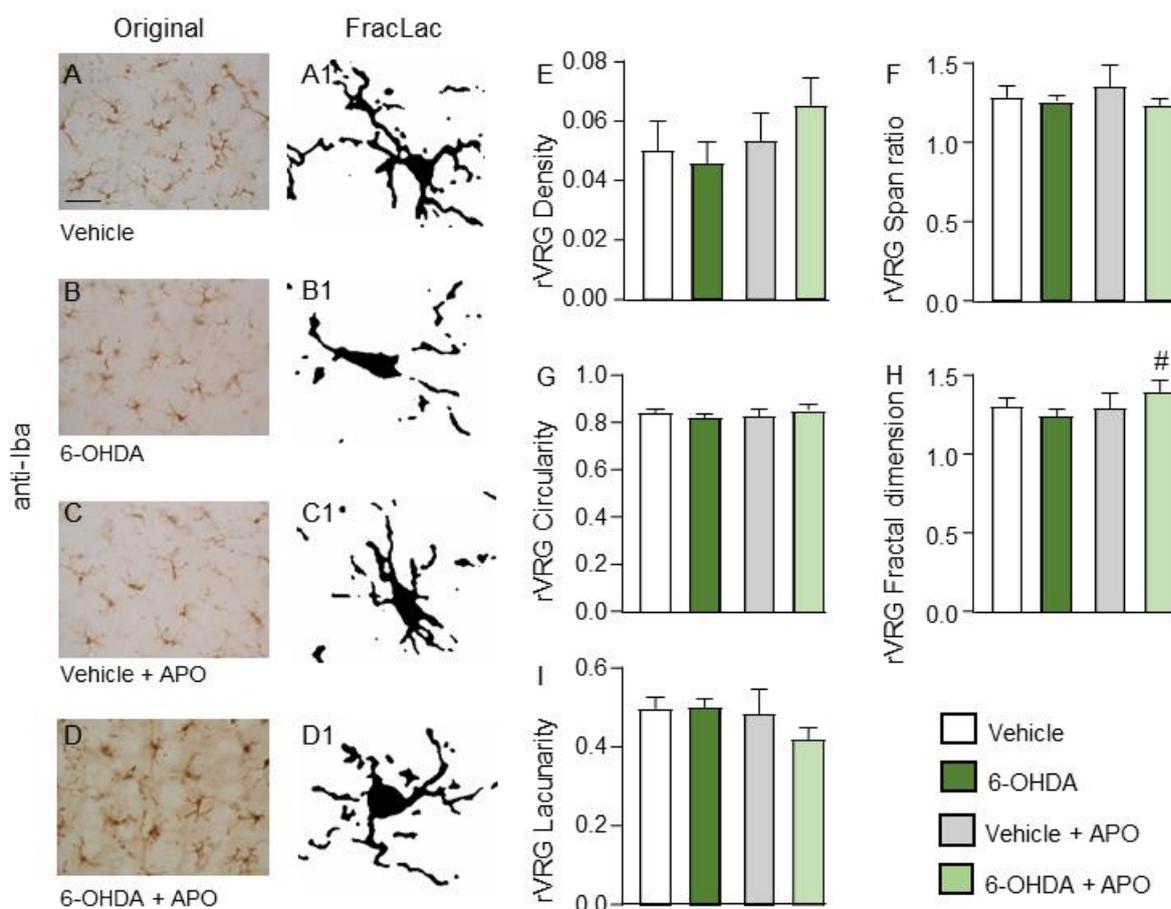


Fotomicrografias representativas da imuno-histoquímica para Iba1 no NTSi do (A) veículo, (B) 6-OHDA, (C) veículo + APO e (D) 6-OHDA + APO. As fotomicrografias originais foram modificadas no software ImageJ para a realização das análises morfológicas. Em um primeiro momento, as fotomicrografias foram convertidas em imagens binárias e a análise fractal foi feita por meio de imagens como em A1-3, B1-3, C1-3 e D1-3 (representativas de um animal dos grupos veículo, 6-OHDA, veículo + APO e 6-OHDA + APO, respectivamente) e os resultados dessa análise estão representados nos gráficos de (E) densidade/tamanho, (F) span ratio/alongamento, (G) circularidade, (H) dimensão fractal/complexidade, e (I) lacunaridade/heterogeneidade.

Na análise da microglia no núcleo rVRG, não foi possível observar alterações nos parâmetros avaliados em nenhum dos grupos experimentais (densidade/tamanho: veículo:  $0,05 \pm 0,009$ , 6-OHDA:  $0,04 \pm 0,006$ , veículo + APO:  $0,053 \pm 0,009$  e 6-OHDA + APO:  $0,065 \pm 0,009$ ;  $F(1,14) = 3,749$ ,  $p = 0,0733$ ; span ratio/alongamento: veículo:  $1,29 \pm 0,06$ , 6-OHDA:  $1,26 \pm 0,038$ , veículo + APO:  $1,36 \pm 0,12$  e 6-OHDA + APO:  $1,23 \pm 0,03$ ;  $F(1,14) = 1,461$ ,  $p = 0,2468$ ; circularidade: veículo:  $0,84 \pm 0,013$ , 6-OHDA:  $0,82 \pm 0,014$ , veículo + APO:  $0,83 \pm 0,024$  e 6-OHDA + APO:  $0,85 \pm 0,025$ ;  $F(1,14) = 0,6143$ ,  $p = 0,4462$ ; e lacunaridade/heterogeneidade: veículo:  $0,49 \pm 0,026$ , 6-OHDA:  $0,501 \pm 0,02$ , veículo + APO:  $0,48 \pm 0,06$  e 6-OHDA + APO:  $0,42 \pm 0,027$ ;  $F(1,14) = 3,600$ ,  $p = 0,0786$ ) (Fig. 13A-I). Somente no parâmetro dimensão fractal/complexidade foi observado aumento no grupo 6-OHDA tratado

