

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - UFSCar/UNESP**

***DIMORFISMO SEXUAL DA FUNÇÃO QUIMIORRECEPTORA A
CO₂/pH DOS NEURÔNIOS NORADRENÉRGICOS NO LOCUS
COERULEUS***

Débora de Carvalho Dourado

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão

Co-orientador: Prof. Dr. Raphael E. Szawka

Jaboticabal

Abril - 2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - UFSCar/UNESP**

***DIMORFISMO SEXUAL DA FUNÇÃO QUIMIORRECEPTORA A
CO₂/pH DOS NEURÔNIOS NORADRENÉRGICOS NO LOCUS
COERULEUS***

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos e Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas.

Jaboticabal

Abril - 2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

D739ds Dourado, Débora de Carvalho.
Dimorfismo sexual da função quimiorreceptora a CO₂/pH dos neurônios noradrenérgicos no *Locus coeruleus* / Débora de Carvalho Dourado. -- São Carlos : UFSCar, 2014.
92 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Fisiologia. 2. Quimiorrecepção. 3. Quimiossensibilidade. 4. Estradiol. 5. Hipercapnia. 6. Ventilação pulmonar. I. Título.

CDD: 612 (20^a)

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

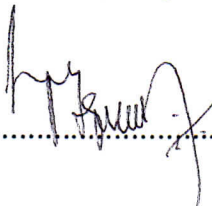
Tese de Doutorado de Débora de Carvalho Dourado

Dia 10/04/2014

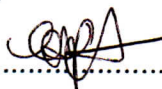
Prof.ª Dr.ª Luciane Helena Gargaglioni Batalhão.....



Prof. Dr. Luis Henrique Montezor.....



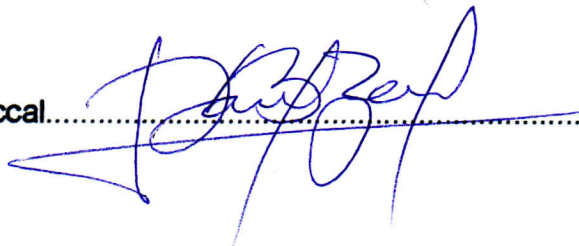
Prof.ª Dr.ª Carina Aparecida Fabrício de Andrade.....



Prof.ª Dr.ª Mirela Barros Dias.....



Prof. Dr. Daniel Breseghello Zoccal.....



Dedico aos meus amados pais e marido, meus maiores presentes enviados por Deus. Sempre me incentivando e apoiando sem medirem esforços para que eu chegasse até aqui. Sempre me passando segurança e me mostrando que eu não estava só nessa caminhada. A vocês, meus grandes amores, toda minha gratidão e amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade concedida a mim de vivenciar o mundo científico, com seus sabores e dissabores, tornando-me uma profissional mais preparada.

Aos meus pais que são a base de tudo que construí e continuarei construindo. Eles me mostraram que a melhor herança deixada é o bom caráter e a boa formação profissional, pois esses bens ninguém rouba de nós. Obrigada pai e mãe pelo amor incondicional, incentivo e apoio em todos momentos da minha vida.

Ao João, meu marido, amigo, companheiro, parceiro e cúmplice, que esteve ao meu lado nas vitórias e nas frustrações. Obrigada pelo amor, compreensão e toda paciência.

Ao meu irmão Cleber e cunhada Viviane pelo apoio e incentivo mesmo distantes.

À Professora Luciane pela amizade, confiança, compreensão e paciência. Obrigada pelos ensinamentos que me tornaram melhor como pessoa e como profissional. Essas lições irão comigo por toda vida.

Ao Professor Raphael E. Szawka pelo suporte e atenção me atendendo prontamente sempre que precisei.

A banca examinadora pela participação na defesa com importantes dicas e sugestões.

Aos meus queridos amigos do laboratório Kênia, Carol Scarpellini, Vivian, Camila, Lango, Lucas, Luana, Baiana, Elisa, Aretuza, Lívia, Lays, Victor, Carol Silva, Valter, Jolene e Gaby pela agradável convivência que fez de vocês minha segunda família, e em especial a Danúzia que foi meu braço direito nesse projeto se mostrando também ser uma grande amiga.

Aos técnicos Euclides e Aretuza pelo apoio na execução desse trabalho.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCVA pelas companhias e conversas diárias.

À Professora Janete A. Anselmo Franci e toda sua equipe por me abrir as portas de seu laboratório me auxiliando nesse estudo e me socorrendo sempre que precisei.

Ao Professor Richard Kinkead, da Université Laval, em Quebec/Canadá que me proporcionou uma inesquecível experiência vivenciada no exterior onde pude trabalhar com um diferente modelo experimental e pude também conhecer melhor a cultura canadense.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/Unesp de Jaboticabal) pela estrutura oferecida para o desenvolvimento do presente estudo.

Ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas-UFSCAR/UNESP e aos secretários Alexandre e Mara pela prontidão em auxiliar.

À FAPESP, pela bolsa concedida durante a realização deste projeto (Processo nº 2008/57748-9).

Apoio Financeiro:

**Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo nº
2008/57748-9)**

RESUMO

O *Locus coeruleus* (LC) é uma área quimiossensível ao CO₂ em mamíferos. A maioria dos estudos envolvendo a participação do LC na resposta ventilatória a hipercapnia é realizada em machos. Visto que esteróides ovarianos modulam a atividade de neurônios do LC e fêmeas apresentam uma resposta respiratória ao CO₂ diferente de machos, nós avaliamos a atividade dos neurônios noradrenérgicos do LC durante normocapnia e hipercapnia em ratas ciclando em diestro, ovariectomizadas (OVX; 0,2 mL/rata de óleo de milho, s.c., por 3 dias) e ovariectomizadas tratadas com estradiol (OVX+E2; 10 µg/0,2 mL/rata, s.c., por 3 dias) e em ratos intactos, orquidectomizados (ORX; 0,2 mL/rata de óleo de milho, s.c., por 7 dias), orquidectomizados tratados com testosterona (ORX+T; 0,25 mg/0,2 mL/rata, s.c., por 7 dias) e tratados com estradiol (ORX+E2; 10 µg/0,2 mL/rata, s.c., por 3 dias) usando dupla-marcação imunoistoquímica para c-Fos/TH. Adicionalmente, nós avaliamos a participação dos neurônios noradrenérgicos do LC em fêmeas OVX e OVX+E2 na resposta respiratória a hipercapnia usando a neurotoxina 6-hidroxidopamina. A hipercapnia (7% CO₂) aumentou a dupla marcação (c-Fos/TH-ir) nos neurônios do LC em todos os grupos comparados a normocapnia. No grupo OVX+E2 houve uma atenuação da expressão de c-Fos no LC em normocapnia e hipercapnia. A hipercapnia causou aumento na ventilação nos grupos OVX e OVX+E2, o qual resultou do aumento da frequência respiratória (fR) e volume corrente (V_T) nos grupos controle e lesados. A resposta ventilatória a hipercapnia foi significativamente atenuada no grupo lesado comparado ao grupo controle (29,4% no grupo OVX e 28,7% no grupo OVX+E2) devido à queda no V_T no grupo OVX+E2 e no grupo OVX foi devido a queda no V_T e na fR. Observamos uma redução de neurônios noradrenérgicos (~61% nos grupos OVX e OVX+E2) sete dias após microinjeções de 6-OHDA no LC. A lesão química do LC e o

estradiol não afetaram a Tc. Entretanto, a hipercapnia promoveu redução na temperatura dos grupos sham (OVX e OVX+E2) e lesado. Assim, nós podemos concluir que os neurônios noradrenérgicos do LC de fêmeas e machos são ativados por CO₂. Entretanto, no grupo OVX+E2, o estradiol reduziu a imunorreatividade comparado ao grupo OVX durante normocapnia e hipercapnia. Adicionalmente, os neurônios noradrenérgicos do LC de fêmeas participam da resposta ventilatória a hipercapnia, mas não participam da regulação da temperatura durante condições normocápnicas e hipercápnicas.

Palavras-chave: quimiossensibilidade, estradiol, hipercapnia, c-Fos e ventilação.

ABSTRACT

The *Locus coeruleus* (LC) has been suggested as a CO₂ chemoreceptor site in mammals. Most of the studies involving the role of LC in hypercapnic ventilatory response have been performed in males. Since, ovarian steroids modulate the activity of LC neurons and females have a different respiratory response to CO₂ of males, we evaluated the activity of LC noradrenergic neurons during normocapnia and hypercapnia in diestrus, ovariectomized (OVX; 0,2 mL/rat of corn oil, s.c., for 3 days) and estradiol-treated ovariectomized (OVX+E2; 10 µg/0,2 mL/rat, s.c., for 3 days) female rats and in intact, orchidectomized (ORX; 0,2 mL/rat of corn oil, s.c., for 7 days), testosterone-treated orchidectomized (ORX+T; 0,25 mg/0,2 mL/rat, s.c., for 7 days) and estradiol-treated orchidectomized (ORX+E2; 10 µg/0,2 mL/rat, s.c., for 3 days) male rats by using double-label immunohistochemistry to c-Fos/TH. Additionally, we assessed the role of noradrenergic LC neurons in OVX and OVX+E2 females on respiratory response to hypercapnia by using 6-hydroxydopamine. Hypercapnia (7% CO₂) increased the double-staining (c-Fos/TH-ir) in LC neurons in all groups when compared to air exposure. In the OVX+E2 group there was attenuation in the c-Fos expression in normocapnia and hypercapnia. Hypercapnia increased ventilation in OVX and OVX+E2 groups, which resulted from increases of respiratory frequency (fR) and tidal volume (V_T) in sham and 6-OHDA-lesioned groups. The hypercapnic ventilatory response was significantly decreased in 6-OHDA-lesioned rats compared with sham group (29.4% in OVX group and 28.7% in OVX+E2 group) due to a reduced V_T in OVX+E2 group and in OVX group due to a decrease in V_T and fR. A reduction in TH⁺ neurons (~61% in OVX and OVX+E2 group) was observed seven days after the microinjections of 6-OHDA in the LC. LC chemical lesion and estradiol did not affect body temperature (T_b). However, hypercapnia caused reduction in T_b of sham (OVX

and OVX+E2) and lesioned groups. Thus, we can conclude that noradrenergic neurons in the LC of female and male rats are activated by CO₂. However, in OVX+E2 group, estradiol reduced the immunoreactivity compared to OVX group during normocapnia and hypercapnia. Additionally, LC noradrenergic neurons play role in hypercapnic ventilatory response in females but do not affect temperature regulation during normocapnic and hypercapnic conditions.

Keywords: chemosensitivity, estradiol, hypercapnia, c-Fos and ventilation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (A) Fotomicrografias representativas da colocalização imunoistoquímica para c-Fos e tirosina hidroxilase (TH) no *Locus coeruleus* (LC) de fêmeas do grupo diestro em condições normocápnicas e hipercápnicas (7% CO₂). 4V: 4º Ventrículo. As setas indicam alguns dos neurônios com dupla marcação (c-Fos e TH). Aumento de 20x. Barra de calibração: 50 µm. **(B)** Número de neurônios com colocalização de c-Fos e tirosina hidroxilase (c-Fos/TH-ir neurônios/secção) no LC de fêmeas em diestro em condições basais e hipercápnicas (7% CO₂). *Indica diferença entre normocapnia e hipercapnia (P<0,05; Teste t).

Figura 2. (A e B) Fotomicrografias representativas da colocalização imunoistoquímica para c-Fos e tirosina hidroxilase (TH) no *Locus coeruleus* (LC) de fêmeas ovariectomizadas tratadas com veículo (OVX) ou estradiol (OVX+E2) em condições normocápnicas e hipercápnicas (7% CO₂). 4V: 4º Ventrículo. As setas indicam alguns dos neurônios com dupla marcação (c-Fos e TH). Aumento de 20x. Barra de calibração: 50 µm. **(C)** Número de neurônios com colocalização de c-Fos e TH (c-Fos/TH-ir neurônios/secção) no LC de fêmeas OVX e fêmeas OVX+E2 em condições basais e hipercápnicas (7% CO₂). *Indica diferença entre normocapnia e hipercapnia, dentro dos grupos (P<0,05; Two-way ANOVA). # Indica diferença entre os grupos, dentro de uma mesma condição (normocapnia ou hipercapnia) (P<0,05; Two-way ANOVA).

Figura 3. (A, B, C e D) Fotomicrografias representativas da colocalização imunoistoquímica para c-Fos e tirosina hidroxilase (TH) no *Locus coeruleus* (LC) de machos intactos, castrados (ORX), com reposição de estradiol (ORX+E2) ou com reposição de testosterona (ORX+T) em condições normocápnicas e hipercápnicas (7%

CO₂). 4V: 4° Ventrículo. As setas indicam alguns dos neurônios com dupla marcação (c-Fos e TH). Aumento de 20x. Barra de calibração: 50 µm. (E) Número de neurônios com colocalização de c-Fos e TH (c-Fos/TH-ir neurônios/secção) no LC de machos em condições basais e hipercápnicas (7% CO₂). *Indica diferença entre normocapnia e hipercapnia, dentro dos grupos (P<0,05; Two-way ANOVA).

Figura 4. (A e B) Fotomicrografias representativas da imunoistoquímica para tirosina hidroxilase (TH) no *Locus coeruleus* (LC) de animais do grupo sham (ácido ascórbico, a esquerda) e animais submetidos à lesão química bilateral (6-OHDA, a direita). LC: *Locus coeruleus*. Aumento de 2,5x. Barra de calibração: 400 µm. (C) O número de neurônios imunorreativos para TH foi reduzido após a lesão química do LC. * Indica diferença entre os grupos sham e lesados (P<0,0001; One-way ANOVA). (D) O círculo delimita a região A5 com marcação para TH. Barra de calibração: 100 µm.

Figura 5. Ventilação (V_E), frequência respiratória (fR) e volume corrente (V_T) dos grupos sham (ácido ascórbico) e lesado (6-OHDA) expostos a normocapnia e hipercapnia (7% CO₂). * Indica diferença entre o grupo lesado (6-OHDA) e sham (ácido ascórbico).

Figura 6. Ventilação (V_E), frequência respiratória (fR) e volume corrente (V_T) dos grupos sham tratados com estradiol (OVX+E2) e lesados tratados com estradiol (6-OHDA-OVX+E2) expostos a normocapnia e hipercapnia (7% CO₂). *Indica diferença entre grupos lesados e sham (ácido ascórbico).

Figura 7. (A) Temperatura corporal (Tc) dos grupos sham (ácido ascórbico) e lesados (6-OHDA) expostos a normocapnia e a hipercapnia (7% CO₂) nos grupos OVX e OVX+E2. **(B)** Delta da temperatura (Tc) nos grupos lesados e sham, tratados com estradiol ou não.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações plasmáticas de testosterona e estradiol em machos intactos, ORX, ORX+T e ORX+E2, submetidos ao experimento de c-Fos, em condições hipercápnicas e normocápnicas.

Tabela 2. Concentrações plasmáticas de estradiol em fêmeas dos grupos diestro, OVX e OVX+E2, submetidas ao experimento de c-Fos, em condições hipercápnicas e normocápnicas.

Tabela 3. Peso da vesícula seminal nos grupos de ratos intactos, ORX, ORX+E2 e ORX+T submetidos ao experimento de c-Fos.

Tabela 4. Peso do útero nos grupos de ratas ciclando em diestro, OVX e OVX+E2 submetidas ao experimento de c-Fos.

Tabela 5. Parâmetros ventilatórios (V_E , V_T e fR) em condições hipercápnicas e normocápnicas nos grupos sham e lesados tratados com estradiol ou veículo.

Tabela 6. Concentrações plasmáticas de estradiol em fêmeas dos grupos sham (ácido ascórbico) e lesados (6-OHDA) tratadas com estradiol (OVX+E2) ou veículo (OVX).

ABREVIACES

CO₂ – Dióxido de carbono

EPM – Erro padrão da média

ER α – Receptor para estradiol do tipo α

ER β – Receptor para estradiol do tipo β

E2 – Estradiol

fR – Freqncia respiratória

i.m. – Intra-muscular

i.p. – Intra-peritoneal

LC – *Locus coeruleus*

NTS – Núcleo do trato solitário

N₂ – Nitrogênio

ORX – Machos castrados

OVX – Fêmeas castradas

O₂ – Oxignio

PB – Tampão fosfato

PBS – Tampão fosfato salina

PFA – Paraformaldeído

RTN – Núcleo retrotrapezóide

SAP – Saporina

s.c. - Subcutâneo

SNC – Sistema nervoso central

T – Testosterona

Tb – Body temperature

Tc – Temperatura corporal

TH – Tirosina hidroxilase

V_E – Ventilação

V_T – Volume corrente

4°V – Quarto ventrículo

6-OHDA – 6- Hidroxidopamina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Animais	27
3.2. Procedimentos cirúrgicos	27
3.2.1. Cirurgia estereotáxica	28
3.2.2. Castração e Reposição Hormonal	28
3.3. Medidas da temperatura corporal (Tc)	29
3.4. Determinação da Ventilação	30
3.5. Dupla marcação imunistoquímica para c-Fos e TH	31
3.6. Avaliação da localização e efetividade da lesão	33
3.7. Medida do peso do útero e da vesícula seminal	35
3.8. Dosagem Hormonal	35
3.9. Análise dos Dados	36
3.10. Protocolos Experimentais	36
3.10.1. Efeito da hipercapnia na expressão de c-Fos nos neurônios noradrenérgicos do LC em fêmeas ciclando em diestro	36
3.10.2. Efeito dos hormônios sexuais na resposta dos neurônios noradrenérgicos do LC à hipercapnia em machos e fêmeas	37
3.10.3. Efeito do estradiol sobre a resposta de ventilação e da temperatura corporal à hipercapnia de fêmeas submetidas à lesão dos neurônios noradrenérgicos do LC	38
4. RESULTADOS	40

4.1. Efeito da hipercapnia na expressão de c-Fos nos neurônios noradrenérgicos do LC em fêmeas ciclando em diestro	40
4.2. Efeito dos esteróides sexuais na resposta dos neurônios noradrenérgicos do LC à hipercapnia em machos e fêmeas	42
4.3. Dosagem hormonal dos animais sujeitos aos experimentos de c-Fos.....	49
4.4. Peso do útero e vesícula seminal dos animais sujeitos aos experimentos de c-Fos	51
4.5 Efeito do estradiol sobre a resposta da ventilação à hipercapnia de fêmeas ovariectomizadas com reposição hormonal de estradiol submetidas à lesão dos neurônios noradrenérgicos do LC	54
4.5.1. Imunoistoquímica para tirosina hidroxilase (TH).....	54
4.5.2. Efeito da lesão dos neurônios noradrenérgicos do LC na ventilação pulmonar..	56
4.5.3. Efeito da lesão dos neurônios noradrenérgicos do LC juntamente com o tratamento com estradiol na ventilação pulmonar	59
4.6. Efeito do estradiol sobre a resposta da temperatura corporal à hipercapnia de fêmeas ovariectomizadas submetidas à lesão dos neurônios noradrenérgicos do LC	62
4.7. Dosagem Hormonal dos animais sujeitos a lesão	64
5. DISCUSSÃO	65
6. CONCLUSÃO.....	75
7. REFERÊNCIAS	76

1. INTRODUÇÃO

Para manter a homeostase frente a oscilações ocorridas no ambiente, os sistemas fisiológicos possuem diversos mecanismos reguladores. A variação da demanda de O_2 e a produção de CO_2 fazem com que o sistema respiratório exerça uma das suas principais funções: adequar o processo de trocas gasosas para manter, relativamente constante, as pressões parciais de CO_2 e O_2 no sangue arterial (P_aCO_2 e P_aO_2). A hipercapnia (aumento da P_aCO_2) pode se tornar uma ameaça à vida por causar alterações no pH sanguíneo. As células sensíveis ao CO_2/H^+ , os quimiorreceptores, estão predominante e amplamente distribuídas no sistema nervoso central (SNC) e são conhecidos como quimiorreceptores centrais. Estão presentes no tronco encefálico, hipotálamo e cerebelo em áreas como o núcleo do trato solitário (NTS), núcleo fastigial, núcleo retrotrapezóide, rafe rostral bulbar, *Locus coeruleus* e incluem também os neurônios orexinérgicos do hipotálamo (Loeschcke 1982; Coates *et al.*, 1993; Nattie, 1999; Solomon *et al.*, 2000; Ballantyne & Scheid, 2001; Nattie, 2001; Nattie & Li, 2002; Nattie & Li, 2012). Uma célula intrinsecamente quimiossensível deve responder ao estímulo (CO_2/H^+) diretamente, sem depender de outro tipo de célula do SNC. Existem também os quimiorreceptores periféricos que estão localizados nos corpos carotídeos e no arco aórtico. Contudo, os quimiorreceptores centrais apresentam função predominante na resposta ventilatória ao CO_2/H^+ em relação aos periféricos (Mitchell *et al.*, 1963; Schläfke, 1981; Loeschcke, 1982).

