

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS - PIPGCF - UFSCAR/UNESP

**Influência dos hormônios sexuais nas respostas ventilatórias,
termorreguladoras e na concentração de monoaminas de ratos e ratas**

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão

Msc. Danuzia Ambrozio Marques

Jaboticabal

Agosto de 2019

DANUZIA AMBROZIO MARQUES

**Influência dos hormônios sexuais nas respostas ventilatórias,
termorreguladoras e na concentração de monoaminas de ratos e ratas**

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” (Associação UFSCar/UNESP) como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas.

Jaboticabal, agosto de 2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Danuzia Ambrozio Marques, realizada em 29/08/2019:



Profa. Dra. Luciane Helena Gargalioni Batalhao
UNESP



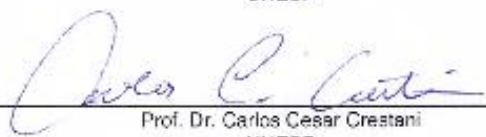
Profa. Dra. Janete Aparecida Anselmo Franci
USP



Prof. Dr. Glauber dos Santos Ferreira da Silva
UFMG



Profa. Dra. Mirela Barros Dias
UNESP



Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani
UNESP

“A dream you dream alone is only a dream. A dream you dream together is reality”.

(John Lennon)

“Construí amigos, enfrentei derrotas, venci obstáculos, bati na porta da vida e disse-lhe:

Não tenho medo de vivê-la!” (Augusto Cury)

APRESENTAÇÃO

Esta tese, referente ao meu projeto de doutorado, teve como foco a produção de ciência básica na área de fisiologia com enfoque em fisiologia respiratória e neurociências. Nosso estudo abordou a influência do sexo e hormônios sexuais na respiração e na nas concentrações de monoaminas em regiões do Sistema Nervoso Central ligadas a respiração e controle da temperatura corporal. Os hormônios sexuais podem estar envolvidos em diversas doenças referentes ao sistema respiratório uma vez que já é consolidado na literatura que muitos distúrbios respiratórios, como síndrome da morte súbita infantil (SIDS) e distúrbios respiratórios do sono são sexualmente dimórficas sendo mais prevalentes em homens do que em mulheres.

Uma revisão publicada na revista *Nature* em 2012 (MOGIL, 2012) discutiu que na meta-análise feita pelos autores que analisaram artigos publicados entre 1996 e 2005 que usaram ratos como modelos animais para experimentos, cerca de 80% de todos os experimentos usaram apenas roedores machos. Apenas 8% usaram fêmeas e dos estudos que utilizaram ambos os sexos, a maioria não apresentou discussão sobre se as diferenças entre ambos, em 3% dos estudos o sexo dos animais não foi ao menos relatado. Nossos estudos publicados em 2015 (MARQUES et al., 2015) foram os primeiros a considerar o ciclo estral de fêmeas nas respostas respiratórias a hipercapnia e o presente estudo foi pioneiro quanto a quantificação das monoaminas em diferentes regiões do SNC de fêmeas em diferentes fases do ciclo estral. Os presentes achados em nossa pesquisa e a continuidade destes estudos visam contribuir para esclarecer a modulação de hormônios sexuais na ventilação, metabolismo e controle da temperatura corporal buscando assim construir uma base para avanços no diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças ou até mesmo proporcionar uma melhoria na qualidade de vida das pessoas.

Nossa pesquisa buscou produzir conhecimento na área de fisiologia respiratória e dimorfismo sexual para que este conhecimento gere progresso científico, uma vez que o avanço na ciência depende de um acúmulo contínuo de conhecimento produzido por diversos cientistas ao longo do tempo. Para tanto, fizemos esforços para estreitar colaborações com diversos pesquisadores dentro e fora do Brasil. No Brasil, fizemos colaborações com importantes pesquisadores da área, como a Profa. Dra. Janete A. Anselmo-Franci, docente da Universidade Estadual de São Paulo (USP) *campus* de Ribeirão Preto e os professores Dr. Raphael E. Szawka e Dr. Glauber S. F. da Silva, docentes da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) *campus* de Belo Horizonte, cuja colaboração resultou em dois artigos já publicados, o primeiro referente ao meu mestrado (MARQUES et al., 2015) e o segundo referente a parte da minha pesquisa de doutorado (MARQUES et al., 2017). A colaboração com a Profa. Dra. Débora de Carvalho Dourado do Instituto Federal do Sul de Minas Gerais *campus* Machado, resultou em uma publicação da qual faço parte como co-autora (DE CARVALHO et al., 2017). Também possuo uma publicação em co-autoria com o doutorando Luís Gustavo Patrone, do nosso grupo de pesquisa (PATRONE et al., 2018). Adicionalmente colaborações com os professores Dr. Carlos César Crestani, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) *campus* de Araraquara e o Dr. Renato Nery Soriano da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) *campus* Getúlio Vargas, foram imprescindíveis para que a avaliação e análise das monoaminas do presente estudo pudessem se realizar. Um manuscrito referente a este trabalho está em elaboração.