com apocinina: veículo:  $1,30 \pm 0,053$ , 6-OHDA:  $1,24 \pm 0,04$ , veículo + APO:  $1,29 \pm 0,09$  e 6-OHDA + APO:  $1,39 \pm 0,06$ ;  $F(1,14) = 0,4169$ ,  $p = 0,0287$  (Fig. 11H).

**Figura 11 - Efeitos após 30 dias da injeção de 6-OHDA no CPu na morfologia da microglia no rVRG frente ao tratamento com apocinina.**

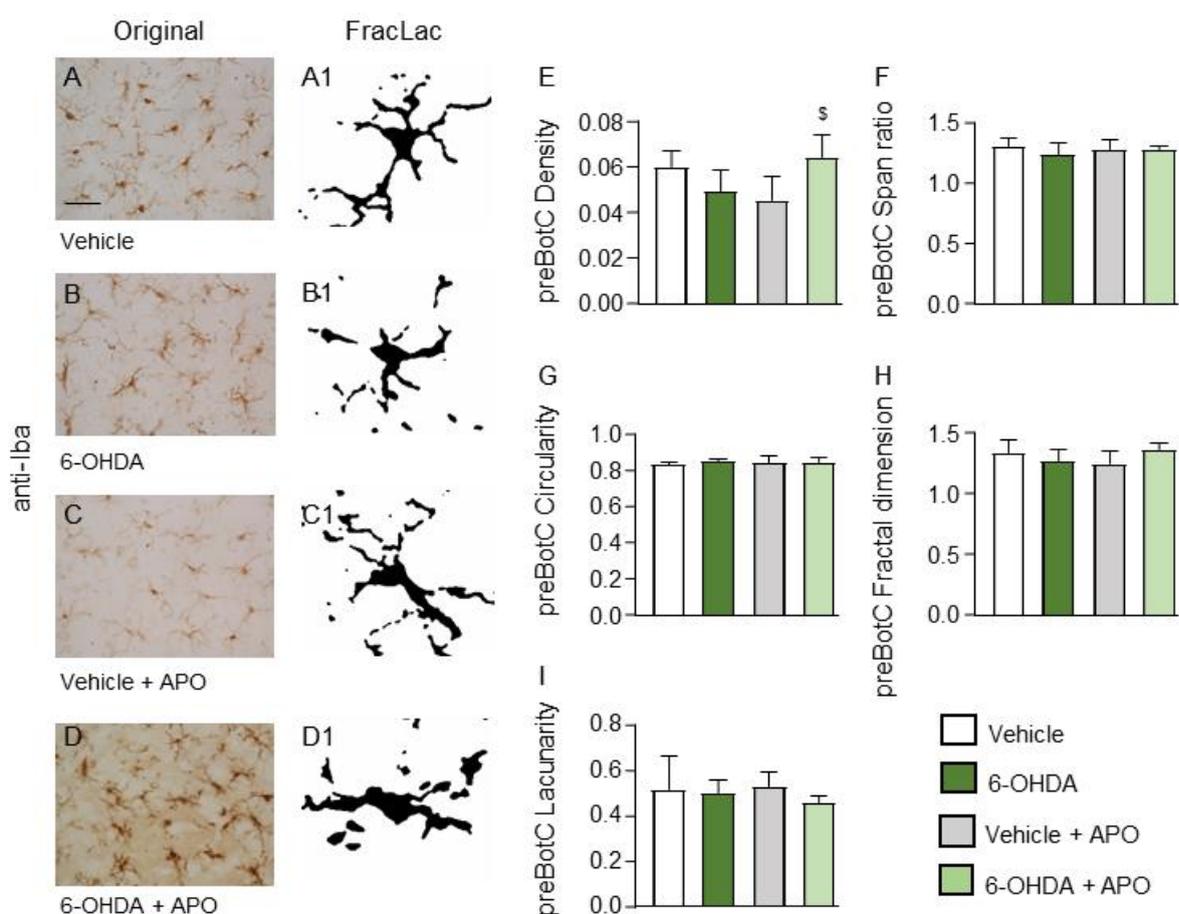


Fotomicrografias representativas da imuno-histoquímica para Iba1 no rVRG do (A) veículo, (B) 6-OHDA, (C) veículo + APO e (D) 6-OHDA + APO. As fotomicrografias originais foram modificadas no software ImageJ para a realização das análises morfológicas. Em um primeiro momento, as fotomicrografias foram convertidas em imagens binárias e a análise fractal foi feita por meio de imagens como em A1-3, B1-3, C1-3 e D1-3 (representativas de um animal dos grupos veículo, 6-OHDA, veículo + APO e 6-OHDA + APO, respectivamente) e os resultados dessa análise estão representados nos gráficos de (E) densidade/tamanho, (F) span ratio/alongamento, (G) circularidade, (H) dimensão fractal/complexidade, e (I) lacunaridade/heterogeneidade. # Diferente do 6-OHDA (two-way ANOVA, seguido por Bonferroni,  $p < 0,05$ ).