O *Locus coeruleus* (LC) é um núcleo bilateral localizado na porção dorsal da ponte, no assoalho do 4º ventrículo (Moore & Bloom, 1979). Esse núcleo possui o maior grupamento noradrenérgico do SNC denominado região A6 (Dahlström & Fuxe, 1964; Moore & Bloom, 1979). Estima-se que aproximadamente 50% das projeções noradrenérgicas do SNC originam-se no LC (Aston-Jones *et al.*, 1995; Berridge &

Waterhouse, 2003). Sabe-se que o LC envia projeções para diversas regiões do SNC que envolvem áreas como amígdala, hipocampo, hipotálamo, núcleo retrotrapezóide (RTN), raphe, núcleo facial dentre outras (Szabadi, 2013). Desta forma, esse núcleo está associado a funções fisiológicas e comportamentais incluindo controle respiratório, cardiovascular, ciclo sono-vigília, termorregulação, nocicepção, atenção e aprendizagem (Hobson *et al.*, 1975; Aston-Jones *et al.*, 1985; Oyamada *et al.*, 1998; Almeida *et al.*, 2004; Putnam *et al.*, 2004; Biancardi *et al.*, 2008; Carter *et al.*, 2010; De Souza Moreno *et al.*, 2010). Muitos estudos em mamíferos e anfíbios mostraram a importância do LC nas respostas compensatórias ao CO₂ (Elam *et al.*, 1981; Haxhiu *et al.*, 1996; Oyamada *et al.*, 1998; Stunden *et al.*, 2001; Filosa *et al.*, 2002; Noronha-de-Souza *et al.*, 2006; Biancardi *et al.*, 2008; de Carvalho *et al.*, 2010; Gargaglioni *et al.*, 2010; Biancardi *et al.*, 2014; Patrone *et al.*, 2014).

Além de participar de diversos processos fisiológicos, o LC também está envolvido em várias patologias, incluindo a síndrome do pânico, estresse pós-traumático e depressão (Singewald & Philipu, 1998). De modo interessante, pacientes com síndrome do pânico apresentam uma sensibilidade aumentada ao CO₂ e também parecem possuir uma função noradrenérgica alterada (Bailey *et al.*, 2003).

Evidências indicam que os neurônios do LC agem diretamente como quimiossensores a CO₂/pH sendo que 80% desses neurônios são quimiossensíveis respondendo a hipercapnia com aumento da taxa de disparos (Coates *et al.*, 1993; Pineda & Aghajanian, 1997; Oyamada *et al.*, 1998; Filosa *et al.*, 2002). Adicionalmente, o estímulo hipercápnico aumenta a expressão de c-Fos no LC (Haxhiu *et al.*, 1996; Teppema *et al.*, 1997). O aumento gradativo de CO₂ inspirado (ar atmosférico, 8% CO₂ e 10% CO₂) causou uma expressão crescente de c-Fos pelos neurônios do LC (Teppema *et al.*, 1997).

A hipercapnia é um poderoso estímulo para a ventilação levando ao aumento da frequência respiratória e do volume corrente (Nattie, 1999; Biancardi *et al.*, 2008; de Carvalho *et al.*, 2010). A depleção de neurônios catecolaminérgicos do tronco encefálico através da microinjeção de DBH-SAP na cisterna magna promoveu uma redução de aproximadamente 73-84% dos neurônios das regiões A5, A6 e A7 causando atenuação da resposta ventilatória a hipercapnia (Li & Nattie, 2006). Adicionalmente, estudo prévio de nosso laboratório demonstrou que a redução de aproximadamente 80% dos neurônios noradrenérgicos do LC em ratos foi associado a uma redução de aproximadamente 64% da resposta ventilatória ao CO₂, indicando que esse núcleo exerce importante papel no controle ventilatório a hipercapnia (Biancardi *et al.*, 2008). Entretanto, os estudos envolvendo a função do LC nas respostas compensatórias ao CO₂ são realizados em machos, portanto é desconhecido se o LC exerce uma modulação diferente na resposta à hipercapnia em fêmeas.

Estudos neuroanatômicos demonstraram que o LC de ratas apresenta maior volume e campo dendrítico e mais neurônios que LC de ratos (Guillamóm *et al.*, 1988; Bangasser *et al.*, 2011) implicando que o LC de fêmeas poderia afetar diferentemente o controle respiratório em resposta ao CO₂. Ainda, fêmeas necessitam da presença contínua de estradiol para desenvolvimento do LC (Guillamóm *et al.*, 1988; De Blas *et al.*, 1990; Segovia *et al.*, 1990) cujos neurônios possuem atividade modulada por esse hormônio (Szawka *et al.*, 2009). Estudos sugerem que o LC é uma possível área de ação do E2, já que foi constatado a presença do hormônio e do mRNA que expressa o receptor para E2 em ratas ovariectomizadas (Heritage *et al.*, 1980; Shughrue *et al.*, 1997). Outras áreas como núcleo olfatório, núcleo paraventricular, núcleo supraóptico, cerebelo, área preóptica, hipocampo, amígdala e medula espinhal também apresentam receptores para o hormônio sendo possíveis áreas de atuação do E2 (Shughrue *et al.*,

1997). O E2 encontrado no SNC pode ser resultante da difusão do E2 circulante ou resultante da ação da aromatase encontrada em áreas como hipotálamo (El-Emam Dief *et al.*, 2013) e hipocampo (Hojo *et al.*, 2004).

Administração de E2 em ratas ovariectomizadas (OVX) produz uma elevação dose-dependente nos níveis de mRNA de tirosina hidroxilase (TH) no LC (Serova *et al.*, 2002). Além disso, Pendergast *et al.* (2008) demonstraram que receptores para estradiol do tipo α e β (ER) são expressos nos neurônios noradrenérgicos do LC de camundongos machos e fêmeas. No LC de fêmeas, mRNA para expressão de ER α está presente em níveis similares a machos, enquanto mRNA para expressão de ER β é significativamente menor quando comparados a machos. A presença de receptores para estrógeno nos neurônios do LC sugere que estas células são possivelmente responsivas a variações nos níveis circulantes de esteróides ovarianos (Szawka *et al.*, 2009).

Estudos têm mostrado que, ao longo da vida, estrógeno e progesterona influenciam as funções respiratórias em animais e humanos (Dempsey *et al.*, 1986; Tatsumi *et al.*, 1995; Behan *et al.*, 2003). De fato, muitas doenças respiratórias como apnéia obstrutiva do sono (OSA) e síndrome da morte súbita infantil (SIDS) apresentam diferenças sexuais na sua prevalência mostrando a importância dos hormônios sexuais no controle respiratório (Hauck, 2001; Kapsimalis & Kryger, 2002 a, b).

Sabe-se que, durante a gravidez, as mulheres apresentam uma hiperventilação que está relacionada aos elevados níveis de progesterona que é considerada um potente estimulante para ventilação (Bayliss *et al.* 1987). Essa hiperventilação é importante para a manutenção adequada da oxigenação do feto. No que diz respeito ao LC, a progesterona apresenta efeito excitatório nesse núcleo. Entretanto esse efeito apenas é visto após uma ação prévia do estradiol (Szawka *et al.*, 2009).

Ainda é controverso se machos e fêmeas respondem diferentemente a hipóxia e hipercapnia (Holley *et al.*, 2012). Enquanto alguns estudos relatam que não há diferença sexo-específica na resposta ventilatória a hipercapnia (Rebuck *et al.*, 1973; Schlenker & Goldman, 1985; Aitken *et al.*, 1986), outros estudos sugerem que machos apresentam uma maior resposta ventilatória ao CO₂ comparado a fêmeas (Patrick & Howard, 1972; Saunders *et al.*, 1972; White *et al.*, 1983). Em contrapartida, Wenninger *et al.* (2009) demonstraram que fêmeas adultas apresentam uma maior resposta ventilatória ao CO₂ que machos. Diferenças sexo-específicas do controle respiratório também foram observadas em estudos envolvendo o sistema serotoninérgico (Zabka *et al.*, 2001 a,b; Hodges *et al.*, 2011) cujo mecanismo de resposta a hipercapnia envolve também o LC (de Souza Moreno *et al.*, 2010). Especificamente, a resposta ventilatória à hipercapnia de camundongos transgênicos machos que não possuem neurônios serotoninérgicos no SNC é atenuada, enquanto que a sensibilidade ao CO₂ de fêmeas transgênicas não é alterada, sugerindo um dimorfismo sexual na função do sistema serotoninérgica central em machos e fêmeas (Hodges *et al.*, 2011).

Os hormônios sexuais agem em todo o SNC participando do controle da ventilação (Behan *et al.*, 2003). Ademais, receptores para estrógeno estão localizados ao longo do tronco encefálico e medula espinhal, incluindo no núcleo do trato solitário (NTS), coluna respiratória ventral e motoneurônios respiratórios no núcleo do nervo frênico e do hipoglossos (Simerly *et al.*, 1990; Shughrue *et al.*, 1997; Behan & Thomas, 2005). Desta forma, o E2 pode modular a atividade de núcleos importantes para o controle respiratório.

Estudos relataram efeito inibitório do E2 em algumas áreas importantes para a ventilação (Xue & Hay, 2003; Ueyama *et al.*, 2006; Szawka *et al.*, 2009; Cason *et al.*, 2010). Em ratas anestesiadas castradas o E2 reduziu a atividade espontânea, ou induzida

por glutamato, dos neurônios do NTS (Xue & Hay, 2003). Além disso, estudos *in vivo* que analisaram a expressão de c-fos em resposta a estímulos como estresse por imobilização (Ueyama *et al.*, 2006) e exposição a campo magnético (Cason *et al.*, 2010) relataram um efeito inibitório do estradiol no LC em ratas OVX. Adicionalmente, estudo *in vitro*, em *slices* do tronco encefálico de ratas OVX, mostraram o mesmo efeito já que o E2 reduziu a taxa de disparo dos neurônios do LC (Szawka *et al.*, 2009).

A hipercapnia pode causar ainda queda da temperatura corporal (Branco & Wood, 1994; Barros & Branco, 1998). Tamaki & Nakayama (1987) observaram que a hipercapnia promove um aumento da atividade dos neurônios da área pré-óptica do hipotálamo anterior, região essencial para a regulação da temperatura corporal (Boulant, 1998, 2000). Estudo em cobaias recém-nascidas mostrou que a temperatura retal começa a cair quando os animais são expostos a 6% de CO₂ (Farkas & Donhoffer, 1975). Já em ratos, verificou-se uma inibição completa da termogênese, quando os animais foram submetidos a misturas gasosas contendo 10% ou mais de CO₂ (Pepelko & Dixon, 1974). Alguns autores acreditam que a hipotermia induzida por hipercapnia parece não ser consequência de uma queda no metabolismo como ocorre na hipóxia (Bícego *et al.*, 2007) mas uma consequência de perda de calor por hiperpnéia e vasodilatação cutânea (Lai *et al.*, 1981). Neste contexto, Lai *et al.* (1981) demonstraram que o consumo de O₂ aumentou durante a hipercapnia, uma resposta comumente observada com frações de 4 a 7% de CO₂ no ar inspirado (cf. Saiki & Mortola, 1996).

Lesões químicas e eletrolíticas do LC mostraram uma inibição da febre induzida por LPS em ratos quando em condição subtermoneutra (Almeida *et al.*, 2004). Entretanto, sem indução de febre, as lesões não causaram diferença na temperatura corporal dos animais sugerindo que o LC participe de uma via termofetora quando

induzem febre por LPS em condição subnormotérmica (Almeida *et al.*, 2004). Adicionalmente, a exposição de ratos a temperatura ambiente de 10°C (Kiyohara *et al.*, 1995) e de camundongos a 4°C (Yuan *et al.*, 2002) promoveram aumento na expressão de c-fos no LC sugerindo a participação desse núcleo na termorregulação.

A quimiorrecepção central tornou-se foco de intensa pesquisa na área de neurofisiologia já que este tema começa a ser diretamente relacionado às pesquisas clínicas, uma vez que várias evidências sugerem que disfunções na quimiossensibilidade central estão envolvidas em síndromes como morte súbita em neonatos (Obonai *et al.*, 1998), síndrome do pânico (Bailey *et al.*, 2003) e síndrome de Rett (Taneja *et al.*, 2009). Sabe-se ainda que depressão, ansiedade e síndrome do pânico são prevalentes em mulheres (Andrade *et al.*, 2006). Ademais indivíduos com síndrome do pânico apresentam uma sensibilidade aumentada ao CO₂ (Bailey *et al.*, 2003). Aliados a esses fatores: o LC é uma importante área para quimiorrecepção; os hormônios sexuais participam do controle da ventilação; neurônios do LC expressam receptores para estradiol (ER); e fêmeas têm um maior número de neurônios no LC que machos. Desta forma torna-se interessante investigar se existem diferenças nas respostas respiratória e termorreguladora à hipercapnia em fêmeas. Diante disso nossa hipótese é que fêmeas apresentam uma resposta aumentada em relação a machos, em condições hipercápnicas.

2. OBJETIVOS

Em vista das evidências expostas, o presente trabalho teve os seguintes objetivos:

- 1) Avaliar a expressão de c-Fos nos neurônios noradrenérgicos do LC em resposta à hipercapnia em ratos intactos, orquidectomizados tratados com veículo, estradiol ou testosterona, bem como em ratas ciclando em diestro e ovariectomizadas tratadas com veículo ou estradiol;
- 2) Investigar a participação dos neurônios noradrenérgicos do LC nas respostas ventilatória e termorreguladora induzidas por hipercapnia em ratas ovariectomizadas tratadas com veículo ou estradiol por meio de lesão seletiva dos neurônios noradrenérgicos do LC com 6-OHDA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Em todos protocolos foram utilizados ratos e ratas Wistar, pesando de 250 a 310 g. Os animais foram acondicionados à temperatura controlada de $25 \pm 1^\circ \text{C}$ e submetidos a um ciclo claro/escuro de 12/12 hrs. Os animais foram mantidos em caixas plásticas (40x32x17 cm) em grupos de 5 animais.

Inicialmente as fêmeas foram separadas em caixas individuais. Após uma semana de aclimação foi iniciado o processo de esfregaço vaginal. O esfregaço vaginal foi realizado diariamente as 10:00 hrs e analisado a fresco ao microscópio óptico. Somente ratas com pelo menos 3 ciclos estrais regulares e consecutivos foram utilizadas no experimento.

Os protocolos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA) da FCAV-UNESP em oito de Janeiro de 2009 (Protocolo n° 000222-09).

3.2 Procedimentos cirúrgicos

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em animais anestesiados com cetamina (100 mg/Kg, i.p.; Agener, São Paulo, Brasil) e xilazina (10 mg/Kg, i.p.; Coopers, São Paulo, Brasil). Foi feita a assepsia do local usando álcool 70% e o anti-séptico clorexidina.

Ao final das intervenções cirúrgicas os animais foram tratados com antibiótico (10 mg/kg, s.c.; Enrofloxacin, Flotril; Schering-Plough, São Paulo, Brasil) e analgésico (2,5 mg/kg, s.c.; Flunixin meglumina, Banamine; Schering-Plough, São Paulo, Brasil).

3.2.1. Cirurgia estereotáxica

Para a realização das cirurgias estereotáxicas, os animais, após serem anestesiados, foram fixados em um estereotáxico (Kopf Instruments, Kent, Inglaterra).

As lesões químicas do LC foram realizadas através de microinjeções bilaterais da neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA; Sigma Aldrich, MO, USA; Biancardi *et al.*, 2008). Para a microinjeção utilizou-se uma microseringa Hamilton de 5 µL em cuja ponta foi acoplado um tubo de polietileno com uma agulha gengival que foi posicionada na torre do aparelho estereotáxico. O tubo de polietileno foi preenchido com solução e a agulha foi inserida no LC segundo coordenadas adaptadas de Paxinos & Watson (1998) (angulação da torre: 15°, AP: -3,1; -3,4 e -3,7 mm do lambda, L: ±1,2 mm do lambda, DV: -7,0 mm do osso). Para microinjetar a solução utilizou-se uma bomba de microinjeção (modelo 310, Stoelting Co, Il, EUA). Foi então microinjetado 0,750 µL da solução de 6-OHDA (8 µg/µL; Biancardi *et al.*, 2008) ou 0,750 µL do veículo (1 µg/0,1 µL; ácido ascórbico - Sigma Aldrich, MO, USA) em cada lado do LC.

Visando atingir toda extensão do LC (porção rostral, medial e caudal do núcleo) foram realizadas 3 microinjeções bilaterais no núcleo com distância de 0.3mm entre cada ponto. Em cada ponto foi microinjetado 0,250 µL de solução (6-OHDA ou veículo) ao longo de 6 min cada microinjeção, totalizando 0,750 µL em cada lado do LC.

3.2.2. Castração e Reposição Hormonal

As fêmeas, após serem anestesiadas, passaram pela remoção dos ovários (ovariectomia) por uma incisão central na região abdominal 10 dias antes dos experimentos. Durante 3 dias consecutivos que antecederam o experimento as ratas foram tratadas com 17β-estradiol (grupo OVX+E2 - 10 µg/0,2 mL/rata, s.c., Oestradiol

Cypionate; Pfizer, São Paulo, Brasil; Szawka *et al.*, 2009) ou óleo de milho (grupo OVX - 0,2 mL/rata, s.c., Liza; Cargill, São Paulo, Brasil) às 10:00 hrs. Os experimentos foram realizados no dia seguinte ao término do tratamento.

Os machos foram submetidos à remoção dos testículos (orquidectomia) por uma incisão na bolsa escrotal 10 dias antes dos experimentos. Ratos orquidectomizados foram tratados com óleo de milho (grupo ORX - 0,2 mL/rato, s.c., Liza; Cargill, São Paulo, Brasil, durante 7 dias consecutivos e anteriores ao experimentos) ou com estradiol (grupo ORX+E2 - 10 µg/0,2 mL/rato, s.c., Oestradiol Cypionate; Pfizer, São Paulo, Brasil; Szawka *et al.*, 2009, durante 3 dias consecutivos e anteriores ao experimento) ou ainda com testosterona (grupo ORX+T - 0,25 mg/0,2 mL/rato, s.c., Propionato de Testosterona; Kalil *et al.*, 2013 , durante 7 dias consecutivos e anteriores ao experimentos). Os experimentos foram realizados no dia seguinte ao término do tratamento.

As fêmeas do grupo diestro e os machos do grupo intacto não passaram por nenhuma intervenção cirúrgica nem tratamentos com fármacos.