No exterior, durante meu período de doutorado sanduíche tive um trabalho publicado como coautora em colaboração grandes pesquisadores como o Dr. Richard Kinkead, Dra. Luana Tenório Lopes, Dra. Marie-Ève Tremblay, Dr. Guy Drolet, e Dr. Frederic Bretzner vinculados à Université Laval, em Quebec – QC, no Canadá (TENORIO-LOPES et al., 2017b), também pude trabalhar como parte do grupo de pesquisa do Dr. Vincent Joseph. Da colaboração entre

os grupos de pesquisa do Dr. Richard Kinkead e Dr. Vincent Joseph surgiu a pesquisa referente a micróglia apresentada como última parte da tese do qual um manuscrito foi elaborado e em breve será submetido para publicação. Para finalizar, tenho uma revisão da qual sou co-autora já aceita para publicação na revista *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* (Título: “Sex differences in breathing”, Dr Luciane Gargaglioni; Danuzia Marques; Luis Patrone)

No Brasil fui bolsista FAPESP (nº do Processo Individual – Bolsa de doutorado 2016/04276-9) e CNPQ (nº do Processo Individual – Bolsa de doutorado 140715/2015-0), e no Exterior bolsista BEPE (processo FAPESP 2016/21730-5 – ligado ao processo 2016/04276-9).

AGRADECIMENTOS

Quando criança sempre disse que queria ser cientista, mas para alcançar esse sonho não sabia quão grande e maravilhosa seria a caminhada. Foi algo maior que um pequeno sonho de criança, foi um sonho realizado em conjunto, além da família, dos amigos, de meus professores de toda a vida, de todos os funcionários que trabalharam para que as coisas estivessem ali. Indiretamente também fui auxiliada por toda a população do Brasil, já que nossa universidade é pública, mas indo ainda mais além, posso dizer que no mundo estamos todos ligados de alguma maneira e assim estender meu agradecimento a todas as pessoas, pois a ciência não tem fronteiras. Fora do Brasil fui a congressos onde aprendi muito, estabelecemos colaborações, descobrimos oportunidades e também divulgamos nossos resultados. Assim, agradeço a todos que na caminhada direta ou indiretamente contribuíram para que esse trabalho fosse possível.

Reconheço que somos muito pequenos neste vasto universo. Meu trabalho de doutorado é muito maior do que o que está nestas páginas, por isso agradeço a Deus pela oportunidade da vida.

A professora Luciane e a professora Kênia, que me mostraram a força da mulher na ciência e também foram um exemplo de mulheres fortes e determinadas, mas ao mesmo tempo amigas e doces.

Aos técnicos e todos os funcionários que no passado construíram o alicerce do que temos hoje e também a cada pessoa que direta ou indiretamente faz o seu melhor para que a universidade esteja viva e nós jovens possamos realizar nossos sonhos.

Agradeço aos amigos, do laboratório ou da vida, pessoas boas e incríveis que sempre estiveram comigo, seria impossível citar o nome de cada um, mas agradeço pelas alegrias, diálogos e sonhos compartilhados. Pessoas que conheci e vou levar no coração.

Também agradeço à minha família. Tia Rô, tio João e os "Duro" que são a família que Deus me deu.

Aos meus padrinhos, Josefina e João que estão na base da minha construção e meus primos Francine e Lucas que são como irmãos.

Finalmente agradeço aos meus pais, que são minha maior referência. No trecho da música "como nossos pais" está escrito que "apesar de termos feito tudo que fizemos, ainda somos os mesmos e vivemos como os nossos pais". Viver como vocês é um orgulho pois é construir um lar de amor e fraternidade. Para vocês meu mais profundo agradecimento, tenho muita admiração pelo que são. Obrigada por me trazerem até aqui com todo amor e toda dedicação de uma vida. Agradeço também ao, **meu irmão**, meu melhor amigo e companheiro, que não tenho nem palavras suficientes para agradecer.

À FAPESP pelo auxílio financeiro (nº do Processo Individual – Bolsa de doutorado 2016/04276-9) e ao CNPQ (nº do Processo Individual – Bolsa de doutorado 140715/2015-0).

Agradeço assim, a todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim dando significado a minha vida.

Meu muito obrigada, de todo o meu coração.

SUMÁRIO

RESUMO	1
---------------------	----------

ABSTRACT	3
-----------------------	----------

SÍNTESE GERAL

1. INTRODUÇÃO	6
1.1 Resposta ventilatória à hipóxia (HVR), hipercapnia (HcVR) e controle da Tc	9
1.2 Monoaminas e núcleos respiratórios	11
1.3 Microglia e ventilação	13
2 OBJETIVOS	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
4. PRINCIPAIS RESULTADOS ENCONTRADOS.....	16
5. DISCUSSÃO GERAL	17

CAPÍTULO 1

Role of testosterone in the ventilatory, metabolic and thermal responses to hypercapnia and hypoxia in male rats

ABSTRACT	21
-----------------------	-----------

1. INTRODUCTION	22
------------------------------	-----------

2. MATERIAL AND METHODS	24
--------------------------------------	-----------

2.1 Animals	24
-------------------	----

2.1.1 Surgery	24
---------------------	----

2.1.2 Implantation of temperature-measuring device	24
----------------------------------------------------------	----

2.1.3 Orchidectomy and hormone treatment	25
------------------------------------------------	----

2.1.4 Ventilatory, T _b , and Metabolic Measurements	25
----------------------------------------------------------------------	----

2.2	Experimental Protocol.....	27
2.2.1	<i>CB Removal and Immunohistochemistry</i>	28
2.2.2	<i>Immunofluorescence</i>	28
2.3	Statistical Analysis	29
3	RESULTS	30
3.1	Effect of orchidectomy and T replacement on seminal vesicle mass.....	30
3.2	Effect of orchidectomy and T replacement on thermal responses to hypercapnia and hypoxia	32
3.3	Effect of orchidectomy and T replacement on ventilation	33
3.4	Effect of orchidectomy and T replacement on metabolic variables	39
3.5	CB Immunohistochemistry.....	43
4	DISCUSSION	46
5	CONCLUSION	50

CAPÍTULO 2

Influence of estrous cycle hormonal fluctuations and gonadal hormones on the ventilatory response to hypoxia in female rats