A análise da microglia de densidade/tamanho, no núcleo preBotC, não demonstrou alterações entre o grupo 6-OHDA comparado ao veículo, entretanto o tratamento com a apocinina foi capaz de aumentar a densidade da microglia no grupo 6-OHDA em comparação ao grupo veículo (veículo:  $0,06 \pm 0,006$ , 6-OHDA:  $0,04 \pm 0,009$ , veículo + APO:  $0,04 \pm 0,01$  e 6-OHDA + APO:  $0,06 \pm 0,009$ ;  $F(1,14) = 11,93$ ,  $p = 0,0039$ )

(Fig.14 E ). Os demais parâmetros não sofreram alterações (span ratio/alongamento: veículo:  $1,3 \pm 0,06$ , 6-OHDA:  $1,23 \pm 0,08$ , veículo + APO:  $1,28 \pm 0,07$  e 6-OHDA + APO:  $1,27 \pm 0,03$ ;  $F_{(1,14)} = 0,8543$ ,  $p = 0,3710$ ; circularidade:veículo:  $0,82 \pm 0,016$ , 6-OHDA:  $0,84 \pm 0,015$ , veículo + APO:  $0,84 \pm 0,03$  e 6-OHDA + APO:  $0,84 \pm 0,02$ ;  $F_{(1,14)} = 0,3084$ ,  $p = 0,5874$ ; dimensão fractal/complexidade: veículo:  $1,34 \pm 0,1$ , 6-OHDA:  $1,26 \pm 0,09$ , veículo + APO:  $1,24 \pm 0,09$  e 6-OHDA + APO:  $1,36 \pm 0,05$ ;  $F_{(1,14)} = 0,003215$ ,  $p = 0,9556$ ; e lacunaridade/heterogeneidade: veículo:  $0,51 \pm 0,14$ , 6-OHDA:  $0,5 \pm 0,05$ , veículo + APO:  $0,52 \pm 0,06$  e 6-OHDA + APO:  $0,45 \pm 0,02$ ;  $F_{(1,14)} = 0,4161$ ,  $p = 0,5293$ ) (Fig. 12A-I).

**Figura 12. Efeitos após 30 dias da injeção de 6-OHDA no CPu na morfologia da microglia no preBotC frente ao tratamento com apocinina.**