3.3. Medidas da temperatura corporal (T_c)

Um sensor e registrador de temperatura integrado (“data loggers”) (SubCue, Calgary, AT, Canadá) foi implantado na cavidade abdominal dos animais, através de uma incisão na parede abdominal, com 24 hrs antes do experimento. Previamente, os “data loggers” foram conectados a um computador, via conexão óptica e programados para a coleta de dados ao longo do experimento com leituras de temperatura a cada 5 min utilizando-se o programa “SubCue temperature data logger software”.

3.4. Determinação da Ventilação

A ventilação foi medida por pletismografia de corpo inteiro em sistema fechado (Bartlett & Tenney, 1970). Durante os experimentos os animais foram mantidos em caixas acrílicas com volume de 5 litros. O fluxo de gases no interior das câmaras foi medido por um fluxômetro (Modelo 822-13-OV1-PV2-V4, Sierra Instruments, Monterey, CA) e foi mantido de 0,8 a 1 L/min. A câmara foi ventilada com ar ambiente e com a mistura gasosa de 7% de CO₂, 21% de O₂ e equilibrada com N₂ (White Martins, Sertãozinho, Brasil). Durante as medidas da ventilação, o fluxo foi interrompido e a câmara permaneceu totalmente vedada por curto período de tempo (± 1 min). A temperatura no interior da câmara foi de $25,3 \pm 0,08^\circ \text{C}$ (mean \pm EPM), e a temperatura da sala foi de $24,4 \pm 0,07^\circ \text{C}$ (mean \pm EPM).

As oscilações da temperatura do ar da câmara, causadas pela respiração, foram medidas como oscilações de pressão pelo fato do volume de ar corrente inspirado ser aquecido da temperatura da câmara à temperatura corporal e saturado com vapor de água, enquanto que o volume de ar corrente expirado é novamente esfriado até a temperatura da câmara.

Sinais de um transdutor de pressão (TSD 160A, Biopac Systems, Santa Barbara, CA), conectado à câmara do animal e a uma câmara de referência, foram coletados por um pré-amplificador, passando através de um conversor analógico-digital, digitalizados num computador equipado com um programa para aquisição e análise de dados (AcqKnowledge MP 100, BioPac Systems, Inc., Santa Barbara, CA, EUA).

A calibração do volume foi obtida durante cada experimento, injetando um volume conhecido de ar dentro da câmara do animal (1 mL) com o uso de uma seringa graduada. Duas variáveis respiratórias foram medidas: a frequência respiratória (fR) e o volume corrente (V_T), o último calculado através da fórmula:

$$V_T = PT / PK \times VK \times TA / TR \times (PB - PA) / PB - TA/TC (PB - PC)$$

Onde:

V_T : Volume de ar corrente

PT: Deflexão de pressão associada com cada V_T

PK: Deflexão de pressão associada ao volume de ar injetado para calibração

VK: Volume de ar injetado na câmara do animal para calibração

TA: Temperatura do ar dentro da câmara

TR: temperatura ambiente

PB: Pressão barométrica

PA: Pressão do vapor d'água dentro da câmara

TC: Temperatura corporal (em Kelvin)

PC: Pressão do vapor d'água da temperatura corporal

A ventilação (V_E) foi medida pelo produto de fR por V_T . A V_E e o V_T foram apresentados nas condições de pressão barométrica ambiente à T_c e saturados com vapor d'água (BTPS).

3.5. Dupla marcação imunistoquímica para c-Fos e TH

Os animais foram anestesiados com solução de cetamina/xilazina e perfundidos através da artéria aorta ascendente, com tampão fosfato salina (PBS, 0,01 M, pH 7,4; 1 mL/g do animal) seguido de paraformaldeído 4% em tampão fosfato (PB, 0,1 M, pH 7,4) (PFA 4%; 1 mL/g do animal).

Os encéfalos foram removidos da caixa craniana e pós-fixados em PFA 4% por 4 hrs a 4° C. Posteriormente, os encéfalos foram mantidos em solução de sacarose 30% em PBS (0,1 M) à 4° C até que afundassem. Os encéfalos foram então congelados em

isopentano (99%, Synth, Diadema, São Paulo, Brazil) por 1 min e embebido em Tissue Tek O.C.T. Secções coronais de 30 µm da extensão rostro-caudal do LC foram cortadas em criostato (Leica modelo CM1850, Alemanha) e armazenados, a -20°C, em solução crioprotetora (solução de PBS 0,01M contendo 30% de sacarose, 30% de etilenoglicol e 1% de polivinilpirrolidona) até o momento de realizar a imunistoquímica.

A reação de dupla-marcação para machos e a reação de dupla-marcação para fêmeas foram realizadas separadamente, por isso estão descritos abaixo diferentes anticorpos e diluições. Tais reações foram adaptadas de Bernuci *et al.* (2008) e Szawka *et al.* (2009).

A dupla-marcação imunistoquímica para c-Fos e TH foi realizada pelo método de free-floating. Entre cada passo da imunistoquímica, as secções foram lavadas em PBS e, exceto quando mencionado, todas as soluções foram preparadas em PBS. Após remoção da solução crioprotetora, as secções foram lavadas em glicina 0,1 M e incubadas em H₂O₂ 1% por 30 min, Triton X-100 (TX-100) 0,4% por 30 min e albumina bovina (BSA) 3% por 1 hr.

Os cortes foram incubados com anticorpo primário anti-c-Fos produzido em coelho (Ab-5, Calbiochem, Gibbstown, NJ, EUA) a 1:15.000 por 40 hrs em PBS contendo TX-100 0,3% e BSA 1% (solução utilizada na diluição de todos os anticorpos primários e secundários) a 4° C. Posteriormente os cortes foram incubados com anticorpo secundário (nos machos: anticorpo produzido em cavalo, Kit ABC Elite, PK-6200, Vector/nas fêmeas: anti-coelho, Kit ABC Elite, BA-1000, Vector, CA, USA), 1:600 por 2 hrs, e com o complexo avidina DH-peroxidase biotinizada (Kit ABC Elite, Vector, CA, USA) a 1:400 (reagentes A e B) por 1 hr.

A reação final para c-Fos foi realizada com solução contendo 3,3'diaminobenzidina-HCl (DAB, 0,2 mg/mL; Sigma Aldrich, MO, USA), sulfato de

níquel (25 mg/mL) e H₂O₂ (1 µL/mL de uma solução de H₂O₂ 30%) em tampão acetato 0,175 M (pH = 7,5) por 20 min agitando a temperatura ambiente.

Após incubação com H₂O₂ 1% por 6 min, as secções foram incubadas com anticorpo primário anti-TH, produzido em camundongo (anti-TH 2, Sigma Aldrich, MO, USA), a 1:100.000 nos machos e 1:500.000 nas fêmeas, por 40 hrs. Posteriormente os cortes foram incubados com anticorpo secundário (nos machos: anticorpo produzido em cavalo, Kit ABC Elite, PK-6200, Vector/nas fêmeas: anti-mouse, Kit ABC Elite, BA-2001, Vector, CA, USA), 1:600 por 2 hrs e com o mesmo complexo avidina DH-peroxidase biotilada (Kit ABC Elite, Vector, CA, USA) na mesma diluição e pelo mesmo tempo.

A reação final para TH foi realizada com solução de DAB (0,2 mg/mL; Sigma Aldrich, MO, USA) e H₂O₂ (1 µL/mL de uma solução de H₂O₂ 30%) porém em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH = 7,6) e sem níquel.

Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas. A contagem dos neurônios duplamente marcados (c-Fos/TH) foi realizada diretamente no microscópio Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Munich, Alemanha), no aumento de 20x, sem conhecimento prévio dos grupos experimentais. A contagem foi feita bilateralmente no LC abrangendo toda a extensão do núcleo (-9.16 a -10.32 mm do bregma). As fotomicrografias foram capturadas usando o software AxioVision (Carl Zeiss, Munich, Alemanha).

3.6. Avaliação da localização e efetividade da lesão

Ao final dos experimentos, os animais foram profundamente anestesiados com solução de cetamina e xilazina e perfundidos através da artéria aorta ascendente com tampão fosfato salina (PBS, 0,01 M, pH 7,4; 1 mL/g do animal), seguido por

paraformaldeído 4% em tampão fosfato (PB, 0,1 M, pH 7,4) (PFA 4%; 1 mL/g do animal).

Os encéfalos foram removidos da caixa craniana e pós-fixados em PFA 4% por 4 hrs a 4° C. Posteriormente foram mantidos em solução de sacarose 30% em PBS (0,1 M) à 4° C até que afundassem. Os encéfalos foram então congelados em isopentano (99%, Synth, Diadema, São Paulo, Brasil) por 1 min, embebidos em Tissue Tek O.C.T. e cortados no criostato (Leica modelo CM1850, Alemanha) em secções de 25 µm da extensão rostro-caudal do LC.

Para verificar a localização e a efetividade da lesão foi realizada imunistoquímica conforme Biancardi *et al.* (2008), pelo método de free-floating, para TH, que é um marcador de neurônios catecolaminérgicos (Xu *et al.*, 2003). Entre cada passo da imunistoquímica, as secções foram lavadas em PBS. Os cortes foram inicialmente lavados para remoção da solução crioprotetora e incubadas em H₂O₂ 1% por 5 min. A partir daí, foram então incubados por 48 hrs com anticorpo monoclonal de camundongo anti-TH (1:10000, Sigma Aldrich, MO, USA) em PBS contendo TX-100 0,2% e BSA 0,1% (solução utilizada na diluição dos anticorpos primário e secundário) a 4° C seguido por uma incubação de 2 hrs com anticorpo secundário biotinilado anti-mouse produzido em coelho (1:1000, Dako, Dinamarca). O anticorpo biotinilado foi complexado com avidina DH: peroxidase biotinilada (Kit ABC, PK-4001, Vector, CA, USA), e o complexo foi desenvolvido pela adição de cromogênio di-hidroclorato de diaminobenzidina (Kit DAB, SK-4100, Vector, CA, USA) para visualizar a marcação dos neurônios catecolaminérgicos.

Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas. Para contagem dos neurônios noradrenérgicos do LC imagens foram capturadas por um microscópio Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Munich, Alemanha) e as fotos foram analisadas usando o

sistema de análise Image J (US National Institutes of Health). A contagem foi realizada bilateralmente no LC abrangendo toda a extensão do núcleo (-9.16 a -10.32 mm do bregma).

O grupo controle da imunistoquímica foi composto por fêmeas intactas não submetidas a qualquer intervenção cirúrgica ou experimento. Essas fêmeas controle também foram utilizadas na contagem de neurônios noradrenérgicos.

3.7. Medida do peso do útero e da vesícula seminal

Para confirmar a eficiência dos tratamentos hormonais nos animais submetidos ao experimento de c-Fos o peso dos úteros das fêmeas e das vesículas seminais dos machos foram medidos. Durante a perfusão dos animais o útero ou a vesícula seminal era coletado e o peso era medido a fresco.

3.8. Dosagem Hormonal

As dosagens hormonais foram realizadas no Laboratório de Neuroendocrinologia da reprodução da Profa. Dra. Janete Anselmo Franci (FORP-USP). Em todos os protocolos descritos acima foi realizada punção cardíaca imediatamente após o experimento. Para isso os animais foram profundamente anestesiados com solução de cetamina/ xilazina e aproximadamente 1 mL de sangue foi retirado utilizando seringa lavada com solução de heparina (1 mL de heparina 5000 Ui/mL para 20 mL de NaCl 0,9%). O sangue foi centrifugado a 4° C, por 20 min, 3000 rpm. Após centrifugação o sobrenadante foi retirado e armazenado a -20° C.

As concentrações plasmáticas de estradiol e testosterona foram determinadas por radioimunoensaio utilizando kits específicos da MP Biomedicals (Orangeburg, NY,

USA) seguindo as instruções do fabricante. Com o objetivo de evitar variações interensaio, todas as amostras foram analisadas no mesmo ensaio. A sensibilidade para o teste de estradiol e testosterona foi de 0,07 ng/mL e 8,6 pg/mL, respectivamente. O coeficiente de variação intra-ensaio foi 7,2% para estradiol e 7,6% para testosterona.

3.9. Análise dos Dados

Os valores obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Os dados ventilatórios, de temperatura e as concentrações plasmáticas dos hormônios foram analisados usando análise de variância de duas vias (Two-way ANOVA) e o teste de Bonferroni foi usado como pós-teste.

Para análise das comparações entre o peso dos úteros e das vesículas seminais e porcentagem de redução dos neurônios noradrenérgicos do LC após tratamento com 6-OHDA foi feita a análise de variância de uma via (One-way ANOVA).

Para análise do número de neurônios duplamente marcados (c-Fos/TH) no LC no grupo diestro foi usado o Teste t e nos demais grupos foi usado Two-way ANOVA. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism (La Jolla, CA, USA). Em todas as análises foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

3.10 Protocolos Experimentais

3.10.1. Efeito da hipercapnia na expressão de c-Fos nos neurônios noradrenérgicos do LC em fêmeas ciclando em diestro

Após realizar por 3 semanas o esfregaço vaginal comprovando a regularidade do ciclo estral, as ratas em diestro foram adaptadas à câmara experimental ventilada com ar

atmosférico 1 hr por dia, sempre no mesmo horário, durante 3 dias consecutivos e anteriores ao experimento com a finalidade de evitar a expressão de c-Fos devido a estímulos inespecíficos. Além disso, as caixas foram externamente encapadas com papel adesivo contact branco de forma que a luz penetrasse na caixa porém sem que o rato enxergasse o exterior, e a sala permaneceu em silêncio para evitar que o meio externo interferisse no experimento. Desta forma, tentamos assegurar o máximo possível que a hipercapnia foi o único estímulo para expressão de c-Fos.

No 4º dia (após os 3 dias de aclimatação), as ratas foram expostas à normóxia normocápnica (ar atmosférico) ou normóxia hipercápnica (7% CO₂, 21% O₂ e N₂ balanço) por 2 hrs de acordo com estudo prévio (Teppema *et al.*, 1997). Os experimentos de c-Fos com as fêmeas foram realizadas entre 7:00 e 13:00 hrs. O diestro das fêmeas era comprovado antes e após os experimentos para garantia de que o experimento havia sido todo realizado com a fêmea na fase do ciclo em questão.

Os animais foram perfundidos, e os encéfalos processados para dupla-marcação imunistoquímica de c-Fos e TH no LC.

3.10.2. Efeito dos hormônios sexuais na resposta dos neurônios noradrenérgicos do LC à hipercapnia em machos e fêmeas

Após a cirurgia de castração, os animais foram mantidos em caixas individuais. O experimento foi conduzido em machos intactos, orquidectomizados tratados com óleo (veículo-ORX), ou com estradiol (ORX+E2) ou ainda com testosterona (ORX+T) e em fêmeas ovariectomizadas tratadas com óleo (veículo-OVX) ou com estradiol (OVX+E2). Os animais foram adaptados à câmara experimental ventilada com ar atmosférico 1 hr por dia, sempre no mesmo horário, durante 3 dias consecutivos e anteriores ao experimento com a finalidade de evitar a expressão de c-Fos devido a

estímulos inespecíficos. Da mesma forma que no protocolo anterior, as caixas foram externamente encapadas e a sala permaneceu em silêncio para evitar que o meio externo interferisse no experimento assegurando que a hipercapnia fosse o único estímulo para expressão de c-Fos.

No 4º dia (após os 3 dias de aclimação), os animais foram expostos à normóxia normocápnica (ar atmosférico) ou normóxia hipercápnica (7% CO₂, 21% O₂ e N₂ balanço) por 2 hrs de acordo com estudo prévio (Teppema *et al.*, 1997). Os experimentos de c-Fos com as fêmeas foram realizados entre 7:00 e 13:00 hrs e com os machos entre 13:00 e 17:00 hrs. Ao final dos experimentos, esfregaço vaginal das ratas foi realizado para comprovar a eficiência da castração e do tratamento hormonal já que ratas OVX deveriam apresentar-se em diestro e ratas OVX+E2 em estro.

Os animais foram perfundidos, e os encéfalos processados para dupla-marcação imunohistoquímica de c-Fos e TH no LC.

3.10.3. Efeito do estradiol sobre a resposta de ventilação e da temperatura corporal à hipercapnia de fêmeas submetidas à lesão dos neurônios noradrenérgicos do LC

As ratas não resistiram a duas intervenções cirúrgicas no mesmo dia. Portanto, nestes animais, a ovariectomia foi realizada no dia antecedente a cirurgia estereotáxica. Após as cirurgias os animais foram mantidos em caixas individuais. O experimento foi conduzido em fêmeas ovariectomizadas tratadas com óleo (veículo-OVX) ou com estradiol (OVX+E2).

Sete dias após a estereotaxia, os animais foram previamente colocados em uma câmara pletismográfica e a Tc foi continuamente medida por dataloggers. A câmara foi inicialmente ventilada com ar atmosférico por um período de aclimação de no mínimo

30 min. Foram então realizadas medidas controle de ventilação. Em seguida, o animal foi submetido à hipercapnia, por 45 min, onde a câmara foi ventilada com uma mistura gasosa contendo 7% de CO₂, 21% de O₂ e equilibrada com N₂. Após a hipercapnia, iniciou-se a recuperação (ventilação com ar atmosférico) por 30 min. Os experimentos de ventilação foram realizados entre 8:00 e 13:00 hrs.

Os animais foram perfundidos, e os encéfalos processados para imunistoquímica para confirmar se os neurônios noradrenérgicos do LC foram lesados. Ao final dos experimentos, esfregaço vaginal das ratas era realizado para comprovar a eficiência da castração já que ratas OVX deveriam permanecer em diestro e ratas OVX+E2 em estro.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito da hipercapnia na expressão de c-Fos nos neurônios noradrenérgicos do LC em fêmeas ciclando em diestro

A Figura 1 apresenta fotomicrografias de secções transversais da ponte mostrando colocalização da proteína fos e a enzima TH por meio de imunistoquímica em neurônios do LC em fêmeas durante diestro (Fig. 1A) em condições normocápnicas (n=4) e hipercápnicas (n=4).

O número de neurônios noradrenérgicos positivos para c-Fos aumentou em condições hipercápnicas (Fig. 1B; $3,6 \pm 0,9$ c-Fos/TH-ir neurônios/secção durante normocapnia e $7,5 \pm 3,7$ c-Fos/TH-ir neurônios/secção durante a hipercapnia; $P < 0,05$; Teste t).