ABSTRACT	52
1 INTRODUCTION	53
2 MATERIALS AND METHODS	55
2.1 Animals	55
2.2 Determination of the estrous cycle.....	55
2.3 Surgical procedures	56
2.4 Ovariectomy and hormonal replacement.....	56
2.5 Determination of pulmonary ventilation, body temperature and metabolism.....	57
2.6 Statistical analyses.....	58
3 RESULTS	59
3.1 Estrous cycle: Ventilation, body temperature and metabolism in normoxia and hypoxia	61
3.1.1 <i>Ventilation</i>	61

3.1.2	<i>Metabolism</i>	63
3.1.3	<i>Body temperature</i>	64
3.2	Ovariectomy and hormonal replacement: Ventilation, body temperature and metabolism in normoxia and hypoxia	64
3.2.1	<i>Ventilation</i>	64
3.2.2	<i>Metabolism</i>	67
3.2.3	<i>Body temperature</i>	68
4	DISCUSSION	69
4.1	Estrous cycle: Ventilation, body temperature and metabolism in normoxia and hypoxia	69
4.2	Ovariectomy and hormonal replacement: Ventilation, body temperature and metabolism in normoxia and hypoxia	70
5	CONCLUSION	73

CAPÍTULO 3

Influência dos hormônios sexuais na concentração de monoaminas e seus metabólitos em resposta à hipercapnia e hipóxia no LC, núcleos da Rafe e área pré-óptica, em ratos e ratas *Wistar* intactos e castrados

RESUMO	75
1 INTRODUÇÃO	76
2 MATERIAIS E MÉTODOS	79
2.1 Animais	79
2.1.1 <i>Procedimentos cirúrgicos</i>	79
2.1.2 <i>Soluções e mistura gasosa utilizadas</i>	81
2.1.3 <i>Determinação da fase do ciclo estral</i>	81
2.2 Protocolos Experimentais.....	81
2.2.1 <i>Efeito da castração na concentração de monoaminas</i>	81
2.2.2 <i>Dosagem de monoaminas e seus metabólitos</i>	85

2.2.3	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector eletroquímico (HPLC-ED)</i>	85
2.3	Análise de dados.....	87
3	RESULTADOS	87
3.1	MPA: Avaliação das monoaminas nos diferentes grupos experimentais submetidos a exposição gasosa	88
3.1.1	<i>Efeito do ciclo estral nas concentrações de monoaminas na MPA</i>	88
3.1.2	<i>Efeito da ovariectomia nas concentrações de monoaminas na MPA</i>	93
3.1.3	<i>Efeito da orquidectomia nas concentrações de monoaminas na MPA</i>	98
3.1.4	<i>Efeito do sexo nas concentrações de monoaminas na MPA</i>	101
3.1.5	<i>Sistematização dos principais resultados encontrados nas concentrações de monoaminas na MPA</i>	103
3.2	LC: Avaliação das monoaminas nos diferentes grupos experimentais submetidos a exposição gasosa	104
3.2.1	<i>Efeito do ciclo estral nas concentrações de monoaminas no LC</i>	104
3.2.2	<i>Efeito da ovariectomia nas concentrações de monoaminas no LC</i>	109
3.2.3	<i>Efeito da orquidectomia nas concentrações de monoaminas no LC</i>	114
3.2.4	<i>Efeito do sexo nas concentrações de monoaminas no LC</i>	119
3.2.5	<i>Sistematização dos principais resultados encontrados nas concentrações de monoaminas no LC</i>	121
3.3	RAFE caudal: Avaliação das monoaminas nos diferentes grupos experimentais submetidos a exposição gasosa	122
3.3.1	<i>Efeito do ciclo estral nas concentrações de monoaminas na Rafe Caudal</i>	123
3.3.2	<i>Efeito da ovariectomia nas concentrações de monoaminas na Rafe Caudal</i>	127
3.3.3	<i>Efeito da orquidectomia nas concentrações de monoaminas na Rafe</i>	132
3.3.4	<i>Sistematização dos principais resultados encontrados nas concentrações de monoaminas na Rafe caudal</i>	138
3.4	SISTEMATIZAÇÃO DOS RESULTADOS	139
4	DISCUSSÃO	140
5	CONCLUSÃO	144

CAPÍTULO 4

Evaluation of microglia morphology in brainstem chemosensitive areas and paraventricular nucleus in ovariectomized rats submitted to hypercapnia

ABSTRACT	146
1 INTRODUCTION	147
2 MATERIAL AND METHODS	150
2.1 Animals	150
2.2 Ovariectomy	151
2.3 Gas exposure protocol	151
2.4 Immunohistochemistry	152
2.5 Microglia Analyses	152
2.6 Statistical Analysis	154
3 RESULTS	155
4 DISCUSSION	166
5 CONCLUSION	169
CONSIDERAÇÃO FINAL	169
REFERÊNCIAS	172

LISTA DE ABREVIACOES

CO₂ – Dióxido de carbono

DA - Dopamina

E₂ - Estradiol

EPM – Erro Padrão da Média

fR– Frequência Respiratória

I.M.– Intra-Muscular

I.P.– Intra-Peritoneal

LC – *Locus Coeruleus*

MPA - Área Pré-Optica Medial do hipotálamo

N₂– Nitrogênio

NOR - Noradrenalina

NTS – Núcleo do trato solitário

O₂– Oxigênio

ORX - Ratos orquidectomizados.