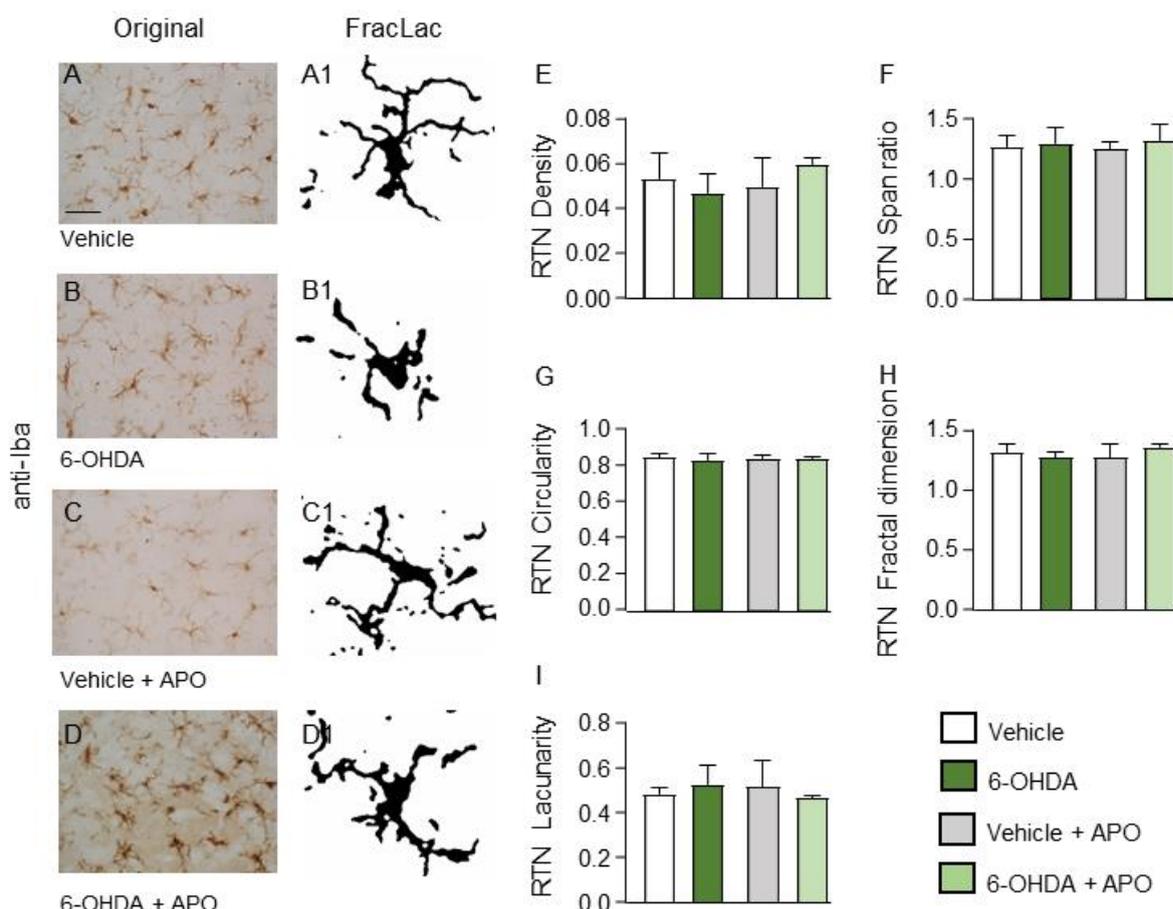


Fotomicrografias representativas da imuno-histoquímica para Iba1 no preBotC do (A) veículo, (B) 6-OHDA, (C) veículo + APO e (D) 6-OHDA + APO. As fotomicrografias originais foram modificadas no software ImageJ para a realização das análises morfológicas. Em um primeiro momento, as fotomicrografias foram convertidas em imagens binárias e a análise fractal foi feita por meio de imagens como em A1-3, B1-3, C1-3 e D1-3 (representativas de um animal dos grupos veículo, 6-OHDA, veículo + APO e 6-OHDA + APO, respectivamente) e os resultados dessa análise estão representados nos gráficos de (E) densidade/tamanho, (F) span ratio/alongamento, (G) circularidade, (H) dimensão

fractal/complexidade, e (I) lacunaridade/heterogeneidade. \$ Diferente do veículo + APO (two-way ANOVA, seguido por Bonferroni,  $p < 0,05$ ).

Na análise da microglia no núcleo RTN, não foi possível observar alterações nos parâmetros avaliados em nenhum dos grupos experimentais (densidade/tamanho: veículo:  $0,05 \pm 0,01$ , 6-OHDA:  $0,04 \pm 0,008$ , veículo + APO:  $0,04 \pm 0,013$  e 6-OHDA + APO:  $0,05 \pm 0,002$ ;  $F(1,14) = 2,922$ ,  $p = 0,1095$ ; span ratio/alongamento: veículo:  $1,27 \pm 0,08$ , 6-OHDA:  $1,30 \pm 0,13$ , veículo + APO:  $1,25 \pm 0,059$  e 6-OHDA + APO:  $1,32 \pm 0,13$ ;  $F(1,14) = 0,1142$ ,  $p = 0,7404$ ; circularidade: veículo:  $0,84 \pm 0,016$ , 6-OHDA:  $0,83 \pm 0,033$ , veículo + APO:  $0,83 \pm 0,024$  e 6-OHDA + APO:  $0,83 \pm 0,014$ ;  $F(1,14) = 0,3721$ ,  $p = 0,5516$ ; dimensão fractal/complexidade: veículo:  $1,30 \pm 0,072$ , 6-OHDA:  $1,26 \pm 0,05$ , veículo + APO:  $1,27 \pm 0,11$  e 6-OHDA + APO:  $1,35 \pm 0,026$ ;  $F(1,14) = 2,641$ ,  $p = 0,1264$ ; e lacunaridade/heterogeneidade: veículo:  $0,47 \pm 0,033$ , 6-OHDA:  $0,52 \pm 0,09$ , veículo + APO:  $0,51 \pm 0,11$  e 6-OHDA + APO:  $0,46 \pm 0,012$ ;  $F(1,14) = 1,634$ ,  $p = 0,2220$ ) (Fig. 13A-I).

**Figura 15. Efeitos após 30 dias da injeção de 6-OHDA no Cpu na morfologia da microglia no RTN frente ao tratamento com apocinina.**



Fotomicrografias representativas da imuno-histoquímica para Iba1 no RTN do (A) veículo, (B) 6-

OHDA, (C) veículo + APO e (D) 6-OHDA + APO. As fotomicrografias originais foram modificadas no software ImageJ para a realização das análises morfológicas. Em um primeiro momento, as fotomicrografias foram convertidas em imagens binárias e a análise fractal foi feita por meio de imagens como em A1-3, B1-3, C1-3 e D1-3 (representativas de um animal dos grupos veículo, 6-OHDA, veículo + APO e 6-OHDA + APO, respectivamente) e os resultados dessa análise estão representados nos gráficos de (E) densidade/tamanho, (F) span ratio/alongamento, (G) circularidade, (H) dimensão fractal/complexidade, e (I) lacunaridade/heterogeneidade.