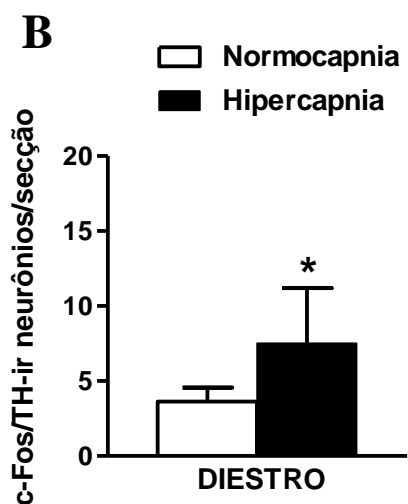
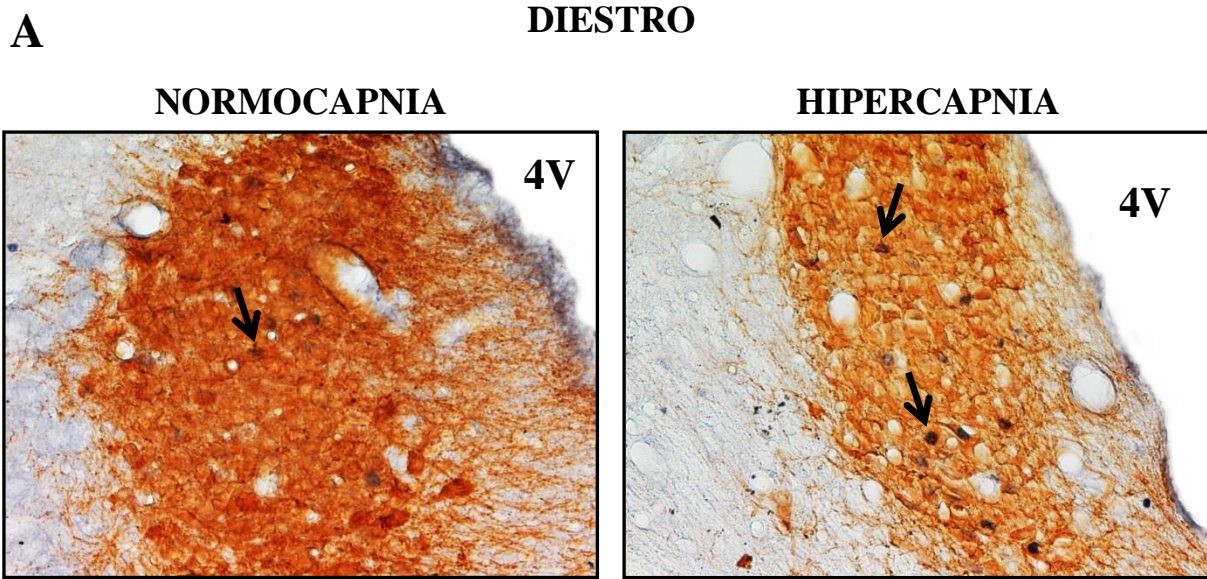


Figura 1. (A) Fotomicrografias representativas da colocalização imunoistoquímica para c-Fos e tirosina hidroxilase (TH) no *Locus coeruleus* (LC) de fêmeas do grupo diestro em condições normocápnicas e hipercápnicas (7% CO₂). 4V: 4° Ventrículo. As setas indicam alguns dos neurônios com dupla marcação (c-Fos e TH). Aumento de 20x. Barra de calibração: 50 µm. **(B)** Número de neurônios com colocalização de c-Fos e tirosina hidroxilase (c-Fos/TH-ir neurônios/secção) no LC de fêmeas em diestro em condições basais e hipercápnicas (7% CO₂). *Indica diferença entre normocapnia e hipercapnia (P<0,05; Teste t).

4.2. Efeito dos esteróides sexuais na resposta dos neurônios noradrenérgicos do LC à hipercapnia em machos e fêmeas

A Figura 2 apresenta fotomicrografias de secções transversais da ponte mostrando colocalização da proteína fos e enzima TH através de imunistoquímica no LC em fêmeas ovariectomizadas tratadas com veículo (Fig. 2A; OVX) e em fêmeas com reposição hormonal de estradiol (Fig. 2B; OVX+E2) em condições normocápnicas (n=4) e hipercápnicas (n=4).

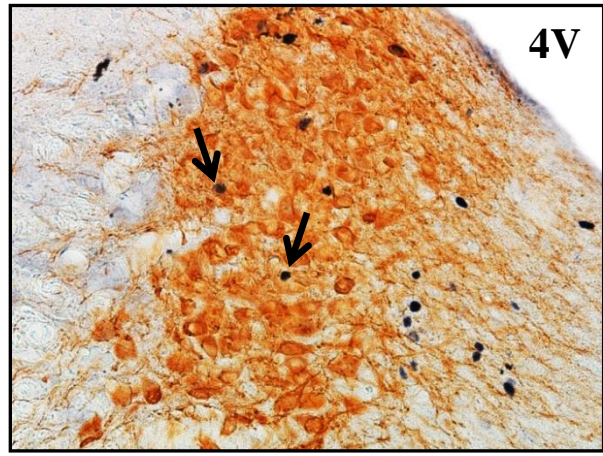
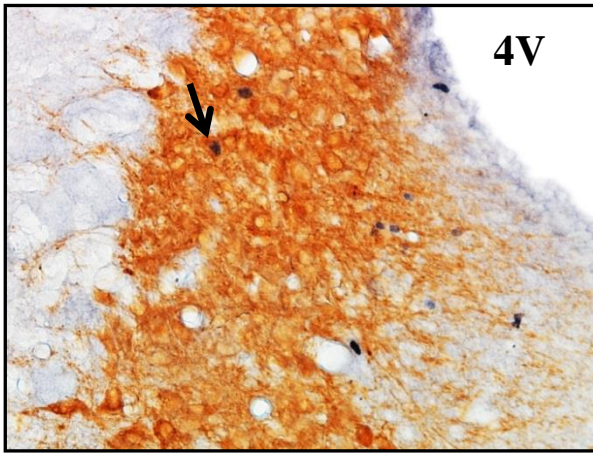
A hipercapnia causou aumento na imunorreatividade (dupla marcação para c-Fos e TH) nas fêmeas OVX (Fig. 2C; $7,6 \pm 1,9$ c-Fos/TH-ir neurônios/secção; $P < 0,05$; Two-way ANOVA) e nas fêmeas OVX+E2 (Fig. 2C; $4 \pm 0,8$ c-Fos/TH-ir neurônios/secção; $P < 0,05$; Two-way ANOVA) em relação à imunorreatividade em condições basais ($3,3 \pm 0,6$ e $1,9 \pm 0,1$ c-Fos/TH-ir neurônios/secção, respectivamente). Entretanto, a dupla marcação no grupo OVX+E2, tanto durante a normocapnia quanto em resposta a hipercapnia, foi atenuada em relação ao grupo das fêmeas OVX nas mesmas condições (Fig. 2C; $P < 0,05$; Two-way ANOVA).

A

OVX

NORMOCAPNIA

HIPERCAPNIA

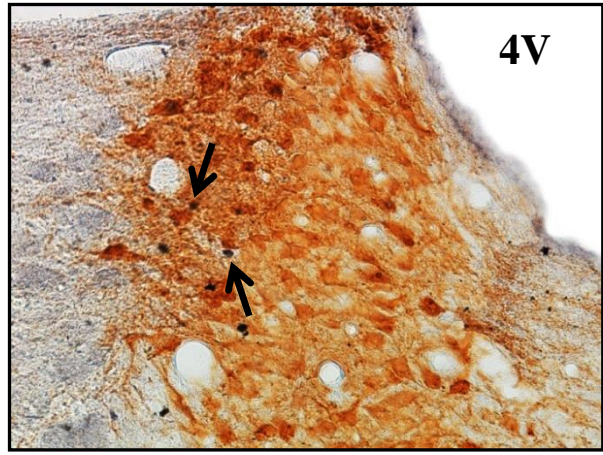
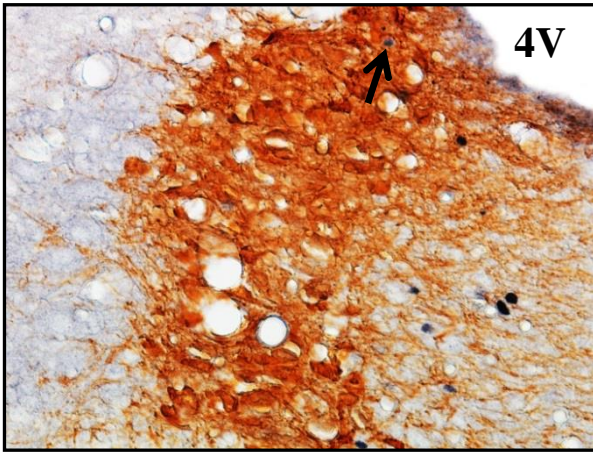


B

OVX+E2

NORMOCAPNIA

HIPERCAPNIA



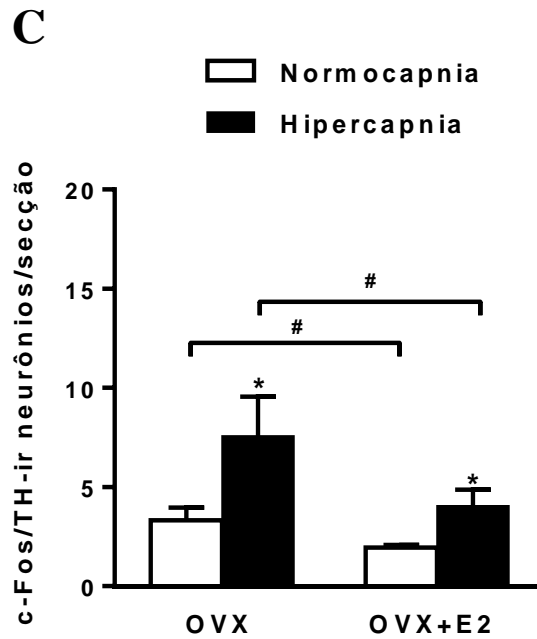
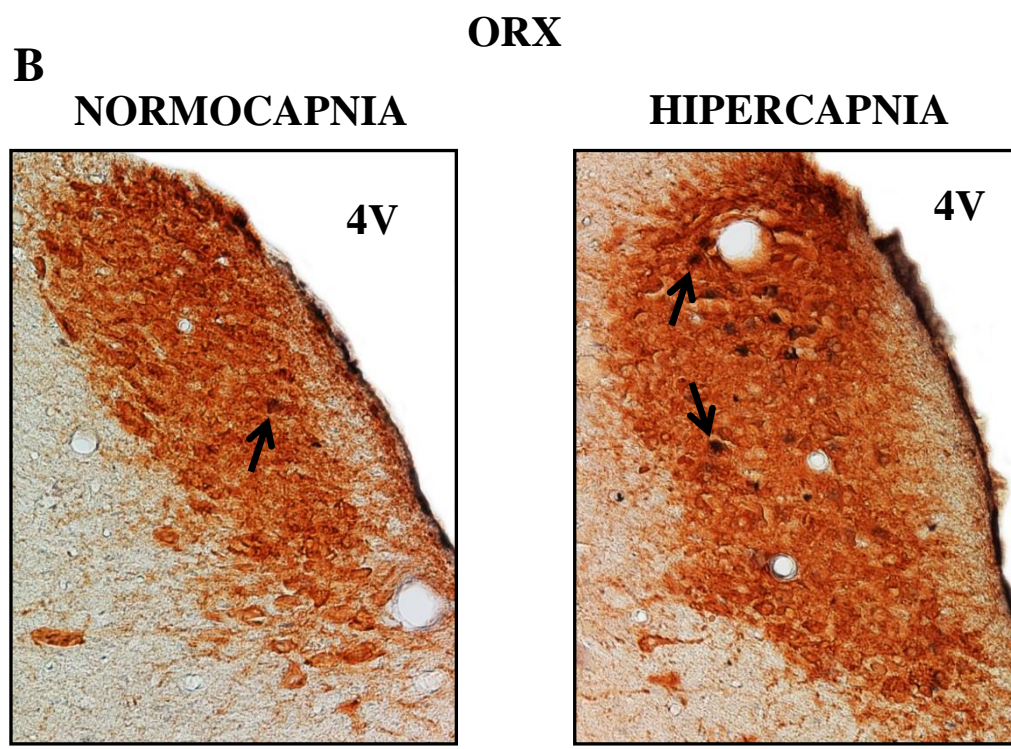
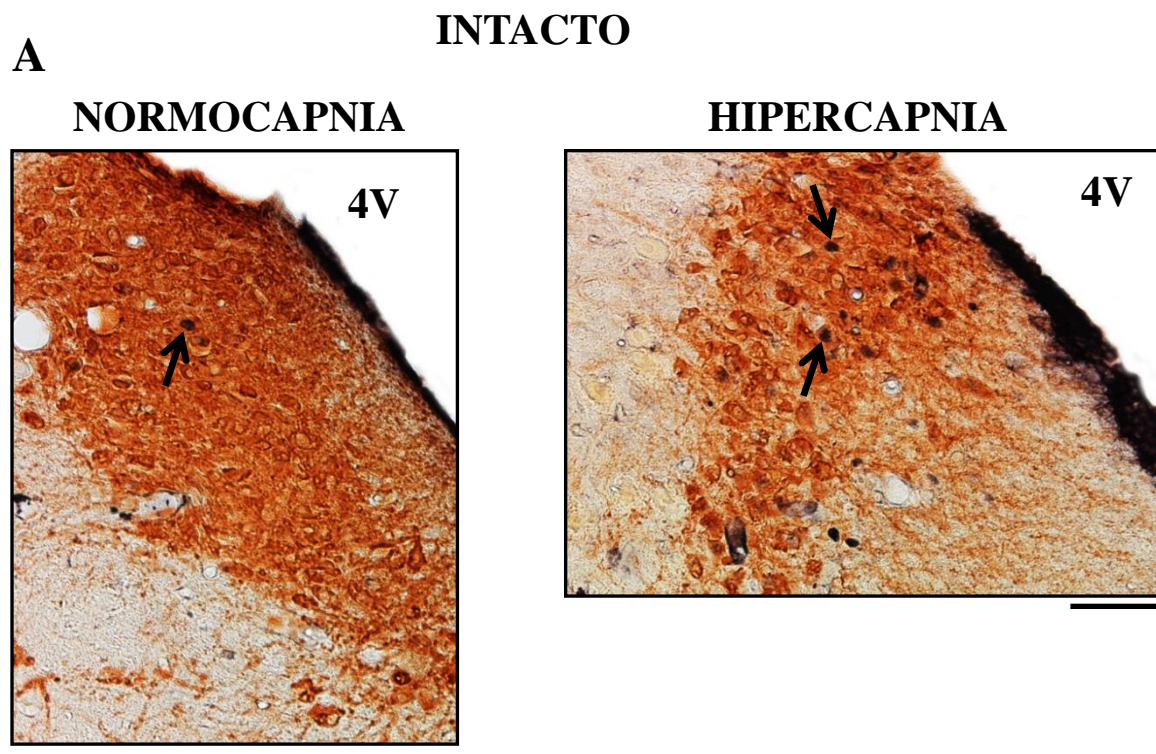


Figura 2. (A e B) Fotomicrografias representativas da colocalização imunoistoquímica para c-Fos e tirosina hidroxilase (TH) no *Locus coeruleus* (LC) de fêmeas ovariectomizadas tratadas com veículo (OVX) ou estradiol (OVX+E2) em condições normocápnicas e hipercápnicas (7% CO₂). 4V: 4° Ventrículo. As setas indicam alguns dos neurônios com dupla marcação (c-Fos e TH). Aumento de 20x. Barra de calibração: 50 µm. (C) Número de neurônios com colocalização de c-Fos e TH (c-Fos/TH-ir neurônios/secção) no LC de fêmeas OVX e fêmeas OVX+E2 em condições basais e hipercápnicas (7% CO₂). *Indica diferença entre normocapnia e hipercapnia, dentro dos grupos (P<0,05; Two-way ANOVA). # Indica diferença entre os grupos, dentro de uma mesma condição (normocapnia ou hipercapnia) (P<0,05; Two-way ANOVA).

A Figura 3 apresenta fotomicrografias de secções transversais da ponte mostrando colocalização da proteína fos e enzima TH através de imunistoquímica no LC em machos intactos (Fig. 3A), machos castrados (ORX; Fig. 3B), machos com reposição de estradiol (ORX+E2; Fig. 3C) e em machos com reposição de testosterona (ORX+T; Fig. 3D) em condições normocápnicas (intactos n=5; ORX n=4; ORX+E2 n=3; ORX+T n=4) e hipercápnicas (intactos n=6; ORX n=5; ORX+E2 n=5; ORX+T n=5).

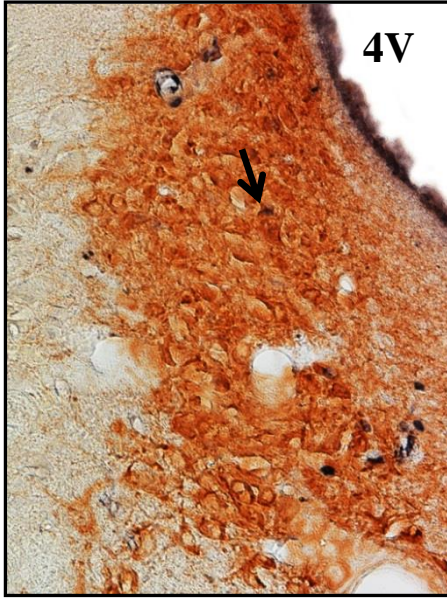
A hipercapnia promoveu aumento na expressão de c-Fos nos neurônios noradrenérgicos do LC no grupo intacto ($9,7 \pm 2,3$ c-Fos/TH-ir neurônios/secção), grupo ORX ($7,6 \pm 4$ c-Fos/TH-ir neurônios/secção), grupo ORX+T ($8,1 \pm 3,2$ c-Fos/TH-ir neurônios/secção) e grupo ORX+E2 ($11,3 \pm 4,4$ c-Fos/TH-ir neurônios/secção) em comparação a normocapnia ($3,9 \pm 1$; $2,3 \pm 0,7$; 4 ± 2 ; $2,1 \pm 0,6$ c-Fos/TH-ir neurônios/secção, respectivamente; $P < 0,05$; Two-way ANOVA). Entretanto, a castração e os tratamentos hormonais com estradiol e testosterona não promoveram alteração na dupla marcação (c-Fos/TH-ir) dos neurônios do LC entre os grupos de machos (Fig. 3E).



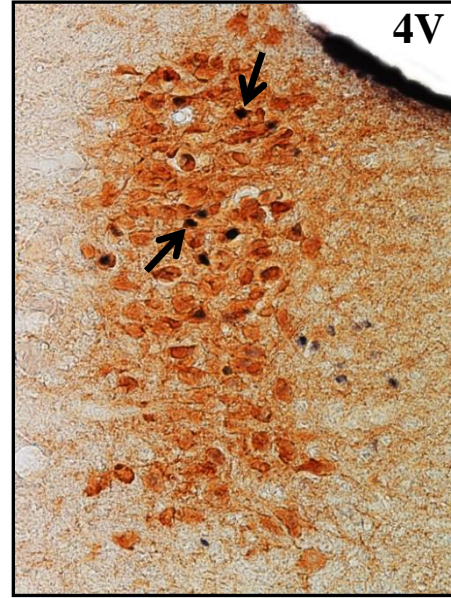
C

ORX+E2

NORMOCAPNIA



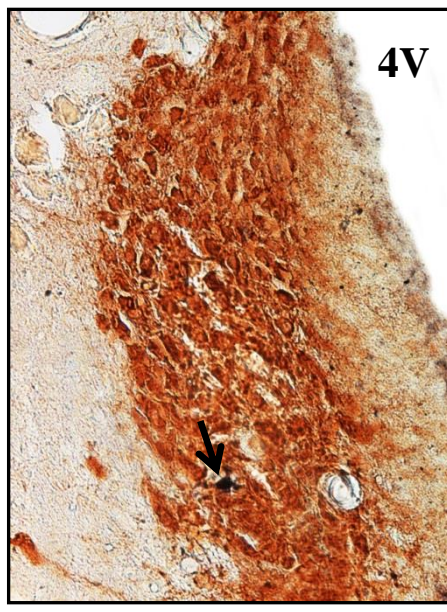
HIPERCAPNIA



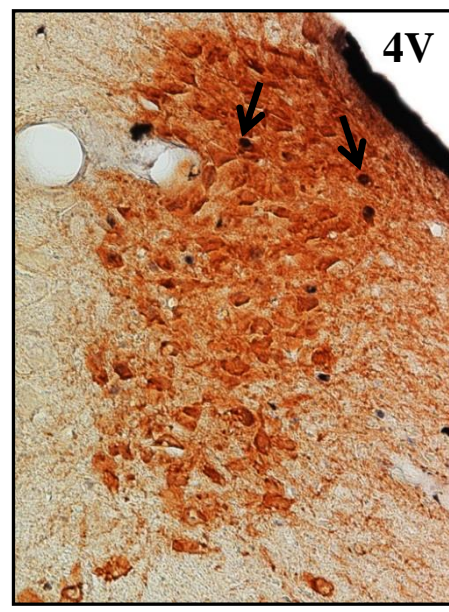
D

ORX+T

NORMOCAPNIA



HIPERCAPNIA



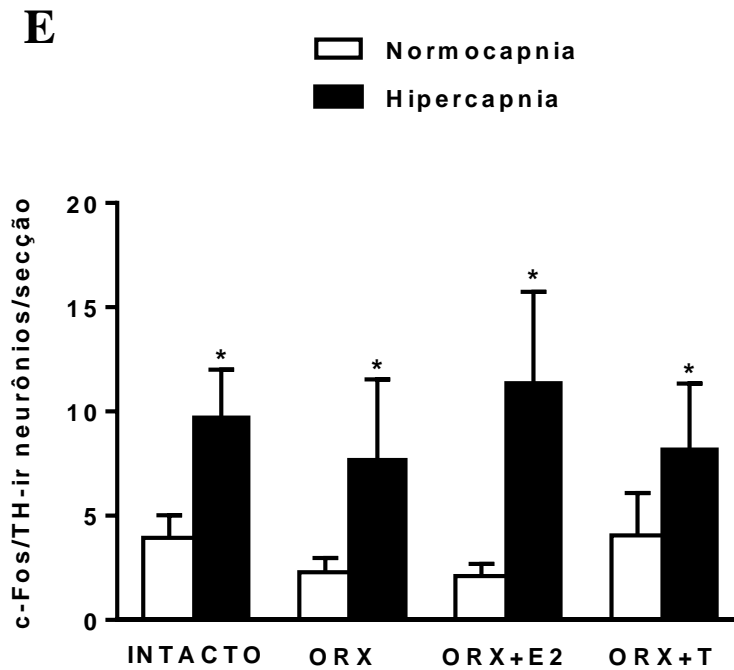


Figura 3. (A, B, C e D) Fotomicrografias representativas da colocalização imunoistoquímica para c-Fos e tirosina hidroxilase (TH) no *Locus coeruleus* (LC) de machos intactos, castrados (ORX), com reposição de estradiol (ORX+E2) ou com reposição de testosterona (ORX+T) em condições normocápnicas e hipercápnicas (7% CO₂). 4V: 4º Ventrículo. As setas indicam alguns dos neurônios com dupla marcação (c-Fos e TH). Aumento de 20x. Barra de calibração: 50 µm. **(E)** Número de neurônios com colocalização de c-Fos e TH (c-Fos/TH-ir neurônios/secção) no LC de machos em condições basais e hipercápnicas (7% CO₂). *Indica diferença entre normocapnia e hipercapnia, dentro dos grupos (P<0,05; Two-way ANOVA).