OVX - Fêmeas ovariectomizadas

OVX + E₂- Fêmeas ovariectomizadas com injeção de estradiol

OVX+ E₂P- Fêmeas ovariectomizadas com injeção de estradiol com combinação de progesterona

OVX+O- Fêmeas ovariectomizadas com injeção de óleo

P – Progesterona

S.C. - Subcutâneo

SNC – Sistema Nervoso Central

T - Testosterona

T_c– Temperatura Corporal

\dot{V}_E – Ventilação

$\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ - Equivalente Respiratório

$\dot{V}O_2$ – Consumo de Oxigênio

V_T– Volume Corrente

5-HT - Serotonina

RESUMO

De acordo com a literatura atual, existem muitas diferenças entre os sexos no controle da ventilação e também em anormalidades do sistema respiratório, como as apneias e hipopnéias que apresentam uma incidência três vezes maior em homens do que em mulheres. Diferenças sexo-específicas também são observadas no controle da temperatura corporal (Tc) uma vez que mulheres apresentam uma temperatura variável ao longo do ciclo menstrual. Uma possível explicação para essa diferença entre os sexos, tanto no controle da Tc, quanto da respiração, pode estar ligada as diferenças de concentrações de hormônios sexuais, capazes de agir em receptores das células de micróglia, e também no sistema nervoso central (SNC) e periférico que por sua vez participam da rede de controle respiratório. Adicionalmente sabe-se que as principais monoaminas, dopamina (DA), noradrenalina (NOR) e a serotonina (5-HT), são neurotransmissores que participam no controle da ventilação e da termorregulação atuando em regiões do SNC como o Área Pré-óptica medial do Hipotálamo (MPA), Locus coeruleus (LC) e rafe caudal, que por sua vez apresentam diferenças sexo-específicas. Assim, o objetivo do nosso estudo foi avaliar a influência dos principais hormônios sexuais sobre a ventilação e temperatura corporal bem como quantificar as monoaminas nos núcleos da Rafe, MPA e LC, de ratos machos e fêmeas frente aos desafios gasosos de hipercapnia e hipóxia. Também avaliamos as características morfológicas da micróglia de ratas intactas e castradas, em condições de normóxia e hipercapnia, em regiões do SNC envolvidas com o controle da ventilação. Nós demonstramos que a orquidectomia diminui a ventilação durante a normóxia normocapnica em ratos e a reposição hormonal de testosterona (T) foi capaz de restaurá-la, além de promover aumento na quimiossensibilidade ventilatória em hipóxia e hipercapnia sem alterar o metabolismo ou da temperatura corporal dos animais. Em fêmeas, as flutuações hormonais durante o ciclo estral não foram suficientes para promover mudanças na ventilação frente a hipóxia, entretanto a OVX diminui a resposta ventilatória dos animais em cerca de

40%, sendo que a reposição hormonal não elevou essa resposta. Adicionalmente, nós demonstramos que hormônios sexuais exercem influência quanto a quantificação de monoaminas (e seus metabólitos) em resposta a hipercapnia e hipóxia no LC, núcleos da Rafe e MPA, em ratos *Wistar* machos e fêmeas intactos e castrados. Finalmente, nós demonstramos que os hormônios ovarianos podem prevenir a reatividade microglial em estruturas sensíveis a CO_2/H^+ do SNC em fêmeas. Desta forma, nossos dados em conjunto demonstram que existem diferenças relacionadas ao sexo quanto ao controle ventilatório de machos e fêmeas, bem como na quantificação de monoaminas no LC, MPA e Rafe. Também demonstramos que em fêmeas as células da micróglia respondem tanto a OVX quanto a hipercapnia em regiões que participam do controle ventilatório.

Palavras-chave: SNC, dimorfismo-sexual, catecolaminas, punch, HPLC-ED, pletismografia, reposição hormonal, castração, microglia.

ABSTRACT

Evidences in the literature show differences between sexes in the control of ventilation and in the prevalence of respiratory disorders such as sleep apneas or hypopneas, that occurs three times more in men than women. Sex-specific differences are also observed in body temperature control (T_b) since women present changes through the menstrual cycle. Those differences between sexes in both T_b and ventilation suggest a possible role of gonadal hormones in the respiratory control, which can act on microglial cells and peripheral or CNS receptors that, in turn, control the respiratory network. Additionally, it is known that the main monoamines, dopamine (DA), noradrenaline (NOR) and serotonin (5-HT), are neurotransmitters that participate in ventilation and thermoregulation control acting in CNS regions such as the medial preoptic area of the hypothalamus (MPA), Locus coeruleus (LC), and bulbar raphe, which in turn, present sex-specific differences. Thus, our study aimed to evaluate the influence of the main sex hormones on ventilation and body temperature as well as to quantify the monoamines in the raphe, MPA and LC of male and female rats during hypercapnia and hypoxia conditions. We also evaluated the morphological characteristics of the microglia cells in intact and ovariectomized (OVX) rats under normocapnia and hypercapnia in CNS regions involved with ventilation control. We showed that orchietomy (ORX) decreases ventilation during normocapnic-normoxia and testosterone (T) replacement was able to restore it as well as changing the chemosensitivity to hypoxia and hypercapnia without altering the metabolism or body temperature of animals. In females, hormonal fluctuations during the estrous cycle did not change the ventilatory and metabolic parameters during hypoxia, however, OVX decreases the ventilatory response of animals by 40% and hormone replacement did not restore this response. Besides, we demonstrate that sex hormones influence the quantification of monoamines (and their metabolites) in response to hypercapnia

and hypoxia in LC, bulbar raphe and MPA in intact and castrated male and female *Wistar* rats. Finally, we showed that ovarian hormones could prevent microglial reactivity in CO₂/H⁺ sensitive structures in females. Thus, taken together, we described that there are sex-related differences in male and female ventilatory control, as well as in the quantification of monoamines in LC, MPA and Raphe nucleus. We also demonstrate that in females microglia cells respond to both OVX and hypercapnia in regions that participate in ventilatory control.