## 5 DISCUSSÃO

O modelo animal de 6-OHDA baseia-se na injeção intracerebral de 6-OHDA, uma neurotoxina que não atravessa a barreira hematoencefálica e análoga a dopamina com alta afinidade pelo transportador de dopamina que desloca a toxina para dentro dos neurônios dopaminérgicos. A injeção de 6-OHDA no estriado provoca um processo de neurodegeneração retrógrado fornecendo um modelo progressivo de degeneração nigroestriatal que se assemelha a evolução gradual do processo neurodegenerativo da DP humana (Blandini; Armentero, 2012). Para comprovação do modelo experimental é feito a análise quantitativa de expressão da enzima tirosina-hidroxilase (TH), uma enzima limitante na síntese de catecolaminas e portanto sua redução em 70% na região da SNpc está fortemente associada a neurodegeneração catecolaminérgica comprovando o modelo experimental de DP (Daubner; Le; Wang, 2011; Tuppy et al, 2015).

Além disso, o tratamento por 10 dias com apocinina, inibidora não seletiva da NADPH oxidase (NOX), após a indução da 6-OHDA, não preveniu a neurodegeneração na SN como esperado, visto que nesse tempo já havia ocorrido a morte significativa dos neurônios na substância negra. Conforme visto por Hernandez et. al., a SN já está completamente degenerada a partir do 15º dia da indução do modelo e assim o tratamento com apocinina inicia-se 20 dias após a injeção de 6-OHDA (Hernandez et. al., 2013). Dessa forma, a não reversão da morte neuronal foi importante para manter o modelo de DP a fim de avaliar as alterações gliais nos núcleos respiratórios.

Os déficits respiratórios são muito comuns na DP e são responsáveis por grande parte da morbidade e mortalidade dos pacientes (Hyam et al, 2019). 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).

Em resposta a injeção de 6-OHDA, além da resposta neuronal, sabe-se que há uma comunicação bidirecional entre microglia e astrócito que auxiliam no desenvolvimento de funções que corroboram com a homeostase do cérebro (Nakka et al., 2016). Assim, tem-se que em condições patológicas, o desbalanceamento do estado redox promove o estresse oxidativo (Sies, 2015) observado no modelo induzido por 6-OHDA, o qual pode ter a contribuição da monoaminaoxidase, NADPH oxidase (NOX), óxido nítrico sintase, entre outras enzimas afetando os neurônios e células da glia no encéfalo (Bedard et al., 2007).

A conversa molecular entre as células gliais é vista em um estudo recente que identificou o papel crítico de uma NADPH oxidase (NOX2) na regulação microglial da astrogliose na SN de camundongos tratados com MPTP (Hou et al., 2017). Este estudo demonstrou que a NOX2 ativada via microglia contribui para aumentar o superóxido extracelular, que pode se converter espontaneamente em  $H_2O_2$  e que por fim ativaria os astrócitos de forma sequencial, indicando que a ativação da microglia precede a ativação astrogliosa no modelo de DP (Jha et al., 2018; Hou et al., 2017). Porém, na condição de estresse oxidativo suspeita-se que outras enzimas possam também contribuir para a estimulação da astrogliose devido ao déficit mitocondrial (Schapira et al., 1990).

Assim, os resultados dos astrócitos nos núcleos respiratórios, obtidos no presente estudo, difere dos vistos em outros estudos da SN em modelo DP (Fricke et al., 2016; Nomura et al., 2000; Hou et al., 2017), levando a hipótese de que os astrócitos podem possuir funções diferentes em regiões diversas do cérebro (Jha et al., 2018; Mulkey et al., 2010) visto que além da resposta imune via comunicação microglial, no bulbo ventral, estas células também apresentam resposta quimiorreceptora (Gourine et al., 2010).

Aos 30 dias após a injeção de 6-OHDA, não há diferença significativa, entre o grupo 6-OHDA e veículo, na densidade de astrócitos em todos os núcleos respiratórios. Neste período, a coluna respiratória não sofreu toda injúria causada pela 6-OHDA conforme observado em um decurso temporal por Fernandes-Junior e colaboradores (Fernandes-Junior et al., 2018). No entanto, o tratamento com apocinina promoveu aumento da densidade dos astrócitos (astrogliose) nos grupos 6-OHDA em relação ao grupo veículo tratado. Visto que, segundo Nascimento e colaboradores, a apocinina

previne a neurodegeneração nos núcleos respiratórios é possível que ocorra um aumento na sensibilidade dos astrócitos na tentativa de manter a homeostasia neuronal, uma vez que os mesmos estão envolvidos em diferentes funções nos núcleos respiratórios, como a quimiorrecepção (Nascimento et al., 2022).

Já a análise quantitativa morfológica da micróglia ainda é algo recente e pouco se sabe no controle da respiração. Segundo Morrison (2017), é possível ver que essas células podem apresentar diferenças ao comparar seu estado de repouso ou seu estado ativo (Morrison et al., 2017). Portanto, a micróglia em repouso possui maior quantidade de prolongamentos, as células são maiores, mais complexas e com prolongamentos maiores em relação à célula que está reativa (Morrison et al., 2017).