4.3. Dosagem hormonal dos animais sujeitos aos experimentos de c-Fos

Na tabela 1 estão descritas as concentrações plasmáticas de testosterona e estradiol em ratos (intactos, ORX, ORX+E2 e ORX+T) que foram submetidos ao experimento de c-Fos. A hipercapnia não promoveu alteração na concentração dos hormônios. O grupo ORX+E2 apresentou maior concentração de estradiol em relação aos demais grupos ($P < 0,001$; Two-way ANOVA). A castração não promoveu alteração nas concentrações plasmáticas de E2. Portanto, não houve diferença na concentração de E2 nos grupos intacto, ORX e ORX+T.

O grupo ORX+T apresentou concentração elevada de testosterona em relação aos grupos ORX+E2 e ORX ($P < 0,001$; Two-way ANOVA) e em relação ao grupo intacto ($P < 0,05$; Two-way ANOVA). As concentrações plasmáticas de testosterona foram significativamente diminuídas nos grupos castrados ORX e ORX+E2 em relação ao grupo intacto ($P < 0,05$; Two-way ANOVA).

A tabela 2 apresenta as concentrações plasmáticas de estradiol em fêmeas (diestro, OVX e OVX+E2) que foram submetidas ao experimento de c-Fos.

O estradiol não foi alterado em condições hipercápnicas em nenhum dos grupos. Entretanto o grupo OVX+E2 apresentou maior concentração de estradiol em relação aos grupos diestro ($P < 0,05$; Two-way ANOVA) e OVX ($P < 0,001$; Two-way ANOVA). Como os ovários produzem estradiol, a castração reduziu as concentrações desse hormônio no grupo OVX em relação ao grupo diestro ($P < 0,05$; Two-way ANOVA).

Tabela 1. Concentrações plasmáticas de testosterona e estradiol em machos intactos, ORX, ORX+T e ORX+E2, submetidos ao experimento de c-Fos, em condições hipercápnicas e normocápnicas.

	<i>TESTOSTERONA (ng/mL)</i>		<i>ESTRADIOL (pg/mL)</i>	
	<i>Normocapnia</i>	<i>Hipercapnia</i>	<i>Normocapnia</i>	<i>Hipercapnia</i>
<i>INTACTO</i>	0,78 ± 0,2 (n=5)	1 ± 0,4 (n=6)	80,5 ± 5,2 (n=6)	70,5 ± 5,8 (n=6)
<i>ORX</i>	0,01 ± 0,004* (n=6)	0,01 ± 0,005* (n=6)	56,3 ± 9,8 (n=5)	50,4 ± 2,7 (n=6)
<i>ORX+E2</i>	0,01 ± 0,002* (n=6)	0,01 ± 0,006* (n=6)	153,9 ± 10,5# (n=4)	129,0 ± 13,2# (n=6)
<i>ORX+T</i>	1,5 ± 0,1*+ (n=4)	2 ± 0,4*+ (n=4)	69,2 ± 6,8 (n=5)	77,6 ± 14,8 (n=5)

Os valores são expressos como média ± E.P.M. Estatística realizada entre animais submetidos ao mesmo tratamento hormonal. *Diferente do grupo intacto (P<0,05). +Diferente dos grupos ORX e ORX+E2 (P<0,001). #Diferente dos grupos intacto, ORX e ORX+T (P<0,001). (Two-way ANOVA).

Tabela 2. Concentrações plasmáticas de estradiol em fêmeas dos grupos diestro, OVX e OVX+E2, submetidas ao experimento de c-Fos, em condições hipercápnicas e normocápnicas.

<i>ESTRADIOL (pg/mL)</i>		
	<i>Normocapnia</i>	<i>Hipercapnia</i>
<i>DIESTRO</i>	104,2 ± 10,2 (n=6)	88 ± 4 (n=6)
<i>OVX</i>	78,6 ± 8,5* (n=4)	54,6 ± 10* (n=6)
<i>OVX+E2</i>	144,2 ± 10,2*+ (n=6)	134,1 ± 10,8*+ (n=6)

Os valores são expressos como média ± E.P.M. *Diferente do grupo diestro (P<0,05). +Diferente do grupo OVX (P<0,001). (Two-way ANOVA)

4.4. Peso do útero e vesícula seminal dos animais sujeitos aos experimentos de c-Fos

Para confirmar a eficiência do tratamento hormonal com estradiol, nas fêmeas, e dos tratamentos com estradiol e testosterona, nos machos, submetidos ao experimento de c-Fos, os úteros e as vesículas seminais foram coletados e os pesos foram medidos. O E2 e a testosterona promoveram o aumento do útero e da vesícula seminal, respectivamente.

A hipercapnia não promoveu alteração no peso dos úteros e das vesículas seminais. Diante disso, os animais submetidos ao ar atmosférico foram agrupados aos animais submetidos a hipercapnia para análise estatística a fim de avaliar apenas o efeito do hormônio.

Na tabela 3 podemos observar que os ratos dos grupos ORX e ORX+E2 apresentaram vesículas seminais com peso inferior aos animais intactos ($P < 0,0001$; One-way ANOVA). Entretanto, os animais do grupo ORX+T apresentaram vesículas seminais com peso superior aos grupos intacto ($P < 0,05$), ORX e ORX+E2 ($P < 0,0001$) (One-way ANOVA).

Tabela 3. Peso da vesícula seminal nos grupos de ratos intactos, ORX, ORX+E2 e ORX+T submetidos ao experimento de c-Fos.

<i>PESO DA VESÍCULA SEMINAL (mg/100g)</i>			
<i>INTACTO</i> (<i>n=12</i>)	<i>ORX</i> (<i>n=12</i>)	<i>ORX+E2</i> (<i>n=12</i>)	<i>ORX+T</i> (<i>n=10</i>)
349,8 ± 27,3	117,4 ± 17,5*	113,9 ± 10,7*	468,9 ± 36,5^{+#}

Os valores são expressos como média ± E.P.M. *Diferente do grupo intacto ($P < 0,0001$). +Diferente do grupo intacto ($P < 0,05$). #Diferente dos grupos ORX e ORX+E2 ($P < 0,0001$). (One-way ANOVA)

Na tabela 4 observamos que as ratas OVX apresentaram útero de peso inferior às ratas intactas ciclando em diestro ($P < 0,0001$; One-way ANOVA). Já as ratas do grupo OVX+E2 apresentaram útero com peso superior aos grupos diestro ($P < 0,05$; One-way ANOVA) e OVX ($P < 0,0001$; One-way ANOVA).

Tabela 4. Peso do útero nos grupos de ratas ciclando em diestro, OVX e OVX+E2 submetidas ao experimento de c-Fos.

<i>PESO DO ÚTERO (mg/100g)</i>		
<i>DIESTRO</i> <i>(n=10)</i>	<i>OVX</i> <i>(n=12)</i>	<i>OVX+E2</i> <i>(n=12)</i>
153,7 ± 10,3	76,6 ± 3,8*	194,2 ± 8,2^{+#}

Os valores são expressos como média ± E.P.M. *Diferente do grupo diestro (P<0,0001). +Diferente do grupo diestro (P<0,05).

[#]Diferente do grupo OVX (P<0,0001). (One-way ANOVA).

4.5 Efeito do estradiol sobre a resposta da ventilação à hipercapnia de fêmeas ovariectomizadas com reposição hormonal de estradiol submetidas à lesão dos neurônios noradrenérgicos do LC

4.5.1. Imunoistoquímica para tirosina hidroxilase (TH)

A figura 4 apresenta fotomicrografias de secções transversais da ponte mostrando a área da lesão química do LC com 6-OHDA. O LC dos animais sham permaneceu intacto e aparece como um agrupamento compacto de células intensamente marcadas (Fig. 4A). A lesão bilateral do LC com 6-OHDA causou uma redução de células positivas para TH (Fig. 4B). A perda de células positivas para TH no LC depois de lesão com 6-OHDA nos grupos OVX e OVX+E2 foi quantificada, e os resultados são mostrados no gráfico da Fig. 4C. Houve uma redução de aproximadamente 61% dos neurônios noradrenérgicos do LC no grupo OVX e no grupo OVX+E2 em relação ao grupo controle (Fig. 4C; $P < 0,0001$; One-way ANOVA). Não houve diferença na redução dos neurônios noradrenérgicos do LC entre os grupos OVX e OVX+E2.

Na figura 4D podemos observar que os neurônios noradrenérgicos da região A5 permaneceram preservados mesmo após a microinjeção da 6-OHDA mostrando que a lesão foi especificamente no LC.

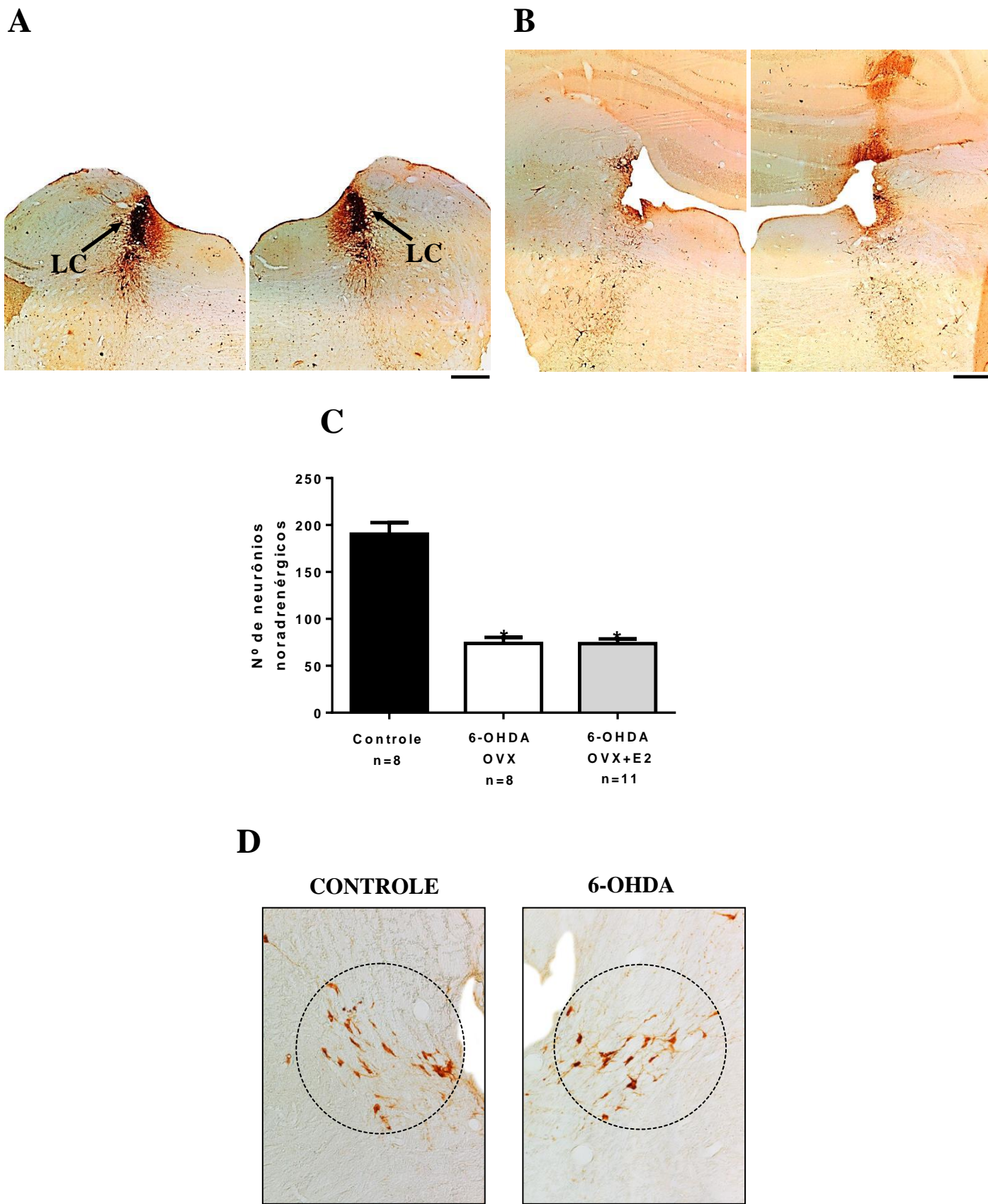


Figura 4. (A e B) Fotomicrografias representativas da imunistoquímica para tirosina hidroxilase (TH) no *Locus coeruleus* (LC) de animais do grupo sham (ácido ascórbico, a esquerda) e animais submetidos à lesão química bilateral (6-OHDA, a direita). LC: *Locus coeruleus*. Aumento de 2,5x. Barra de calibração:

400 μm . (C) O número de neurônios imunorreativos para TH foi reduzido após a lesão química do LC. * Indica diferença entre os grupos sham e lesados ($P < 0,0001$; One-way ANOVA). (D) O círculo delimita a região A5 com marcação para TH. Barra de calibração: 100 μm .

4.5.2. Efeito da lesão dos neurônios noradrenérgicos do LC na ventilação

pulmonar

A figura 5 apresenta valores do volume corrente (V_T), frequência respiratória (fR) e ventilação pulmonar (V_E) de fêmeas castradas do grupo sham OVX (ácido ascórbico) e do grupo com lesão bilateral do LC (6-OHDA-OVX) durante normocapnia e hipercapnia (7% CO_2). Durante a normocapnia, a lesão não promoveu alteração da V_E , V_T e fR.

A figura 5 também apresenta o efeito da lesão pela 6-OHDA no LC na ventilação durante a hipercapnia. A exposição a 7% de CO_2 causou um aumento na V_E nos grupos 6-OHDA-OVX e sham OVX (efeito do CO_2 : $P < 0,0001$, $F_{1,12} = 213,5$; interação = $P < 0,001$, $F_{1,12} = 7,128$; Two-way ANOVA). O aumento da V_E foi decorrente de um aumento do V_T (efeito do CO_2 : $P < 0,0001$, $F_{1,12} = 102,1$; sem interação: $P = 0,2318$, $F_{1,12} = 1,517$; Two-way ANOVA) e da fR (efeito do CO_2 : $P < 0,0001$, $F_{1,12} = 129,3$; sem interação: $P = 0,8748$, $F_{1,12} = 0,02538$; Two-way ANOVA).

A resposta ventilatória ao CO_2 foi significativamente reduzida (29,4%) no grupo lesado (6-OHDA-OVX) quando comparados ao grupo sham OVX (efeito do tratamento = $P < 0,001$; $F_{1,12} = 22,15$; interação = $P < 0,001$; $F_{1,12} = 7,128$; Two-way ANOVA). A redução da resposta foi devido à redução no V_T (efeito do tratamento = $P = 0,0250$; $F_{1,12} = 5,830$; sem interação = $P = 0,2318$; $F_{1,12} = 7,517$; Two-way ANOVA) e da fR (efeito do tratamento: $P = 0,0006$, $F_{1,12} = 15,58$; sem interação: $P = 0,8748$, $F_{1,12} = 0,02538$; Two-way ANOVA).

No gráfico não estão representados diferenças entre normocapnia e hipercapnia, apenas diferenças entre os grupos animais (sham ou 6-OHDA) que apresentaram interação estatística.

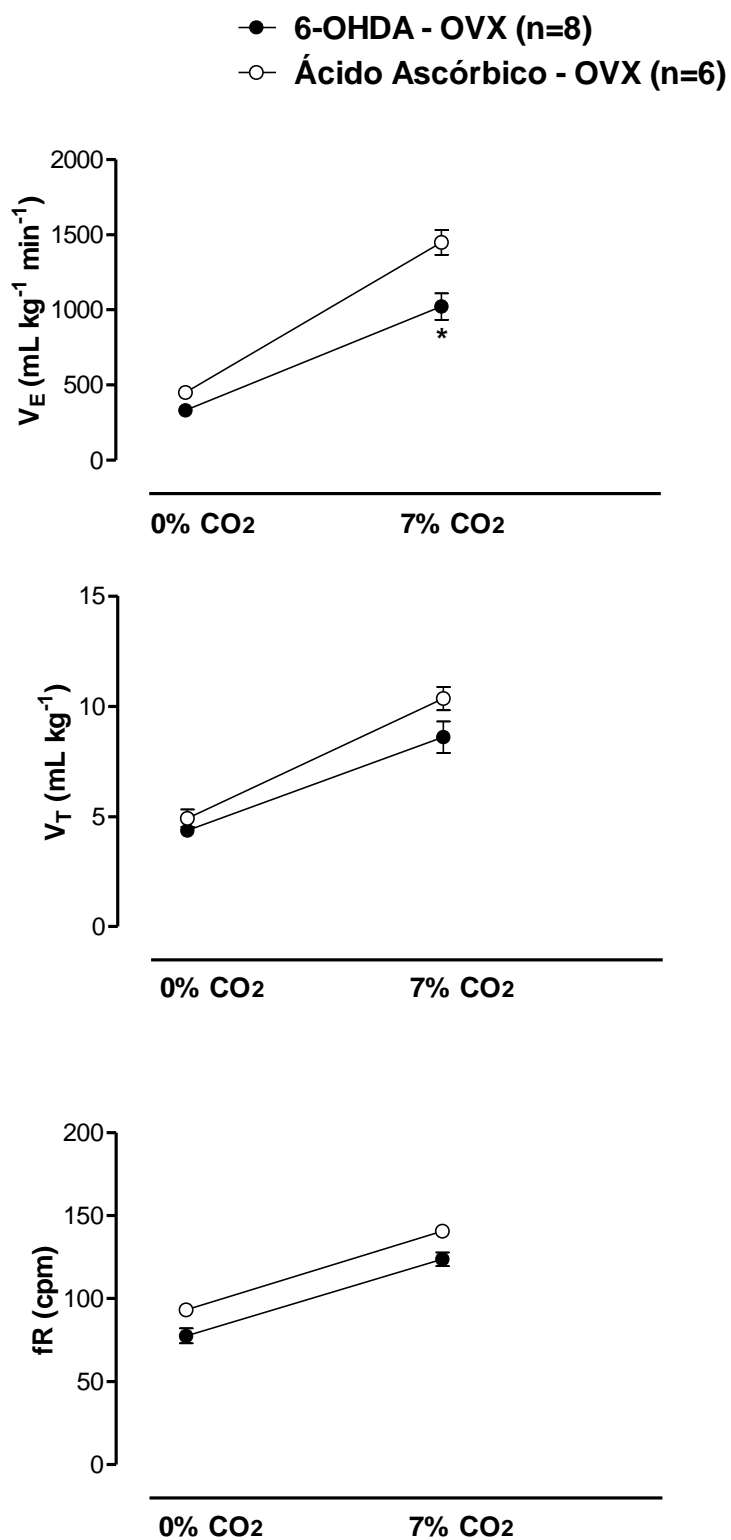


Figura 5. Ventilação (V_E), frequência respiratória (fR) e volume corrente (V_T) dos grupos sham (ácido ascórbico) e lesado (6-OHDA) expostos a normocapnia e hipercapnia (7% CO_2) * Indica diferença entre o grupo lesado (6-OHDA) e sham (ácido ascórbico).