Keywords: CNS, sexual dimorphism, catecholamine, punch, HPLC-ED, plethysmography, hormone replacement, castration, microglia.

SÍNTESE GERAL

1. INTRODUÇÃO

Quase todo o conhecimento disponível em fisiologia é baseado em pesquisas em modelos animais masculino. A tendência de ignorar as fêmeas, no entanto, não se restringe à fisiologia, mas a todas as áreas da ciência. Há evidências de um viés relacionado ao sexo em muitos aspectos, como em estudos de anatomia, organização encefálica e neurotransmissão em humanos e animais. Por exemplo, o Locus Coeruleus (LC) (LUQUE et al., 1992; PENDERGAST; TUESTA; BETHEA, 2008; THANKY; SON; HERBISON, 2002), área tegumentar ventral (BROWN et al., 2015), área pré-óptica (GORSKI et al., 1978, 1980; RAISMAN; FIELD, 1971), substantia nigra (MA et al., 2007), neocórtex, hipocampo e corpo caloso (JURASKA, 1991) do encéfalo de ratos é diferente em machos e fêmeas. Além disso, fibras contendo tirosina hidroxilase (TH) também possuem uma distribuição sexualmente dimórfica (KRITZER; CREUTZ, 2008).

Progressivamente, foi reconhecido que o sexo pode afetar o controle da respiração e a suscetibilidade para algumas doenças respiratórias (BLOCK et al., 1979a; HOLLEY; BEHAN; WENNINGER, 2012; JIANG et al., 2017; LIN; WINER, 2008; WENNINGER et al., 2009). É bem conhecido que fêmeas são menos susceptíveis às doenças respiratórias no período pós-natal, produzem surfactante pulmonar antes dos machos e tem amadurecimento pulmonar mais cedo que machos (GORTNER; SHEN; TUTDIBI, 2013). Adicionalmente, fêmeas têm melhor recuperação respiratória do que machos após um episódio grave de hipóxia (GARCIA III et al., 2013). Alguns estudos mostraram que há um dimorfismo sexual em humanos em anormalidades do sistema respiratório, como a asma, distúrbios respiratórios relacionados ao sono como apneias repetidas, hipopnéias e oscilações respiratórias, que têm uma incidência três vezes maior em homens adultos (BEHAN et al., 2011), ou na ocorrência de síndrome da morte súbita em recém-nascidos (SIDS) (EMERY; HLASTALA; MATSUMOTO, 1994).

A asma durante a infância, é mais prevalente em meninos, mas após a puberdade, as mulheres têm um risco maior de desenvolver a doença do que os homens (DE MARCO et al., 2000). Mudanças

na ocorrência de asma que coincidem com as flutuações nos hormônios sexuais sugerem fortemente um papel para os hormônios sexuais na patogênese da doença (CEPHUS et al., 2017). De fato, Mileva e Maleeva (1988) demonstraram que pacientes do sexo masculino com asma grave ou moderada apresentam baixos níveis de testosterona, mas esse hormônio estava em concentrações normais em pacientes com a forma leve da doença, sugerindo que a testosterona pode ter um papel protetor em pacientes asmáticos.

Já os distúrbios respiratórios do sono (SDB) são caracterizados como uma condição de interrupção da respiração, geralmente associada a doenças crônicas, como a síndrome da apneia obstrutiva do sono (OSA) e outras condições psiquiátricas (JAFFE; MARKOV; DOGHRAMJI, 2006). A prevalência da OSA é duas a três vezes mais frequente em homens adultos do que em mulheres (PEPPARD et al., 2013); no entanto, em mulheres na menopausa, observou-se um aumento de cerca de 200% na prevalência de OSA, independentemente de outros fatores de risco (ANTTALAINEN et al., 2006; BIXLER et al., 2001; SKEGG, 2001), sugerindo que os hormônios sexuais femininos poderiam ser protetores para essas condições. Adicionalmente, a SIDS é uma doença cuja prevalência é maior em indivíduos do sexo masculino na proporção de 60:40 sendo a maior causadora de morte de crianças de até um ano de idade no mundo (FORUM OF INTERNATIONAL RESPIRATORY SOCIETIES, 2017; MOON; HORNE; HAUCK, 2007). No entanto, as causas dessas diferenças não são totalmente compreendidas. Segundo Cahill, (2006) o dimorfismo sexual pode ajudar a explicar descobertas aparentemente contraditórias. Desconsiderar as influências do sexo nos estudos pode apenas retardar o progresso científico principalmente no entendimento e tratamento de doenças.

Outro ponto importante que deve ser destacado é que quando as fêmeas são usadas em estudos, os autores muitas vezes não consideram as flutuações das concentrações de hormônios circulantes que ocorrem durante o ciclo menstrual ou ciclo estral. Esta última consideração emergiu como um fator importante a ser considerado quando se trabalha com fêmeas em cenários clínicos e em diversas áreas de pesquisa (SINGLETERY et al., 2005).