Após 30 dias da indução do modelo 6-OHDA da DP não se observou, na esqueletonização e fractal morfológica da micróglia, diferenças nos núcleos respiratórios avaliados nos grupos veículo e 6-OHDA; o tratamento com apocinina aumentou o número de células no grupo 6-OHDA no núcleo RTN e a complexidade da microglia no núcleo rVRG. Visto que o RTN apresenta degeneração aos 30 dias após indução do modelo de DP devido ao desbalanço redox e estresse oxidativo (Falquetto et al., 2020), é possível que as alterações microgliais no grupo 6-OHDA sejam observadas somente mais tardiamente em 40 dias, porém o tratamento contra o estresse oxidativo pode causar alterações na sensibilidade dessas células nesse núcleo já aos 30 dias. Da mesma forma em relação ao núcleo preBotC, apesar do início da sinalização apoptótica aos 30 dias, este núcleo sofre degeneração mais tardiamente os 40 dias (Falquetto et al., 2020), e a resposta microglial talvez seja observada após este período; porém o tratamento com apocinina leva alterações nas células gliais visto que estas células possuem sensibilidade ao mesmo.

Assim é importante notar que a microglia é extremamente dinâmica e ao longo do tempo pode ser influenciada por estímulos de outras células que fazem parte do SNC, principalmente os neurônios, revelando o conhecido aspecto macrofagocítico dessas células, em que podem estar ramificadas ou ameboides (Savage et al., 2019). Este comprometimento das células gliais nos núcleos respiratórios, visto suas funções diversas que não só a resposta imune, pode ser responsável pelo déficit respiratório funcional que animais modelo de DP apresentam, como a redução da frequência respiratória e ventilação no basal e frente ao estímulo hipercápnico (Tuppy et al., 2015; Fernandes-Junior et al., 2018; Falquetto et al., 2020). A somar, as alterações gliais nos núcleos respiratórios parecem ter decurso temporal diferente dos neurônios em resposta a lesão da 6-OHDA, com alterações mais tardias.

## 6 CONCLUSÕES

A partir desses resultados podemos concluir que o aumento na densidade dos astrócitos no grupo 6-OHDA em relação ao tratamento no grupo veículo no NTSc, NTSi e RTN e as alterações pontuais na morfologia da microglia no NTSc, preBotC e RTN demonstra que a neuroinflamação pode estar relacionada com processos de apoptose nos núcleos respiratórios no modelo de DP e, que o tratamento com apocinina é capaz de prevenir as alterações neuronais e gliais ou aumentar a sensibilidade destas células uma vez que as mesmas apresentam enzima NOX que pode ser inibida pela apocinina. Estes resultados abrem um leque de oportunidades para novos estudos, tendo em vista que nossos dados corroboraram com a literatura da DP e sugere que a neuroinflamação seja alvo para futuras pesquisas para melhor compreender a degeneração neuronal também dos núcleos respiratórios no modelo 6-OHDA de DP.

## 7 REFERÊNCIAS

BARNA, B. F.; TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, Thiago S. Pontomedullary and hypothalamic distribution of Fos-like immunoreactive neurons after acute exercise in rats. **Neuroscience**, v. 212, p. 120–130, 2012.

BEDARD K & KRAUSE Kh. The nox family of ros-generating nadph oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 87, p. 245-313, 2017.

BLUM, David; TORCH, Sakina; LAMBENG, Nathalie; *et al.* Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: Contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 65, n. 2, p. 135–172, 2001.

BRAAK, Heiko; DEL TREDICI, Kelly; BRATZKE, Hansjürgen; *et al.* Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). **Journal of Neurology**, v. 249, n. 0, p. 1–1, 2003.

BRENNER, Michael. Neuroscience Letters Role of GFAP in CNS injuries. **Neuroscience Letters**, v. 565, p. 7–13, 2014.

CHARSAR, Brittany A. *et al.* AAV2-BDNF promotes respiratory axon plasticity and recovery of diaphragm function following spinal cord injury. **The FASEB Journal**, v. 33, n. 12, p. 13775-13793, dez. 2019. Available on: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6894085/>. Access on: 15 out. 2021

CLEARY, Colin M *et al.* Somatostatin-expressing parafacial neurons are CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> sensitive and regulate baseline breathing. **Elife**, v. 10, n. 1, p. 1-22, 20 maio 2021. Available on: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8169115/pdf/elife-60317.pdf>. Access on: 09 set. 2021.

FALQUETTO, Bárbara *et al.* Oxidative stress in the medullary respiratory neurons contributes to respiratory dysfunction in the 6-OHDA model of Parkinson's disease. **The**

**Journal Of Physiology**, v. 598, n. 22, p. 5271-5293, 8 set. 2020.

FERNANDES-JUNIOR, Silvio 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, 28 ago. 2018.

FURUYA, Werner I. et al. Differential modulation of sympathetic and respiratory activities by cholinergic mechanisms in the nucleus of the solitary tract in rats. **Experimental Physiology**, v. 99, n. 5, p. 743-758, 11 abr. 2014. Available: <https://physoc.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1113/expphysiol.2013.076794>. Access on: 09 set. 2021.

GOURINE, Alexander V. et al. Astrocytes Control Breathing Through pH-Dependent Release of ATP. **Science**, v. 329, n. 5991, p. 571-575, 30 jul. 2010.

GUYENET, Patrice G.; BAYLISS, Douglas A.. Neural Control of Breathing and CO2 Homeostasis. **Neuron**, v. 87, n. 5, p. 946-961, set. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4559867/>. Access on: 07 fev. 2023.