4.5.3. Efeito da lesão dos neurônios noradrenérgicos do LC juntamente com o tratamento com estradiol na ventilação pulmonar

A figura 6 apresenta valores do volume corrente (V_T), frequência respiratória (fR) e ventilação pulmonar (V_E) de fêmeas do grupo sham OVX tratadas com estradiol (OVX+E2) e do grupo com lesão bilateral no LC e castradas com reposição de E2 (6-OHDA-OVX+E2) durante normocapnia e hipercapnia (7% CO_2). Durante a normocapnia, a lesão não promoveu alteração da V_E , V_T e fR.

A figura 6 também apresenta o efeito da lesão pela 6-OHDA no LC na ventilação durante a hipercapnia. A exposição a 7% de CO_2 causou um aumento na V_E nos grupos 6-OHDA-OVX+E2 e sham OVX+E2 (efeito do CO_2 : $P < 0,0001$, $F_{1,16} = 351$; interação = $P < 0,057$, $F_{1,12} = 8,901$; Two-way ANOVA). O aumento da V_E foi decorrente de um aumento do V_T (efeito do CO_2 : $P < 0,0001$, $F_{1,12} = 226,1$; sem interação: $P = 0,2724$, $F_{1,12} = 2,724$; Two-way ANOVA) e da fR (efeito do CO_2 : $P < 0,0001$, $F_{1,12} = 122,2$; sem interação: $P = 0,57$, $F_{1,12} = 0,3275$; Two-way ANOVA).

A resposta ventilatória ao CO_2 foi significativamente reduzida (28,7%) no grupo lesado (6-OHDA-OVX+E2) quando comparados ao grupo sham OVX+E2 (efeito do tratamento = $P < 0,0001$; $F_{1,12} = 36,95$; interação = $P = 0,057$; $F_{1,12} = 8,8901$; Two-way ANOVA). A redução da resposta foi devido à redução no V_T (efeito do tratamento = $P = 0,0085$; $F_{1,12} = 7,944$; sem interação = $P = 0,1093$; $F_{1,12} = 2,724$; Two-way ANOVA).

No gráfico não estão representados diferenças entre normocapnia e hipercapnia, apenas diferenças entre os grupos animais (sham ou 6-OHDA) que apresentaram interação estatística.

Na tabela 5 podemos observar os valores absolutos dos parâmetros ventilatórios nos grupos OVX e OVX+E2 em animais sham e lesados. Não houve diferenças entre os grupos OVX e OVX+E2 e 6-OHDA-OVX e 6-OHDA-OVX+E2.

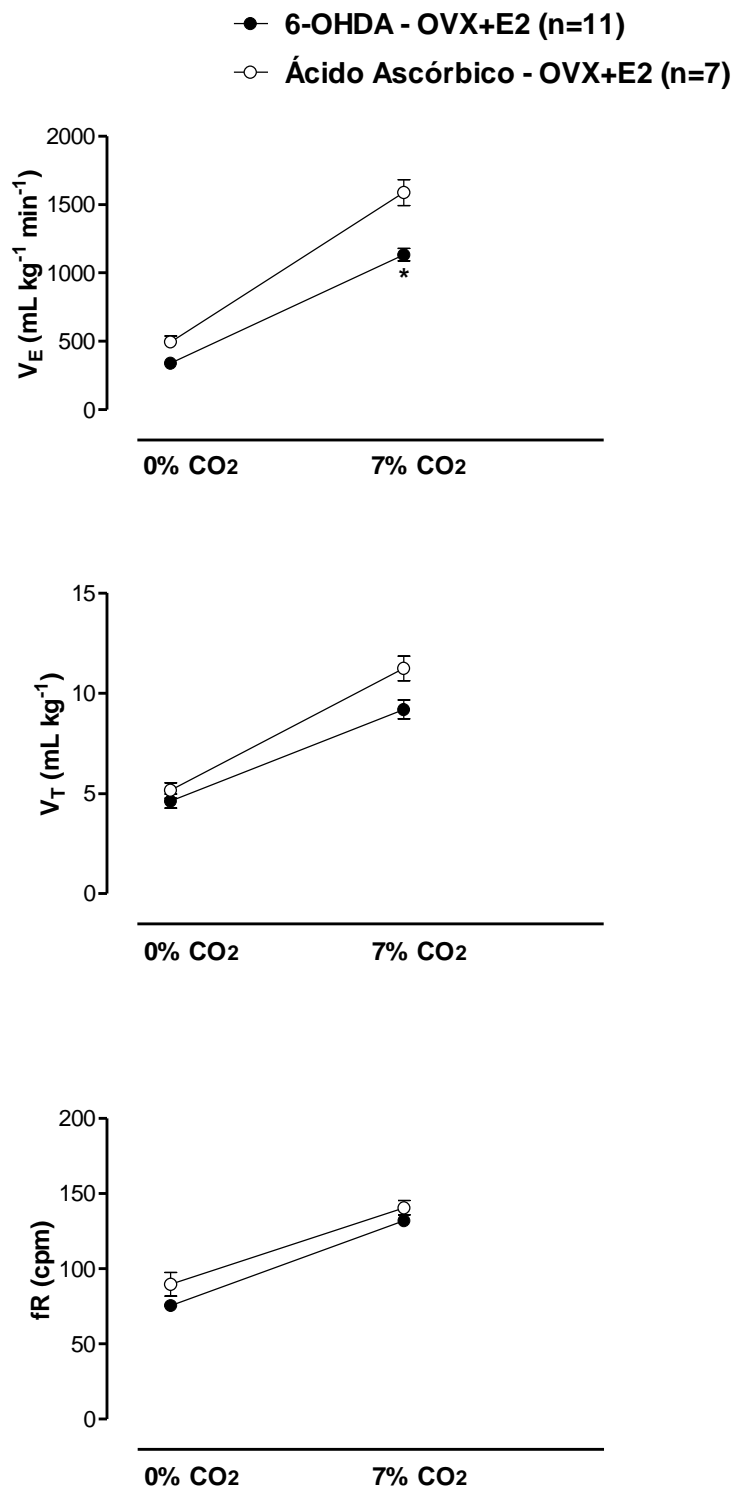


Figura 6. Ventilação (V_E), frequência respiratória (fR) e volume corrente (V_T) dos grupos sham tratados com estradiol (OVX+E2) e lesados tratados com estradiol (6-OHDA-OVX+E2) expostos a normocapnia e hipercapnia (7% CO₂). *Indica diferença entre grupos lesados e sham (ácido ascórbico).

Tabela 5. Parâmetros ventilatórios (V_E , V_T e fR) em condições hipercápnicas e normocápnicas nos grupos sham e lesados tratados com estradiol ou veículo.

		V_E ($mL\ Kg^{-1}min^{-1}$)	V_T ($mL\ Kg^{-1}$)	fR (cpm)
ÁCIDO ASCÓRBICO OVX (n=6)	<i>Normocapnia</i>	450,7 ± 37,6	4,9 ± 0,4	93,1 ± 3,9
	<i>Hipercapnia</i>	1448,4 ± 83,3 ⁺	10,3 ± 0,5 ⁺	140,6 ± 2,9 ⁺
ÁCIDO ASCÓRBICO OVX+E2 (n=7)	<i>Normocapnia</i>	496,1 ± 43	5,15 ± 0,4	89,7 ± 7,8
	<i>Hipercapnia</i>	1588,6 ± 94,2 ⁺	11,2 ± 0,6 ⁺	140,5 ± 4,8 ⁺
6-OHDA OVX (n=8)	<i>Normocapnia</i>	333,1 ± 14,5	4,3 ± 0,2	77,5 ± 4,5
	<i>Hipercapnia</i>	1022,6 ± 87,9 ^{+*}	8,6 ± 0,7 ^{+*}	123,7 ± 4 ^{+*}
6-OHDA OVX+E2 (n=11)	<i>Normocapnia</i>	340,5 ± 26,8	4,6 ± 0,3	75,5 ± 3,4
	<i>Hipercapnia</i>	1132 ± 45,7 ^{+#}	9,1 ± 0,4 ^{+#}	131,9 ± 3,7 ⁺

Os valores são expressos como média ± E.P.M. +Diferença da normocapnia para hipercapnia; *Diferença entre o grupo lesado (6-OHDA-OVX) em relação ao grupo sham (Ácido ascórbico-OVX). #Diferença entre o grupo lesado tratado com estradiol (6-OHDA-OVX+E2) em relação ao grupo sham tratado com estradiol (Ácido ascórbico-OVX+E2).

4.6. Efeito do estradiol sobre a resposta da temperatura corporal à hipercapnia de fêmeas ovariectomizadas submetidas à lesão dos neurônios noradrenérgicos do LC

A figura 7A apresenta os efeitos da lesão do LC na Tc nos grupos OVX e OVX+E2 sob condições normocápnicas e hipercápnicas. A lesão dos neurônios noradrenérgicos do LC e o estradiol não promoveram diferenças significativas na Tc dos animais. A hipercapnia promoveu redução na temperatura em todos os grupos experimentais (efeito do tempo: $P=0,0103$, $F_{3,28}=1,996$; sem interação: $P=0,57$, $F_{3,28}=1$; Two-way ANOVA). O delta da Tc (Fig. 7B) mostra que a queda promovida pela hipercapnia foi similar em todos os grupos (efeito do CO_2 : $P<0,0001$, $F_{3,28}=5,666$; sem interação: $P=0,98$, $F_{3,28}=0,5766$; Two-way ANOVA).

Seguindo critério dos gráficos anteriores, diferenças causadas pela hipercapnia, ou seja, dentro dos grupos, não estão representadas no gráfico.

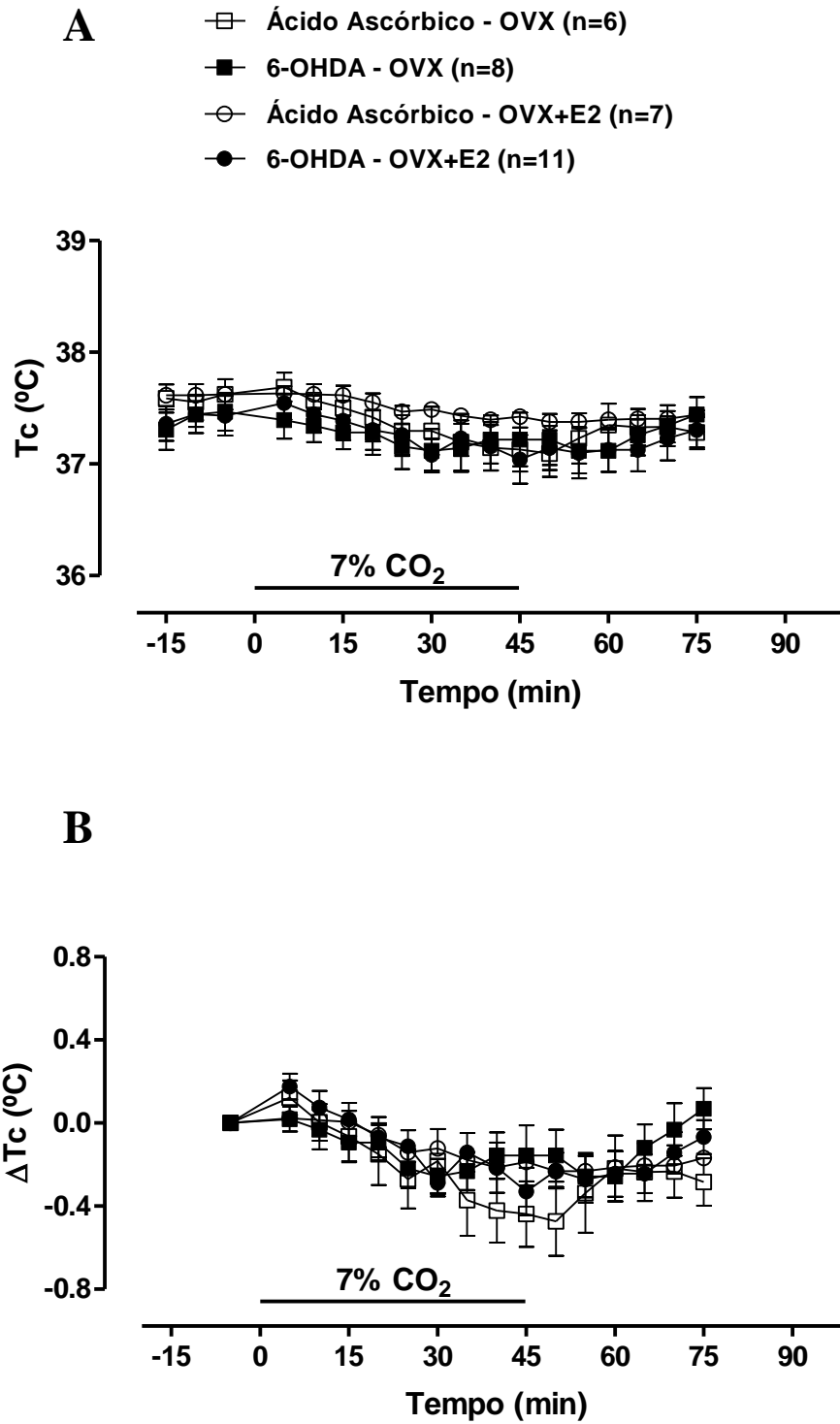


Figura 7. (A) Temperatura corporal (T_c) dos grupos sham (ácido ascórbico) e lesados (6-OHDA) expostos a normocapnia e a hipercapnia (7% CO_2) nos grupos OVX e OVX+E2. (B) Delta da temperatura (T_c) nos grupos lesados e sham, tratados com estradiol ou não.

4.7. Dosagem Hormonal dos animais sujeitos a lesão

As dosagens hormonais foram realizadas para comprovação da eficácia da reposição hormonal com estradiol, em todos animais submetidos aos experimentos de c-Fos e ventilação, e com testosterona, em machos submetidos ao experimento de c-Fos.

A tabela 6 apresenta as concentrações plasmáticas de estradiol em fêmeas dos grupos OVX e OVX+E2 submetidas a lesão bilateral do LC (6-OHDA) ou sham (ácido ascórbico). A lesão bilateral do LC não promoveu alterações nas concentrações plasmáticas do hormônio. Entretanto, a concentração do estradiol no grupo OVX+E2 apresentou-se elevada em relação ao grupo OVX ($P < 0,001$; Two-way ANOVA).

Tabela 6. Concentrações plasmáticas de estradiol em fêmeas dos grupos sham (ácido ascórbico) e lesados (6-OHDA) tratadas com estradiol (OVX+E2) ou veículo (OVX).

<i>ESTRADIOL (pg/mL)</i>		
	<i>ÁCIDO ASCÓRBICO</i>	<i>6-OHDA</i>
<i>OVX</i>	72,4 ± 8,9 (n=7)	64,7 ± 2,9 (n=8)
<i>OVX+E2</i>	123,7 ± 8,9* (n=8)	112,7 ± 8,8* (n=10)

Os valores são expressos como média ± E.P.M. * Diferença entre os grupos OVX e OVX+E2 ($P < 0,001$). (Two-way ANOVA)

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho é o primeiro estudo que mostra a participação dos neurônios noradrenérgicos do LC de fêmeas na resposta ventilatória a hipercapnia já que estudos referentes a este núcleo são realizados somente em machos. Considerando que o LC está relacionado a distúrbios como depressão, ansiedade e síndrome de Rett (Taneja *et al.*, 2009; Alba-Delgado *et al.*, 2013) e que essas doenças são prevalentes em mulheres (Hagberg *et al.*, 1983; Baptista *et al.*, 1999; Andrade *et al.*, 2006), vimos a importância de estudar a participação deste núcleo nas fêmeas. No presente estudo, verificamos o envolvimento do LC na resposta ventilatória ao CO₂ em ratas e determinamos os efeitos do estradiol nessa resposta. Nossos dados mostraram que a lesão química do LC com 6-OHDA promoveu uma atenuação da resposta ventilatória a hipercapnia similar em ambos grupos (28,7% no grupo 6-OHDA-OVX+E2 e 29,4% no grupo 6-OHDA-OVX).

Adicionalmente, avaliamos a expressão de c-Fos nos neurônios noradrenérgicos do LC após exposição ao CO₂ em fêmeas ciclando em diestro, ovariectomizadas tratadas com óleo (veículo-OVX) ou com estradiol (OVX+E2) e em machos intactos, orquidectomizados tratados com óleo (veículo-ORX), ou com estradiol (ORX+E2) ou ainda com testosterona (ORX+T).

O tratamento com estradiol e testosterona do presente estudo foi baseado em estudos prévios (Szawka *et al.*, 2009; Kalil *et al.*, 2013) e a eficiência do tratamento foi comprovada, em todos os grupos animais, pelas dosagens hormonais e pelo peso dos úteros, nas fêmeas, e das vesículas seminais, nos machos.

A testosterona e o estradiol promovem proliferação celular. Dessa forma, nos machos, a testosterona promove aumento da vesícula seminal e o estradiol, nas fêmeas, promove aumento do útero. Sendo assim, os animais castrados, devido a ausência de produção dos hormônios gonadais, apresentam vesícula seminal (machos) e útero

(fêmeas) com menor peso. Já os machos castrados que foram tratados com testosterona apresentaram uma vesícula seminal maior que os demais grupos e as fêmeas castradas tratadas com estradiol apresentaram útero com peso superior aos demais grupos. Adicionalmente, nos machos, a testosterona promove também aumento da produção do líquido seminal. Entretanto, no presente estudo, este líquido foi descartado antes da pesagem a fresco restringindo o peso medido ao peso da estrutura da vesícula seminal.

c-Fos é amplamente usado como marcador da atividade neuronal, pois sua expressão é rapidamente ativada por estímulos que aumentam a atividade celular (Hoffman & Lyo, 2002). No presente estudo, a hipercapnia promoveu aumento da expressão de c-Fos nos neurônios noradrenérgicos do LC em todos os grupos. Esses dados já foram observados em ratos (Haxhiu *et al.*, 1996), contudo os autores utilizaram 15% de CO₂, uma hipercapnia bem mais severa que a utilizada no presente estudo. Com os nossos dados pudemos verificar que a orquidectomia e o tratamento com E2 e testosterona não alteram a expressão de c-Fos durante a hipercapnia em machos. Estudo prévio também demonstrou que a castração de ratos não alterou a expressão de c-Fos no LC durante o estresse de contenção (Chen & Hebert, 1995).