De fato, a revisão de MOGIL, (2012) publicada na revista *Nature*, identificou que em artigos publicados entre 1996 e 2005 que usaram ratos como modelos animais para experimentos cerca de 80% de todos os experimentos usaram apenas roedores machos. Nosso estudo publicado em 2015 (MARQUES et al., 2015) foi o primeiro a considerar o ciclo estral de fêmeas nas respostas respiratórias a hipercapnia e o presente estudo foi o pioneiro quanto a quantificação das monoaminas em diferentes regiões do SNC de fêmeas em diferentes fases do ciclo estral. Estudos anteriores demonstraram que as respostas ventilatórias à hipóxia e hipercapnia em mulheres podem variar durante as diferentes fases do ciclo menstrual, mostrando que as flutuações hormonais também são um aspecto que deve ser considerado (BEHAN et al., 2011; REGENSTEINER et al., 1989; WHITE et al., 1983a). Por outro lado, poucos estudos examinaram a influência do ciclo estral e da castração na respiração em modelos animais (MARQUES et al., 2015). Assim, mais estudos comparando machos e fêmeas, e também os efeitos de ambos os hormônios sexuais exógenos e endógenos no sistema respiratório, são necessários.

Os principais hormônios sexuais são testosterona (T), progesterona (P) e estradiol (E₂), produzidos por machos e fêmeas durante a vida adulta em diferentes concentrações (BEHAN et al., 2011). Os machos produzem T em concentrações mais altas em comparação às fêmeas, que, por sua vez, produzem E₂ e P em concentrações mais altas (BEHAN et al., 2011). Os hormônios sexuais exercem suas ações via receptores nucleares e de membrana (HANSBERG-PASTOR et al., 2015) e são capazes de alterar a permeabilidade da membrana e a expressão de proteínas mitocondriais e genes que medeiam muitos mecanismos celulares (CAPLLONCH-AMER et al., 2014; KLINGE, 2008).

As concentrações dos de hormônios sexuais foram associados com a V_E há mais de um século atrás, começando com Magnus-Levy, que, em 1904, descreveram que as mulheres hiperventilam durante a gravidez (MAGNUS-LEVY, 1904). Uma década depois, Hasselbach e Gammeltoft (1915) mostraram que as mulheres hiperventilam durante a fase lútea do ciclo menstrual e, em 1929, Griffith e colaboradores demonstraram que as variações de V_E desaparecem em mulheres na pós-menopausa.

Em conjunto, esses estudos sugeriram, pela primeira vez, a influência dos hormônios gonodais na V_E . Estudos posteriores em mulheres grávidas mostraram que a hiperventilação em repouso, mesmo no primeiro trimestre da gravidez, estava ligada a um aumento do V_T sem alteração na frequência respiratória (fR) (KNUTTGEN; EMERSON, 2017; MACRAE; PALAVRADJI, 1967). Um estudo mais recente verificou que a hiperventilação durante a gestação é o resultado de ajustes no equilíbrio ácido-base, taxa metabólica, fluxo sanguíneo encefálico, e mudanças na vigília, que atuam no quimiorreflexo central, o que pode ser resultado parcialmente causado por um aumento nas concentrações de hormônios sexuais (JENSEN et al., 2008).

1.1 Resposta ventilatória à hipóxia (HVR), hipercapnia (HcVR) e controle da T_c

Muitos estudos avaliaram a diferença na quimiossensibilidade ventilatória entre macho e fêmea frente a hipóxia; no entanto, os resultados não são consensuais. Em humanos, a HVR foi relatada como menor em mulheres do que em homens (CARAVITA et al., 2015; GOLDBERG et al., 2017; WHITE et al., 1983a), similar entre os sexos (HIRSHMAN; MCCULLOUGH; WEIL, 1975; JENSEN et al., 2005; KUNITOMO et al., 1988; MARCUS et al., 1994; REGENSTEINER et al., 1988; SAJKOV et al., 1997), ou maior nas mulheres (AITKEN et al., 1986). Como observado em humanos, há também disparidade entre os estudos em outros grupos de animais. Em ratos (12 e 24 meses de idade), Schlenker e Goldman (1985) mostraram que a HVR das fêmeas foi menor que nos machos. No entanto, Mortola e Saiki (1996) observaram que tanto as ratas pré-púberes quanto as adultas (ovariectomizadas) apresentam uma maior resposta hiperventilatória ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$) à hipóxia do que os machos. Da mesma forma, Wenninger et al. (2009) mostraram que as ratas velhas tinham uma resposta ventilatória maior à hipóxia em comparação aos machos; entretanto, o equivalente respiratório foi semelhante em animais jovens e de meia-idade, machos e fêmeas. Da mesma forma, estudos em gatos (TATSUMI et al., 1991a) e camundongos (BOUKARI et al., 2016a) observaram que as fêmeas tiveram uma maior HVR em relação aos machos.

Assim como descrito para as respostas ventilatórias basais a hipóxia, os dados sobre influências sexuais na HcVR também não são homogêneos. Muitos estudos mostraram que a resposta ventilatória ao CO₂ está aumentada em homens saudáveis em comparação com mulheres durante a vigília (BERTHON-JONES; SULLIVAN, 1984; JENSEN, 2005; MACNUTT et al., 2012; PATRICK; HOWARD, 1972; WHITE et al., 1983a). Por outro lado, DOUGLAS et al. (1982) não relataram diferença na HcVR entre homens e mulheres, na vigília ou no sono, ao usar a resposta ventilatória absoluta ao CO₂ corrigida para a área de superfície corporal. Outros estudos também não encontraram diferenças na HcVR entre os sexos em seres humanos (AITKEN et al., 1986; GOLDBERG et al., 2017; HIRSHMAN; MCCULLOUGH; WEIL, 1975; KUNITOMO et al., 1988; MARCUS et al., 1994; SAUNDERS; HEILPERN; REBUCK, 1972).

Curiosamente, mesmo a literatura não sendo homogênea em relação à resposta respiratória frente ao desafio de CO₂ entre homens e mulheres (alguns estudos indicam um aumento da resposta ventilatória em homens, enquanto outros indicam respostas semelhantes entre homens e mulheres), não encontramos estudos que indiquem maior resposta ventilatória em mulheres em comparação aos homens durante a hipercapnia, o que poderia indicar um padrão. Como mencionado anteriormente, os métodos para avaliar a HCVR também são variáveis entre os estudos.