HENDRIX, Jolien et al. The Interplay between Oxidative Stress, Exercise, and Pain in Health and Disease: potential role of autonomic regulation and epigenetic mechanisms. **Antioxidants**, v. 9, n. 11, p. 1166, 23 nov. 2020.

HERNANDES, Marina S. et al. Reactive oxygen species and the structural remodeling of the visual system after ocular enucleation. **Neuroscience**, São Paulo, v. 170, n. 4, p. 1249-1260, nov. 2010.

HERNANDES, Marina S.; CAFÉ-MENDES, Cecília C.; BRITTO, Luiz R. G.. NADPH Oxidase and the Degeneration of Dopaminergic Neurons in Parkinsonian Mice. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, São Paulo, v. 2013, p. 1-13, 2013.

HOL, Elly M; PEKNY, Milos. ScienceDirect Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 32, p. 121–130, 2015.

HUXTABLE, A G; VINIT, S; WINDELBORN, J A; et al. Respiratory Physiology & Neurobiology Systemic inflammation impairs respiratory chemoreflexes and plasticity. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 178, n. 3, p. 482–489, 2011.

HWANG, Onyou. Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. **Experimental Neurobiology**, v. 22, n. 1, p. 11-17, 30 mar. 2013. Available on: <https://www.en-journal.org/journal/view.html?doi=10.5607/en.2013.22.1.11>. Access on: 12 nov. 2021.

IKEDA, Keiko; KAWAKAMI, Kiyoshi; ONIMARU, Hiroshi; OKADA, Yasumasa; YOKOTA, Shigefumi; KOSHIYA, Naohiro; OKU, Yoshitaka; IIZUKA, Makito; KOIZUMI, Hidehiko. The respiratory control mechanisms in the brainstem and spinal cord: integrative views of the neuroanatomy and neurophysiology. **The Journal Of Physiological Sciences**, v. 67, n. 1, p. 45-62, 17 ago. 2016. Disponível em: <https://jps.biomedcentral.com/articles/10.1007/s12576-016-0475-y#citeas>. Access on: 07 fev. 2023.

IRAVANPOUR, Farideh et al. Intranasal insulin improves mitochondrial function and attenuates motor deficits in a rat 6-OHDA model of Parkinson's disease. **Cns Neuroscience e Therapeutics**, v. 3, n. 27, p. 308-319, mar. 2021. Available on: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7871791/>. Access on: 15 out. 2021

KAIDERY, Navneet Ammal; AHUJA, Manuj; THOMAS, Bobby. Crosstalk between Nrf2 signaling and mitochondrial function in Parkinson's disease. **Molecular And Cellular Neuroscience**, [S.L.], v. 101, p. 103413, dez. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6981291/>. Acesso on: 27 jan. 2023.

KAM, Tae-In et al. Microglia and astrocyte dysfunction in parkinson's disease. **Neurobiology Of Disease**, v. 144, p. 1-22, out. 2020.

KASYMOV, Vitaliy et al. Differential Sensitivity of Brainstem versus Cortical Astrocytes to Changes in pH Reveals Functional Regional Specialization of Astroglia. **Journal Of Neuroscience**, v. 33, n. 2, p. 435-441, 9 jan. 2013.

KRASKO, Maryann N. *et al.* Rat Models of Vocal Deficits in Parkinson's Disease. **Brain Sciences**, [s. l.], v. 925, n. 11, p. 1-21, jul. 2021. Available on: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8303338/pdf/brainsci-11-00925.pdf>. Acesso on: 09 set. 2021.

LIDDELOW, Shane A. *et al.* Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. **Nature**, v. 541, n. 7638, p. 481-487, jan. 2017.

MARINA, Nephtali et al. Brain metabolic sensing and metabolic signaling at the level of an astrocyte. **Glia**, v. 66, n. 6, p. 1185-1199, 23 dez. 2017.

MIDDELDORP, J; HOL, E M. GFAP in health and disease. **Progress in neurobiology**, v. 93, n. 3, p. 421-443, 2011.

MORRISON, Helena; YOUNG, Kimberly; QURESHI, Mahir; *et al.* Quantitative microglia analyses reveal diverse morphologic responses in the rat cortex after diffuse brain injury. **Scientific Reports**, n. September, p. 1-12, 2017.

NASCIMENTO, André L.F. *et al.* Oxidative Stress Inhibition Via Apocynin Prevents Medullary Respiratory Neurodegeneration and Respiratory Pattern Dysfunction in a 6-Hydroxydopamine Animal Model of Parkinson's Disease. **Neuroscience**, [S.L.], v. 502, p. 91-106, out. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2022.07.034>. Acesso on: 04 out. 2022.

NAKKA VP, PRAKASH-BABU P & VEMUGANTI R.. Crosstalk between endoplasmic reticulum stress, oxidative stress, and autophagy: potential therapeutic targets for acute cns injuries. **Mol Neurobiol**, v. 53, p. 532-544, 2016.

NOOR, Neveen A. et al. A promising therapeutic potential of cerebrolysin in 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. **Life Sciences**, v. 155, p. 174-179, jun. 2016.

OLIVEIRA, Luiz M. *et al.* Respiratory disturbances in a mouse model of Parkinson's disease. **Experimental Physiology**, São Paulo, v. 104, n. 5, p. 729-739, 7 mar. 2019.