A aromatase é uma enzima ativa em órgãos como placenta, ovários, tecido adiposo, ossos e encéfalo, em machos e fêmeas, que catalisa a conversão da testosterona em estrógeno (Czajka-Oraniec & Simpson, 2010). Desta forma, decidimos avaliar se o E2 apresenta algum efeito na ativação dos neurônios noradrenérgicos do LC durante a hipercapnia em machos. Contudo, ao tratar ratos com o E2, não evidenciamos nenhum efeito. Tal fato pode ser explicado pelo dimorfismo sexual dos neurônios noradrenérgicos do LC, pois além de fêmeas possuírem mais e maiores neurônios que machos (Guillamóm *et al.*, 1988; Bangasser *et al.*, 2011), ainda há dimorfismo sexual nos níveis de mRNA para expressão de receptores para o E2, sendo que em machos o

número de receptores α (ER α) é igual ao de fêmeas e o número de receptores β (ER β) é maior (Pendergast *et al.*, 2008). Adicionalmente, estudos mostraram um efeito inibitório do ER β sobre a expressão e função de ER α em ossos (Castillo *et al.*, 2014) e também em regiões do SNC como o hipocampo (Bean *et al.*, 2014). Dessa forma, no LC de machos, é possível que o E2 não apresente efeito devido a inibição dos ER α pelos ER β que encontram-se em grande concentração.

Bem como o E2, o hormônio sexual masculino testosterona parece não participar desse efeito na resposta à hipercapnia, apesar da presença de receptores para andrógenos no LC (Hamson *et al.*, 2004). Portanto, o estradiol e a testosterona, parecem não participar da ativação do LC pelo CO₂ de ratos.

As fêmeas do grupo OVX apresentou maior expressão de c-Fos no LC que o grupo OVX+E2 durante normocapnia e hipercapnia, sugerindo que o E2 circulante reduz a expressão de c-Fos no LC de fêmeas. Reduções na marcação de c-Fos no SNC por tratamento com E2 também foram observadas em outros estudos com ratas OVX sujeitas ao estresse de contenção (Dayas *et al.*, 2000; Ueyama *et al.*, 2006). Nossos dados corroboram os resultados de Szawka *et al.* (2009) que demonstraram um efeito inibitório desse hormônio no LC de ratas. Os autores relataram que o estradiol reduziu a taxa de disparos dos neurônios do LC em *slices* de ratas OVX. Adicionalmente, estudo prévio relatou que o aumento da expressão de c-Fos nos neurônios do LC de ratas OVX, em resposta ao estresse por imobilização, foi claramente inibida por tratamento com E2 (Ueyama *et al.*, 2006). Ainda corroborando nossos dados, a exposição a um campo magnético aumentou a expressão de c-Fos no LC de ratas OVX, e esse aumento foi atenuado pelo tratamento com E2 (Cason *et al.*, 2010).

O E2 regula a atividade dos genes que expressam TH e dopamina beta-hidroxiase (DBH) no LC aumentando suas transcrições em ratas (Liaw *et al.*, 1992;

Serova *et al.*, 2002). Desta forma, o E2 apresenta uma função modulatória complexa nos neurônios do LC, promovendo um armazenamento de noradrenalina dentro do neurônio, porém inibindo sua liberação. Nos ciclos estral e menstrual ocorre um pico de estradiol antecedente a ovulação a qual é seguida pelo pico de progesterona. Acredita-se que esse armazenamento de noradrenalina no LC causado pelo estradiol seja uma preparação para que a progesterona, que apresenta efeito excitatório no LC (Szawka *et al.*, 2009), promova a liberação de uma grande quantidade do neurotransmissor que, via projeções, pode atuar em outras áreas do SNC como amígdala, hipocampo, medula rostral ventrolateral (RVLM), raphe, núcleo facial e hipotálamo (Szabadi, 2013). Sabe-se que a noradrenalina liberada pelo LC atinge áreas hipotalâmicas promovendo a secreção de prolactina (Szawka *et al.*, 2005) sugerindo que o LC apresenta importante função também no controle hormonal.

Conforme mencionado, ao contrário do E2, a progesterona exerce função excitatória no LC (Szawka *et al.*, 2009). Entretanto, essa excitação do LC causada pela progesterona só ocorre mediante uma ação prévia do estradiol neste núcleo, visto que o estradiol estimula a síntese de receptores para progesterona (MacLusky & McEwen, 1978; Thornton *et al.*, 1986). O pico da progesterona em ratas ocorre a tarde. No presente trabalho, nosso interesse foi estudar o efeito do E2 no LC. Portanto, os experimentos realizados com fêmeas, foram todos feitos até as 13:00 hrs. Desta forma, o efeito da progesterona no grupo diestro foi minimizado.

No experimento com ratas ciclando não foi possível trabalhar com ratas em proestro e estro, pois essas fases duram bem menos tempo. Sendo assim, para ratas intactas, padronizamos o experimento apenas com ratas ciclando em diestro de forma que no protocolo de fêmeas ciclando houvesse apenas esse grupo de ratas. Vale salientar que, sendo nosso interesse analisar o efeito do estradiol em fêmeas, não é conveniente

comparar, nos protocolos experimentais, fêmeas em diestro a fêmeas castradas. Fêmeas castradas são ideais controles de fêmeas castradas com reposição de E2 onde podemos analisar isoladamente o efeito do E2.

Estudos *in vitro* mostraram que neurônios do LC aumentam a taxa de disparos em resposta a hipercapnia (Oyamada *et al.*, 1998; Stunden *et al.*, 2001; Filosa *et al.*, 2002) e constataram que mais de 80% dos neurônios do LC são quimiossensíveis ao CO_2/H^+ (Filosa *et al.*, 2002; Oyamada *et al.*, 1998). Da mesma forma, Johnson *et al.* (2008) usando camundongos transgênicos Prp57, os quais expressam uma proteína verde fluorescente (GFP) no LC, relataram que esse núcleo apresenta quimiossensibilidade após bloqueio farmacológico da transmissão sináptica, e mais de 85% de neurônios do LC GFP-positivos são estimulados por aumento das concentrações de CO_2/H^+ . Elam *et al.* (1981) demonstraram que a hipercapnia causa um aumento na taxa de disparos de neurônios do LC e a deafferentação dos quimiorreceptores periféricos não altera essa resposta, demonstrando que este núcleo participa da quimiorrecepção central. Além disso, estudo do nosso laboratório mostrou que a lesão de neurônios noradrenérgicos do LC não afeta a resposta respiratória à hipóxia, sugerindo que este núcleo é especificamente importante para a hipercapnia (Biancardi *et al.*, 2010). Nossos dados contribuem com a literatura, pois mostramos que os neurônios do LC em ratas também apresentaram aumento na atividade neuronal em resposta a hipercapnia.

O estradiol é um importante hormônio para o controle respiratório, uma vez que reduções de E2 durante a menopausa estão associadas ao aparecimento de distúrbios respiratórios como a apnéia obstrutiva do sono, sendo que a reposição deste hormônio atenua essa disfunção (Shahar *et al.*, 2003; Wesström *et al.*, 2005). Considerando que o LC possui o maior núcleo noradrenérgico do SNC (Dahlström & Fuxe, 1964; Moore &

Bloom, 1979) e que envia projeções a outras áreas como amígdala, hipocampo, medula rostral ventrolateral (RVLM), raphe, núcleo facial e hipotálamo (Szabadi, 2013) acreditamos que o efeito inibidor do E2 na expressão de c-Fos durante a hipercapnia no LC apresente importantes funções. A noradrenalina oriunda do LC pode atuar no hipotálamo participando do controle hormonal (Helena *et al.*, 2006, 2009). Adicionalmente, o LC envia projeções a áreas que participam do controle ventilatório ficando evidente a importância do E2 no LC também no controle respiratório. Entretanto, no presente estudo a reposição com E2 nos animais do grupo sham (OVX+E2) não alterou os parâmetros respiratórios durante normocapnia e hipercapnia quando comparados ao grupo controle (OVX).

A lesão do LC com 6-OHDA não afetou a ventilação durante a normocapnia corroborando dados prévios do nosso laboratório realizados em machos (Biancardi *et al.*, 2008; de Carvalho *et al.*, 2010). Com relação à resposta ventilatória ao CO₂, ambos grupos lesados (6-OHDA-OVX+E2 e 6-OHDA-OVX) apresentaram uma redução na hiperpnéia hipercápica. Essa redução da resposta ventilatória ao CO₂ foi de aproximadamente 30% nos dois grupos, sendo que a redução na ventilação foi principalmente causada por uma redução no volume corrente corroborando os estudos de de Carvalho *et al.* (2010) e Biancardi *et al.* (2008), que demonstraram que a lesão dos neurônios noradrenérgicos do LC em machos reduziu a resposta ventilatória a 7% de CO₂ agindo sobre a V_T. Contudo, no grupo OVX uma redução na fR foi observada. Isso pode representar uma modulação diferente do LC entre machos e fêmeas. Estudo prévio demonstrou que a lesão de neurônios catecolaminérgicos do tronco encefálico através da injeção de DBH-SAP no 4º ventrículo promoveu uma redução de aproximadamente 73-84% dos neurônios das regiões A5, A6 e A7 causando uma queda da fR durante hipercapnia (Li & Nattie, 2006).

A similaridade da redução da ventilação em ambos grupos (28,7% no grupo 6-OHDA-OVX+E2 e 29,4% no grupo 6-OHDA- OVX) sugere que a reposição com estradiol não altera a atenuação da hiperpnéia hipercápica. Desta forma, sugerimos que esse hormônio em fêmeas não seja essencial para o controle da ventilação durante a exposição ao CO₂. Contudo, nos animais lesados sem E2, além de uma redução do V_T, a fR também foi atenuada, indicando que, nos animais lesados tratados com hormônio, o E2 pode ter atuado em alguma área respiratória evitando a redução deste parâmetro. Essa plasticidade pode ter ocorrido a fim de compensar a ausência do LC. De acordo com Behan *et al.* (2003), os hormônios sexuais agem em todo SNC participando do controle da ventilação. A função dos motoneurônios e pré-motoneurônios respiratórios e neurônios do tronco encefálico geradores do ritmo respiratório é influenciada pelos hormônios sexuais. Além disso, receptores para estrógeno estão localizados ao longo do tronco encefálico e medula espinhal, incluindo o núcleo do trato solitário (NTS), coluna respiratória ventral e motoneurônios respiratórios no núcleo do nervo frênico e do hipoglosso (Simerly *et al.*, 1990; Shughrue *et al.*, 1997; Behan & Thomas, 2005).

No presente trabalho vimos que as reduções na resposta ventilatória a hipercapnia após microinjeção de 6-OHDA, de aproximadamente 30% nos grupos OVX e OVX+E2, estão associadas a reduções de 61% de neurônios noradrenérgicos do LC. Em machos, a microinjeção da mesma droga reduziu a resposta ventilatória ao CO₂ em 64% provocada pela redução de 80% dos neurônios noredrenérgicos (Biancardi *et al.*, 2008). Estudos têm demonstrado que LC de ratas apresenta maior volume e campo dendrítico que LC de ratos (Guillamóm *et al.*, 1988; Bangasser *et al.*, 2011). Desta forma, sendo menor o LC de ratos, a microinjeção pôde abranger mais neurônios provocando uma maior lesão em comparação ao presente estudo. Devemos citar também a possibilidade de diferentes mecanismos envolvidos na resposta a hipercapnia

entre machos e fêmeas implicando que o LC de fêmeas poderia afetar diferentemente o controle respiratório em resposta ao CO₂, uma vez que observamos alteração na fR e no estudo de Biancardi *et al.* (2008) essa diferença não foi observada.

Outras áreas quimiossensíveis também podem estar envolvidas na resposta ventilatória a hipercapnia das fêmeas do presente trabalho como RTN, rafe, NTS, hipotálamo, grupo respiratório dorsal e ventral, pré-Bötzing e núcleo fastigial (Nattie, 1999; Nattie, 2001). Entretanto é evidente a importância do LC nessa resposta ao CO₂, já que a lesão desse núcleo promoveu considerável redução na ventilação (30%) em ambos grupos (OVX e OVX+E2). Da mesma forma, a participação do LC nessa resposta ao CO₂ também foi observada em machos (Filosa *et al.*, 2002; Biancardi *et al.*, 2008; de Carvalho *et al.*, 2010; Gargaglioni *et al.*, 2010; Biancardi *et al.*, 2014; Patrone *et al.*, 2014).

Em testes prévios com fêmeas realizamos imunistoquímica para marcação de TH e observamos que castração e cirurgia estereotáxica com microinjeção de veículo (ácido ascórbico) não alteraram o padrão de marcação. Portanto na imunistoquímica para marcação de TH utilizamos fêmeas intactas não submetidas a qualquer intervenção cirúrgica nem experimentos para composição do grupo controle. Essas fêmeas controles também foram utilizadas na contagem de neurônios noradrenérgicos.

Nossa hipótese era que fêmeas possuíam uma resposta ventilatória aumentada, em resposta a hipercapnia, em relação a machos. Entretanto, isso não foi visto quando comparamos os valores absolutos ventilatórios aos observados em machos (Biancardi *et al.*, 2008). Além disso, a ativação de neurônios noradrérgicos do LC pelo CO₂, analisado pela expressão de fos, foi similar entre machos e fêmeas (a análise estatística não foi realizada).

Com relação à participação do LC na termorregulação, há evidências de que os neurônios catecolaminérgicos do LC fazem parte de uma via neuronal termoefetora que é especificamente ativada por pirogênicos (e.g. PGE₂) que induzem a termogênese produzindo a febre em condição subtermoneutra (Almeida *et al.*, 2004). Durante a exposição ao frio (10°C), os neurônios do LC de ratos aumentam a expressão de c-Fos (Kiyohara *et al.*, 1995). A exposição à 4°C causa um aumento similar da expressão c-Fos no LC de camundongos machos e fêmeas, mostrando portanto, não ser sexo-específica (Yuan *et al.*, 2002). Esses trabalhos sugerem um envolvimento deste núcleo no controle da temperatura em condição subtermoneutra. O presente estudo foi realizado em condição termoneutra, e a lesão dos neurônios noradrenérgicos do LC não causou diferença na temperatura corporal corroborando com estudos prévios realizados com machos (Biancardi *et al.*, 2008; de Carvalho *et al.*, 2010). Portanto, o LC parece participar de alguma via envolvida na termorregulação em condição subtermoneutra e não em condição termoneutra.

A hipercapnia promoveu uma redução na temperatura em todos os grupos. Esses dados são diferentes dos encontrados em machos em estudos prévios do nosso laboratório, em animais submetidos à mesma condição (Biancardi *et al.*, 2008; de Carvalho *et al.*, 2010; de Souza-Moreno *et al.*, 2010; Lopes *et al.*, 2012; Taxini *et al.*, 2013). Nestes estudos, a exposição a 7% de CO₂ não promoveu alteração da temperatura corporal. Além disso, há relatos sobre diferenças sexuais na termorregulação (Hodges *et al.*, 2011). Dados recentes do nosso laboratório demonstraram que fêmeas não ovariectomizadas, em todas as fases do ciclo estral, também apresentam queda da temperatura durante a hipercapnia (Marques *et al.*, dados não publicados). Desta forma, a queda da temperatura durante a hipercapnia em fêmeas não deve ser causada por flutuações hormonais, uma vez que tanto fêmeas OVX, quanto

ciclando, apresentam esta alteração. Entretanto não encontramos efeito desse hormônio na Tc.

Desta forma, o presente estudo demonstrou que o estradiol inibe a ativação dos neurônios noradrenérgicos do LC durante a hipercapnia, uma vez que a expressão de c-Fos foi reduzida após o tratamento com E2. Contudo, em relação à resposta ventilatória ao CO₂, a ventilação foi similar em ambos os grupos (OVX+E2 e OVX) sugerindo que o hormônio não participa da resposta desse núcleo à hipercapnia. Adicionalmente, verificamos uma diferença na resposta termorreguladora ao CO₂ quando comparamos machos e fêmeas. Entretanto, como a reposição e também fêmeas ciclando (Marques *et al.*, dados não publicados) tem o mesmo padrão de resposta, acreditamos que os hormônios sexuais não estão envolvidos nesta resposta. Os nossos dados com ratos mostram que a orquidectomia e a reposição com testosterona e E2 não afetam a expressão de c-Fos no LC, indicando que a ativação deste núcleo não é influenciada por hormônios em machos, diferente do que foi observado em fêmeas. Entretanto, vale salientar, que a quimiorrecepção envolve a ação de vários núcleos os quais trabalham juntos formando uma rede onde informações são recebidas e enviadas. Vale ressaltar ainda que possíveis mecanismos pelos quais os hormônios sexuais influenciam o controle respiratório ainda não são totalmente compreendidos, desta forma mais estudos são necessários para esclarecer a participação de esteróides sexuais no controle da ventilação e da temperatura corporal.

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados encontrados:

- Concluimos que o E2 apresenta efeito inibitório na atividade dos neurônios noradrenérgicos do LC de fêmeas.
- Concluimos que o LC de fêmeas também é importante para o controle respiratório em resposta a hipercapnia. Entretanto, o tratamento com E2 não alterou essa resposta.
- Sugerimos que os neurônios noradrenérgicos do LC e o E2 não participam da termorregulação durante condições normocápnicas e hipercápnicas em ratas.
- Sugerimos ainda que hormônios sexuais masculinos não participam da resposta dos neurônios noradrenérgicos do LC ao CO₂.

7. REFERÊNCIAS

Aitken ML, Franklin JL, Pierson DJ, Schoene RB (1986) Influence of body size and gender on control of ventilation. *J Appl Physiol* 60: 1894–1899.

Alba-Delgado C, Llorca-Torralla M, Horrillo I, Ortega JE, Mico JA, Sánchez-Blázquez P, Meana JJ, Berrocoso E (2013) Chronic pain leads to concomitant noradrenergic impairment and mood disorders. *Biological Psychiatry* 73 (1): 54-62.

Almeida MC, Steiner AA, Coimbra NC, Branco LG (2004) Thermoeffector neuronal pathways in fever: role of the *Locus coeruleus*. *J Physiol* 558: 283-294.

Andrade LHS, Viana MC, Silveira CM (2006) Epidemiologia dos transtornos psiquiátricos na mulher. *Rev Psiq Clín* 33 (2): 43-54.

Aston-Jones G, Foote SL, Segal M (1985) Impulse conduction properties of noradrenergic *Locus coeruleus* axons projecting to monkey cerebrocortex. *Neurosci* 15: 765-777.

Aston-Jones G, Shipley MT, Grzanna R (1995) The *Locus coeruleus*, A5 and A7 noradrenergic cell groups. In: Paxinos G (ed) *The rat nervous system*. Academic, San Diego, CA, 183–213.

Bailey JE, Argyropoulos SV, Lightman SL, Nutt DJ (2003) Does the brain noradrenaline network mediate the effects of the CO₂ challenge? *J Psychopharmacol* 17 (3): 252-259.

Ballantyne D, Scheid P (2001) Central chemosensitivity of respiration: a brief overview. *Respir Physiol* 129: 5-12.

Bangasser DA, Zhang X, Garachh V, Hanhauser E, Valentino RJ (2011) Sexual dimorphism in *Locus coeruleus* dendritic morphology: A structural basis for sex differences in emotional arousal. *Physiology & Behavior* 103: 342–351.

Baptista MN, Daher-Baptista AS, Oliveira MG (1999) Depressão e gênero: por que as mulheres deprimem mais que os homens? *Temas em Psicologia* 7 (2): 143-156.

Barros RCH, Branco LGS (1998) Effect of nitric oxide synthase inhibition on hypercapnia-induced hypothermia and hyperventilation. *J Appl Physiol* 85: 967-972.