Entretanto, em relação a outros modelos animais, a literatura é ambígua. HOLLEY; BEHAN; WENNINGER (2012) analisaram parâmetros ventilatórios em ratos machos e fêmeas adultos (P30 e P90) e não mostraram alterações significativas na HcVR entre machos e fêmeas. Em gatos, a HcVR não foi diferente entre fêmeas e machos castrados e intactos quando expressos como valores absolutos ou normalizados para a massa corporal (TATSUMI et al., 1991b). Além disso, o estudo de POLOTSKY et al. (2001) mostrou que não houve efeito estatístico do sexo durante a resposta ventilatória à hipercapnia em vigília ou durante o sono de movimento não rápido dos olhos (NREM) em camundongos C57BL/6J, embora existisse uma tendência para a resposta ventilatória hipercápica ser maior durante o sono REM em machos em comparação com as fêmeas. No entanto, ao contrário dos estudos em humanos, existem alguns relatos na literatura em que fêmeas possuem

HcVR maior que machos. A saber, encontramos dois estudos utilizando camundongos e um estudo que a utilizou ratas Sprague Dawley (BOUKARI et al., 2016a; GENEST et al., 2007; HUEY et al., 2000).

Adicionalmente, os hormônios sexuais podem influenciar a Tc por ação direta sobre os neurônios da POA (COOMBER; CREWS; GONZALEZ-LIMA, 1997; CREWS et al., 1996; SWAAB et al., 2001). Os receptores para P, T e para os estrogênios estão todos expressos na POA, onde os seus ligantes atuam preferencialmente, mas não exclusivamente, em neurônios sensíveis à temperatura (SILVA; BOULANT, 1986; TSAI; KANOSUE; MATSUMURA, 1992; TSAI; MATSUMURA; NAKAYAMA, 1988). No entanto, apenas os efeitos da P na Tc basal parecem ser mediados centralmente, enquanto que o E₂ e a T parecem estar mais envolvidos em alterações da Tc em resposta à mudanças da temperatura ambiente (BROWN; GANDER; GOODALE, 1970; MARRONE; GENTRY; WADE, 1976).

Outros núcleos também participam do controle da termogênese, é sabido, por exemplo, que o LC participa da regulação da Tc durante a febre (ALMEIDA et al., 2004) e que pode também estar envolvido na hipotermia regulada induzida por hipóxia (FABRIS; ANSELMO-FRANCI; BRANCO, 1999). Em ratos, a rafe caudal também é importante para termoregulação, uma vez que contem neurônios pré-simpáticos que regulam a vasoconstrição de vasos sanguíneos cutâneos da cauda (NAKAMURA et al., 2004; SMITH et al., 1998). Contudo, não se sabe se essa regulação é sexo-dependente e se os hormônios sexuais exercem algum papel nisso.

1.2 Monoaminas e núcleos respiratórios

Sabe-se que dentre as regiões sexualmente dimórficas do SNC estão o LC e a POA (BANGASSER et al., 2011; KELLY; OSTROWSKI; WILSON, 1999; SIMERLY et al., 1990)

que se destacam por participarem do controle da ventilação e da termogênese, respectivamente (BIANCARDI et al., 2008; UCHIDA et al., 2010b).

Uma redução dos neurônios noradrenérgicos do LC em aproximadamente 80% foi associada a uma diminuição da resposta ventilatória ao CO₂ de aproximadamente 64%, indicando que este núcleo exerce um profundo efeito na resposta ventilatória ao CO₂, sugerindo que os neurônios noradrenérgicos do LC estão envolvidos no processamento ou na modulação da informação quimiorreceptiva (BIANCARDI et al., 2008), o mesmo também foi observado em fêmeas (DE CARVALHO et al., 2017).

Adicionalmente, sabe-se que o LC é recebe inervações serotoninérgicas (ASTON-JONES et al., 1991; KAEHLER; SINGEWALD; PHILIPPU, 1999), uma vez que, tanto a lesão de neurônios noradrenérgicos no LC quanto a microinjeção de antagonista seletivo de receptor 5-HT_{1A} no núcleo diminuem as respostas ventilatórias a hipercapnia em ratos (BIANCARDI et al., 2008; DE SOUZA MORENO et al., 2010). Adicionalmente, SINGEWALD; SHARP, (2000) demonstraram que as aferências serotoninérgicas para o LC modulam a resposta dos quimiorreceptores periféricos à hipóxia e à hipercapnia. Desta forma, é possível observar um envolvimento do sistema serotoninérgico no controle respiratório.

Esse dimorfismo sexual do sistema serotoninérgico também pode ser visto no trabalho de (NISHIZAWA et al., 1997) que retratou que a taxa de síntese de 5-HT em mulheres é 52% mais baixa do que em homens. No entanto, o estudo de CARLSSON e CARLSSON (1988) demonstrou que em ratas a concentração do metabólito de serotonina (5-HIAA) é maior no tronco encefálico, POA, corpo estriado, prosencéfalo límbico e córtex cerebral quando comparado a ratos.

Evidências sugerem também uma diferença sexo-específica na via dopaminérgica do SNC, no entanto os dados existentes na literatura são conflitantes. (DICKINSON; CURZON, (1983, 1986) encontraram concentrações mais elevadas de dopamina em todo o encéfalo de ratas. No entanto, no estudo de CARLSSON e CARLSSON (1988), as concentrações de dopamina encontrados diferem significativamente entre os sexos, sendo mais baixa em ratas do que em ratos.