PAASILA, Patrick Jarmo *et al.* The relationship between the morphological subtypes of microglia and Alzheimer's disease neuropathology. **Brain Pathology**, v. 29, n. 6, p. 726-740, 22 mar. 2019. Available on: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8028288/>. Acesso on: 15 out. 2021

PARGA, J A; MUN, A; REY, P; *et al.* Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity : the role of NADPH oxidase and microglial activation in 6-hydroxydopamine - induced degeneration of dopaminergic neurons. p. 145-156, 2007.

PAXINOS, G.; WATSON, C. 1998. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego:

Academic Press.

PERCÁRIO, Sandro et al. Oxidative Stress in Parkinson's Disease: Potential Benefits of Antioxidant Supplementation. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, Brasil, v. 1, n. 1, p. 1-23, out. 2020. Available on: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7576349/>. Access on: 06 set. 2021.

POEWE, Werner et al. Parkinson disease. **Disease Primers**, Austria, v. 3, n. 17013, p. 1-21, mar. 2017.

QUINLAN, Roy A; BRENNER, Michael; GOLDMAN, James E; *et al.* GFAP and its role in Alexander disease. **Experimental cell research**, v. 313, n. 10, p. 2077–2087, 2007.

RODRÍGUEZ-GÓMEZ, José A. et al. Microglia: Agents of the CNS Pro-Inflammatory Response: agents of the cns pro-inflammatory response. **Cells**, v. 9, n. 7, p. 1717, 17 jul. 2020. Available on: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7407646/>. Access on: 15 out. 2021

SASAKI, Atsushi. Symposium: Glial pathology Microglia and brain macrophages : An update. n. October, p. 452–464, 2016. MIDDELDORP, J; HOL, E M. Progress in Neurobiology GFAP in health and disease. **Progress in Neurobiology**, v. 93, n. 3, p. 421–443, 2011.

SASAKI, Yo; OHSAWA, Keiko; KANAZAWA, Hiroko; *et al.* Iba1 Is an Actin-Cross-Linking Protein in Macrophages / Microglia. v. 297, p. 292–297, 2001.

SCHREIHOFFER, A N N M; GUYENET, Patrice G. Identification of C1 Presympathetic Neurons in Rat Rostral Ventrolateral Medulla by Juxtacellular Labeling In Vivo. v. 536, n. June, p. 524–536, 1997.

SHEIKHBAEI, Shahriar et al. Morphometric analysis of astrocytes in brainstem respiratory regions. **Journal Of Comparative Neurology**, v. 526, n. 13, p. 2032-2047, 22 ago. 2018.

SIES H.. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v. 4, p. 180-183, 2015.

SINGH, Manisha et al. Neuroprotective Ability of Apocynin Loaded Nanoparticles (APO-NPs) as NADPH Oxidase (NOX)-Mediated ROS Modulator for Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Neuronal Injuries. **Molecules**, v. 26, n. 16, p. 5011, 18 ago. 2021.

SURACE, Michael J.; BLOCK, Michelle L.. Targeting microglia-mediated neurotoxicity: the potential of nox2 inhibitors. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [S.L.], v. 69, n. 14, p. 2409-2427, 13 maio 2012.

TIWARI, Prafulla Chandra; PAL, Rishi. The potential role of neuroinflammation and transcription factors in Parkinson disease. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, v. 19, n. 1, p. 71-80, mar. 2017. Available on: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5442366/pdf/DialoguesClinNeurosci-19-71.pdf>. Access on: 13 nov. 2021

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

TUROVSKY, Egor et al. Mechanisms of CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> Sensitivity of Astrocytes. **The Journal**

**of Neuroscience**, v. 36, n. 42, p. 10750-10758, 19 out. 2016.

VERMOT, Annelise; PETIT-HÄRTLEIN, Isabelle; SMITH, Susan M. E.; FIESCHI, Franck. NADPH Oxidases (NOX): an overview from discovery, molecular mechanisms to physiology and pathology. **Antioxidants**, v. 10, n. 6, p. 890, 1 jun. 2021.

WALKER, Douglas et al. Microglial Phenotyping in Neurodegenerative Disease Brains: identification of reactive microglia with an antibody to variant of cd105/endoglin. **Cells**, v. 8, n. 7, p. 766, 23 jul. 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6678308/pdf/cells-08-00766.pdf>. Access on: 13 nov. 2021.

WU, Jinjin et al. A V0 core neuronal circuit for inspiration. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 15 sept. 2017. Available on: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5601429/>. Access on: 08 jun. 2021.

YOUNG, Kimberly; MORRISON, Helena. Quantifying Microglia Morphology from Photomicrographs of Immunohistochemistry Prepared Tissue Using ImageJ. **Journal Of Visualized Experiments**, n. 136, p. 1-9, 4 jun. 2018.

YUAN, Quan; XU, Jieqiong; CHEN, Huiying. Dynamics Analysis of Firing Patterns in Pre-Bötzinger Complex Neurons Model. **Frontiers In Computational Neuroscience**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 1-11, jul. 2021. Available on: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8239244/pdf/fncom-15-591037.pdf>. Access on: 09 set. 2021.