Bartlett DJR, Tenney SM (1970) Control of breathing in experimental anemia. *Respir Physiol* 10: 384-395.

Bayliss DA, Millhorn DE, Gallman EA, Cidlowski JA (1987) Progesterone stimulates respiration through a central nervous system steroid receptor-mediated mechanism in cat. *Proc Natl Acad Sci* 84: 7788-7792.

Bean LA, Ivanov L, Foster TC (2014) Estrogen Receptors, the Hippocampus, and Memory. In Press.

Behan M, Zabka AG, Thomas CF, Mitchell GS (2003) Sex steroid hormones and the neural control of breathing. *Respir Physiol Neurobiol* 136: 249–263.

Behan M, Thomas CF (2005) Sex hormone receptors are expressed in identified respiratory motoneurons in male and female rats. *Neuroscience* 130:725–734.

Bernuci MP, Szawka RE, Helena CVV, Leite CM, Lara HE, Anselmo-Franci JA (2008) Locus Coeruleus Mediates Cold Stress-Induced Polycystic Ovary in Rats. *Endocrinology* 149(6):2907–2916.

Berridge CW, Waterhouse BD (2003) The *Locus coeruleus*-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res* 42(1):33–84.

Biancardi V, Bicego KC, Almeida MC, Gargaglioni LH (2008) *Locus coeruleus* noradrenergic neurons and CO₂ chemosensitivity. *Pflugers Arch* 455 (6): 1119-1128.

Biancardi V, Da Silva LT, Bicego KC, Gargaglioni LH (2010) Role of *Locus coeruleus* noradrenergic neurons in cardiorespiratory and thermal control during hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol* 170(2): 150-156.

Biancardi V, Bicego KC, Gargaglioni LH (2014) ATP in the *Locus coeruleus* as a modulator of cardiorespiratory control in unanaesthetized male rats. *Exp Physiol* 99(1): 232-47.

Bícego KC, Barros RC, Branco LG (2007) Physiology of temperature regulation: comparative aspects. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 147 (3):616-639.

Boulant JA (1998) Neural thermal reception and regulation of body temperature. In: Blatteis CM. (ed.), *Physiology and Pathophysiology of temperature regulation*, New Jersey, USA, World Scientific, 94-104.

Boulant JA (2000) Role of preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. *Clin Infect Dis* 31: 157-161.

Branco LG, Wood SC (1994) Role of central chemoreceptors in behavioral thermoregulation of the toad, *Bufo marinus*. *Am J Physiol* 266: 1483-1487.

Carter ME, Yizha O, Chikahisa S, Nguyen H, Adamantidis A, Nishino S, Deisseroth K, Lecea Luis (2010) Tuning arousal with optogenetic modulation of *Locus coeruleus* neurons. *Nat Neurosci* 13(12): 1526–1533.

Cason AM, Kwon B, Smith JC, Houpt TA (2010) c-Fos induction by a 14 T magnetic field in visceral and vestibular relays of the female rat brainstem is modulated by estradiol. *Brain Res* 1347:48-57.

Castillo AB, Triplett JW, Pavalko FM, Turner CH (2014) Estrogen receptor- β regulates mechanical signaling in primary osteoblasts. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. In Press.

Chen X, Herbert J (1995) The effect of long-term castration on the neuronal and physiological responses to acute or repeated restraint stress: interactions with opioids and prostaglandins. *J Neuroendocrinol.* 1995 Feb;7(2):137-44.

Coates EL, Li A, Nattie EE (1993) Widespread sites of brainstem ventilatory chemoreceptors. *J Appl Physiol* 75: 5-14.

Czajka-Oraniec I, Simpson ER (2010) Aromatase research and its clinical significance. *Endokrynol Pol* 61(1): 126-134.

Dahlström A, Fuxe K (1964) Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamine in the cell bodies of brain-stem neurons. *Acta Physiol Scand* 62 (232): 1-55.

Dayas CV, Xu Y, Buller KM, Day TA (2000) Effects of chronic oestrogen replacement on stress-induced activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis control pathways. *J Neuroendocrinol* 12(8): 784-794.

De Blas MR, Segovia S, Guillamón A (1990) Effect of postpuberal gonadectomy on cell population of the locus coeruleus in the rat. *Med Sci Res* 18:355–356

De Carvalho D, Bicego KC, Castro OW, Silva GSF, Garcia-Cairasco N, Gargaglioni LH (2010) Role of neurokinin-1 expressing neurons in the *Locus coeruleus* on ventilator and cardiovascular responses to hypercapnia. *Respir Physiol Neurobiol* 172: 24–31.

Dempsey JA, Olsen EB, Skatrud JB (1986) Hormones and neurochemicals in the regulation of breathing. In: Chriak, NS.; Widdicombe, J., editors. Handbook of Physiology. Section 3. The respiratory system, control of breathing, part 1, Vol. II. Washington, DC: American Physiological Society, 181-221.

De Souza Moreno V, Bicego KC, Szawka RE, Anselmo-Franci JA, Gargaglioni LH (2010) Serotonergic mechanisms on breathing modulation in the rat *Locus coeruleus*. Pflugers Arch 459 (3): 357–368.

Elam M, Yao T, Thoren P, Svensson TH (1981) Hypercapnia and hypoxia: chemoreceptor-mediated control of *Locus coeruleus* neurons and splanchnic, sympathetic nerves. Brain Res 222: 373-381.

El-Emam Dief A, Caldwell JD, Jirikowski GF (2013) Colocalization of p450 aromatase and oxytocin immunostaining in the rat hypothalamus. Horm Metab Res 45 (4): 273-6.

Farkas M, Donhoffer S (1975) The effect of hypercapnia on heat production and body temperature in the new-born guinea pig. Acta Physiol Acad Sci Hung 46: 201-217.

Filosa JA, Dean JB, Putnam RW (2002) Role of intracellular and extracellular pH in the chemosensitive response of rat *Locus coeruleus* neurones. J Physiol 541: 493-509.

Gargaglioni LH, Hartzler LK, Putnam RW (2010) The *Locus coeruleus* and central chemosensitivity. *Respir Physiol Neurobiol* 173(3): 264-273.

Guillamon A, de Blas MR, Sergovia S (1988) Effects of sex steroids on the development of the *Locus coeruleus* in the rat. *Dev Brain Res* 40: 306–310.

Hagberg B, Aicardi J, Dias K, Ramos O (1983) A progressive syndrome of autism, dementia, ataxia, and loss of purposeful hand use in girls: Rett's syndrome: report of 35 cases. *Ann Neurol* 14(4):471-479.

Hamson DK, Jones BA, Watson NV (2004) Distribution of androgen receptor immunoreactivity in the brainstem of male rats. *Neuroscience* 127(4): 797-803.

Hauck FR (2001) Changing epidemiology. In: Byard, RW.; Krouss, HF., editors. *Sudden Infant Death Syndrome: Problems, Progress and Possibilities*. London: Arnold, p 36.

Haxhiu MA, Yung K, Erokwu B, Cherniack NS (1996) CO₂-induced c-Fos expression in the CNS catecholaminergic neurons. *Respir Physiol* 105 (1-2): 35-45.

Helena CV, de Oliveira Poletini M, Sanvito GL, Hayashi S, Franci CR, Anselmo-Franci JA (2006) Changes in α -estradiol receptor and progesterone receptor expression in the *Locus coeruleus* and preoptic area throughout the rat estrous cycle. *J Endocrinol* 188: 155–165.

Helena C, Gustafsson JA, Korach K, Pfaff D, Anselmo-Franci JA, Ogawa S (2009) Effects of estrogen receptor a and b gene deletion on estrogenic induction of progesterone receptors in the *Locus coeruleus* in female mice. *Endocr* 36:169–177.

Heritage AS, Stumpf WE, Sar M, Grant LD (1980) Brainstem catecholamine neurons are target sites for sex steroid hormones. *Science* 207: 1377–1379.

Hobson JA, McCarley RW, Wyzinski PW (1975) Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science* 189: 55-58.

Hodges MR, Best S, Richerson GB (2011) Altered ventilatory and thermoregulatory control in male and female adult Pet-1 null mice. *Respir Physiol Neurobiol* 177: 133–140.

Hoffman GE, Lyo D (2002) Anatomical markers of activity in neuroendocrine systems: are we all 'fos-ed out'? *J Neuroendocrinol* 14(4): 259-68.

Hojo Y, Hattori TA, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, Ishii HT, Mukai H, Morrison JH, Janssen WG, Kominami S, Harada N, Kimoto T, Kawato S (2004) Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101 (3):865-70.

Holley HS, Behan M, Wenninger JM (2012) Age and sex differences in the ventilatory response to hypoxia and hypercapnia in awake neonatal, pre-pubertal and young adult rats. *Respir Physiol Neurobiol* 180: 79–87.

Johnson SM, Haxhiu MA, Richerson GB (2008) GFP-expressing *Locus coeruleus* neurons from Prp57 transgenic mice exhibit CO₂/H⁺ responses in primary cell culture. *J Appl Physiol* 105: 1301-1311.

Kalil B, Leite CM, Carvalho-Lima M, Anselmo-Franci JA (2013) Role of sex steroids in progesterone and corticosterone response to acute restraint stress in rats: sex differences. *Stress* 16(4): 452-60.

Kapsimalis F, Kryger MH (2002a) Gender and obstructive sleep apnea syndrome, part 1: Clinical features. *Sleep* 25: 412–419.

Kapsimalis F, Kryger MH (2002b) Gender and obstructive sleep apnea syndrome, part 2: Mechanisms. *Sleep* 25: 499–506.

Kiyohara T, Miyata S, Nakamura T, Shido O, Nakashima T, Shibata, M (1995) Differences in Fos expression in the rat brains between cold and warm ambient exposures. *Brain Res Bull* 38: 193-201.

Lai YL, Lamm JE, Hilderbrandt J (1981) Ventilation during prolonged hypercapnia in the rat. *J Appl Physiol* 51: 78-83.

Li A, Nattie EE (2006) Catecholamine neurons in rats modulate sleep, breathing, central chemoreception, and breathing variability. *J Physiol* 570: 385–396.

Liaw JJ, He JR, Hartman RD, Barraclough CA (1992) Changes in tyrosine hydroxylase mRNA levels in medullary A1 and A2 neurons and *Locus coeruleus* following castration and estrogen replacement in rats. *Brain Res Mol Brain Res* 13: 231–238.

Loeschcke HH (1982) Central chemosensitivity and the reaction theory. *J Physiol* 332: 1–24.

Lopes LT, Patrone LG, Bicego KC, Coimbra NC, Gargaglioni LH (2012) Periaqueductal gray matter modulates the hypercapnic ventilatory response. *Pflugers Arch* 464(2):155-166.

MacLusky NJ, McEwen BS (1978) Oestrogen modulates progesterin receptor concentrations in some rat brain regions but not in others. *Nature* 274(5668):276-8.

Mitchell RA, Loeschcke HH, Massion WH, Severinghaus JW (1963) Respiratory responses mediated through superficial chemosensitive areas on the medulla. *J Appl Physiol* 18: 523–533.

Moore RY, Bloom FE (1979) Central catecholamine neuro systems: anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems. *Ann Rev Neurosci* 2: 113-168.

Nattie EE (1999) CO₂, brainstem chemoreceptors and breathing. Progress in Neurobiology 59: 299-331.

Nattie EE (2001) Central chemosensitivity, sleep, and wakefulness. Respir Physiol 129: 257-268.

Nattie EE, Li A (2002) CO₂ dialysis in nucleus tractus solitarius region of rat increases ventilation in sleep and wakefulness. J Appl Physiol 92: 2119-2130.

Nattie EE, Li A (2012) Respiration and autonomic regulation and orexin. Prog Brain Res 198: 25-46.

Noronha-de-Souza, C.R., Bicego, K.C., Michel, G., Glass, M.L., Branco, L.G.S., and Gargaglioni, L.H. (2006). Locus coeruleus is a central chemoreceptive site in toads. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 291(4), 997-1006.

Obonai T, Yasuhara M, Nakamura T, Takashima S (1998) Catecholamine neurons alteration in the brainstem of Sudden Infant Death Syndrome victims. Pediatrics 101 (2): 285-288.

Oyamada Y, Ballantyne D, Muckenhoff K, Scheid P (1998) Respiration-modulated membrane potential and chemosensitivity of *Locus coeruleus* neurones in the in vitro brainstem-spinal cord of the neonatal rat. J Physiol 513 : 381-398.

Patrick JM, Howard A (1972) The influence of age, sex, body size and lung size on the control and pattern of breathing during CO₂ inhalation in Caucasians. *Respir Physiol* 16: 337–350.

Patrone LG, Bicego KC, Hartzler LK, Putnam RW, Gargaglioni LH (2014) Cardiorespiratory effects of gap junction blockade in the *Locus coeruleus* in unanesthetized adult rats. *Respir Physiol Neurobiol* 190:86-95.

Paxinos G, Watson C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 3^a ed., San Diego, CA: Academic.

Pendergast JS, Tuesta LM, Bethea JR (2008) Oestrogen receptor beta contributes to the transient sex difference in tyrosine hydroxylase expression in the mouse *Locus coeruleus*. *J Neuroendocrinol* 20: 1155–1164.

Pepelko WE, Dixon GA (1974) Elimination of cold-induced nonshivering thermogenesis by hypercapnia. *Am J Physiol* 227: 264-267.

Pineda J, Aghajanian GK (1997) Carbon dioxide regulates the tonic activity of locus ceruleus neurons by modulating a proton- and polyamine-sensitive inward rectifier potassium current. *Neurosci* 77: 723–743.

Putnam RW, Filosa JA, Ritucci NA (2004) Cellular mechanisms involved in CO₂ and acid signaling in chemosensitive neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* 287 (6): 1493–1526.

Rebuck AS, Kangalee M, Pengelly LD, Campbell EJ (1973) Correlation of ventilatory responses to hypoxia and hypercapnia. *J Appl Physiol* 35: 173–177.

Saiki C, Mortola JP (1996) Effect of CO₂ on the metabolic and ventilatory responses to ambient temperature in conscious adult and newborn rats. *J Physiol* 491: 261-269.

Saunders NA, Heilpem S, Rebuck AS (1972) Relation between personality and ventilatory response to carbon dioxide in normal subjects: a role in asthma? *Br Med J* 18: 719–721.

Schläfke ME (1981) Central chemosensitivity: a respiratory drive. *Rev Physiol Biochem Pharmac* 90: 171–172.

Schlenker EH, Goldman M (1985) Ventilatory responses of aged male and female rats to hypercapnia and to hypoxia. *Gerontology* 31: 301–308.

Segovia S, Guillamón A, De Blas MR (1990) Aged-related changes in cell population in locus coeruleus in the rat. *Med Sci Res* 18: 29–30

Serova L, Rivkin M, Nakashima A, Sabban EL (2002) Estradiol stimulates gene expression of norepinephrine biosynthetic enzymes in rat *Locus coeruleus*. *Neuroendocrinology* 75: 193–200.

Shahar E, Redline S, Young T, Boland LL, Baldwin CM, Nieto FJ, O'Connor GT, Rapoport DM, Robbins JA (2003) Hormone replacement therapy and sleep-disordered breathing. *Am J Respir Crit Care Med* 167(9): 1186-1192.

Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I (1997) Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 388: 507–525.

Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, Swanson LW (1990) Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol* 294: 76–95.

Singewald N, Philippu A (1998) Release of neurotransmitters in the *Locus coeruleus*. *Prog Neurobiol* 56: 237-267.

Solomon IC, Edelman NH, Neubauer JA (2000) Pre-Bötzinger complex functions as a central hypoxia chemosensor for respiration in vivo. *J Neurophysiol* 83: 2854-2868.

Stunden CE, Filosa JA, Garcia AJ, Dean JB, Putnam RW (2001) Development of in vivo ventilatory and single chemosensitive neuron responses to hypercapnia in rats. *Respir Physiol* 127: 135–155.

Szabadi E (2013) Functional neuroanatomy of the central noradrenergic system. *J Psychopharmacol.* 27(8): 659–693.

Szawka RE, Helena CVV, Rodovalho GV, Monteiro PM, Franci CR, Anselmo-Franci JA (2005) Locus Coeruleus Norepinephrine Regulates the Surge of Prolactin During Oestrus. *J Neuroendocrinol* 17: 639–648.

Szawka RE, Rodovalho GV, Monteiro PM, Carrer HF, Anselmo-Franci JA (2009) Ovarian-steroid modulation of *Locus coeruleus* activity in female rats: involvement in luteinising hormone regulation. *J Neuroendocrinol* 21: 629–639.

Tamaki Y, Nakayama T (1987) Effects of air constituents on thermosensitivities of preoptic neurons: hypoxia versus hypercapnia. *Pflugers Arch* 409: 1-6.

Taneja P, Ogier M, Brooks-Harris G, Schmid DA, Katz DM, Nelson SB (2009) Pathophysiology of locus ceruleus neurons in a mouse model of Rett syndrome. *J Neurosci* 29(39): 12187-12195.

Tatsumi K, Moore LG, Hannhart B (1995) Influences of sex hormones on ventilation and ventilatory control. In: Dempsey, JA.; Pack, AI., editors. *Lung Biology in Health and Disease. Regulation of Breathing*. New York: Marcel Dekker, 829-864.

Taxini CL, Puga CC, Dias MB, Bícigo KC, Gargaglioni LH (2013) Ionotropic but not metabotropic glutamatergic receptors in the *Locus coeruleus* modulate the hypercapnic ventilatory response in unanaesthetized rats. *Acta Physiol (Oxf)* 208(1):125-135.

Teppema LJ, Veening JG, Kranenburg A, Dahan A, Berkenbosch A, Olivier C. (1997) Expression of c-Fos in the rat brainstem after exposure to hypoxia and to normoxic and hyperoxic hypercapnia. *J Comp Neurol* 388: 169-190.

Thornton JE, Nock B, McEwen BS, Feder HH (1986) Estrogen induction of progesterin receptors in microdissected hypothalamic and limbic nuclei of female guinea pigs. *Neuroendocrinology* 43(2):182-188.

Ueyama T, Tanioku T, Nuta J, Kujira K, Ito T, Nakai S, Tsuruo Y (2006) Estrogen alters c-Fos response to immobilization stress in the brain of ovariectomized rats. *Brain Res* 1084(1): 67-79.

Wenninger JM, Olson EB, Cotter CJ, Thomas CF, Benhan M (2009) Hypoxic and hypercapnic ventilatory responses in aging male vs. aging female rats. *J Appl Physiol* 106: 1522-1528.

Wesström J, Ulfberg J, Nilsson S (2005) Sleep apnea and hormone replacement therapy: a pilot study and a literature review. *Acta Obstet Gynecol Scand* 84(1): 54-57.

White DP, Douglas NJ, Pickett CK, Weil JV, Zwillich CW (1983) Sexual influence on the control of breathing. *J Appl Physiol* 54: 874-879.

Xu S, Guo S, Jiang X, Yin Q, Umezawa T, Hisamitsu T (2003) Effect of indomethacin on the c-Fos expression in AVP and TH neurons in rat brain induced by lipopolysaccharide. *Brain Res* 966: 13-18.

Xue B, Hay M (2003) 17β -Estradiol inhibits excitatory amino acid-induced activity of neurons of the nucleus tractus solitaries. *Brain Research* 976: 41–52.

Yuan L, Brewer C, Pfaff D (2002) Immediate-early Fos protein levels in brainstem neurons of male and female gonadectomized mice subjected to cold exposure. *Stress* 5(4): 285-294.

Zabka AG, Behan M, Mitchell GS (2001a) Time-dependent hypoxic respiratory responses in female rats are influenced by age and by the estrus cycle. *J Appl Physiol* 91: 2831-2838.

Zabka AG, Behan M, Mitchell GS (2001b) Long term facilitation of respiratory motor output decreases with age in male rats. *J Physiol* 531: 509–514.