Entretanto, devido ao pequeno número de animais incluídos nesses grupos, os autores sugerem cautela na interpretação de dados. Considerando-se apenas ratos, foi demonstrado que a aplicação direta de agonista de dopamina no LC de animais anestesiados, suprime a atividade de disparo dos neurónios NOR deste núcleo (ELAM; CLARK; SVENSSON, 1986).

1.3. Microglia e ventilação

Além dos neurônios, o SNC é composto por células da neuroglia. Dentre elas, as micróglia são células neuroimunes competentes do SNC que estão em contato com astrócitos e neurônios. Em mamíferos adultos sob condições basais, as micróglia exploram seus ambientes imediatos projetando suas ramificações às células vizinhas. (NAKAGAWA; CHIBA, 2015). Durante as situações fisiológicas, as células têm o fenótipo denominado de micróglia “em repouso”, caracterizado por um pequeno corpo celular ramificado e, apesar do nome, são dinâmicos capazes de prolongar ou reduzir suas ramificações afim de monitorar mudanças em seu ambiente. As células da microglia estão em contato com os neurônios, como contato direto pelo cluster de designação (CD) 200 (no neurônio) e CD 200R (na micróglia) e astrócitos (CARROLL; KIM, 2013; HABIB; BEYER, 2015).

Mudanças na homeostase como por infecções, traumas ou doenças, podem causar alterações na morfologia da micróglia “em repouso” para forma “reativa”, com um corpo celular maior e pequenos ramos, que podem facilitar a ação, proliferação ou migração da microglia (HABIB; BEYER, 2015; LAWSON et al., 1990; MASGRAU et al., 2017) como pode ser observado na figura 1.

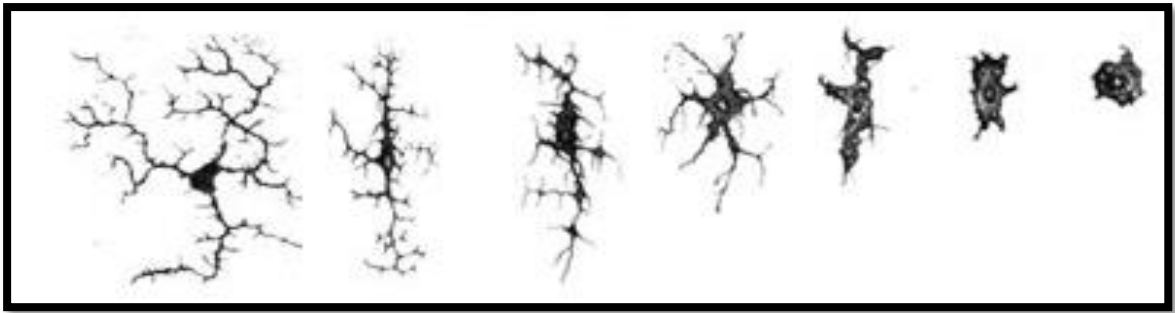


Figura 1. Células de micróglia com o fenótipo ramificado (esquerda) para o fenótipo amebóide (direita). Figura adaptada de Kim e de Vellis, (2005).

Em comparação com outras funções neurológicas, o nosso entendimento do papel da microglia na homeostase respiratória está na sua infância; no entanto, há evidências crescentes para indicar que a microglia influencia o sistema respiratório. Nesse contexto, LOREA-HERNÁNDEZ et al. (2016) mostraram que em ratos jovens (7-8 dias pós-natal), a injeção intracisternal de LPS promoveu reatividade microglial e reduziu a frequência e amplitude respiratória. Isso, por sua vez, causou uma diminuição de 74% na ventilação, sugerindo que a microglia pode modular a geração de ritmo respiratório. Mais recentemente, SILVA et al. (2018) reportaram que as microglias são importantes para a manutenção dos ajustes autonômicos durante a hipóxia e durante a ativação reflexa cardiorrespiratória desencadeada pelos quimiorreceptores periféricos. Os autores mostraram que a hipóxia aguda aumenta os níveis de mRNA de citocinas pró-inflamatórias no bulbo ventrolateral rostral e no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), que são importantes reguladores das respostas cardiorrespiratórias. Além disso, a microglia do órgão subfornicial é altamente responsiva às flutuações de CO_2/H^+ .

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

- 1) Avaliar a ação do principal hormônio sexual masculino, a testosterona (T), nas respostas respiratórias e termorreguladoras à hipercapnia e hipóxia em ratos *Wistar* intactos, orquidectomizados e tratados com suplementação hormonal;
- 2) Comparar as respostas respiratórias e termorreguladoras durante a normóxia e hipóxia em ratas *Wistar*, intactas em cada fase de seu ciclo estral, ovariectomizadas e tratadas com os principais hormônios ovarianos (estradiol e/ou progesterona), uma vez que dados do nosso laboratório, já demonstraram essa ação em hipercapnia (MARQUES et al., 2015);
- 3) Verificar a influência dos hormônios sexuais na concentração de monoaminas e seus metabólitos em resposta à hipercapnia e hipóxia através da técnica de HPLC-ED no LC, núcleos da Rafe e MPA, em ratos e ratas *Wistar* intactos e castrados;
- 4) Avaliar as características morfológicas da micróglia de ratas intactas e castradas, em condições de normocapnia e hipercapnia, em regiões do SNC envolvidas com o controle da ventilação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos e protocolos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV-UNESP, protocolo nº 8.129/16. Os experimentos de micróglia foram realizados no período sanduíche, no Canadá, e foram aprovados pela Laval University Animal Care Committee (nº 2012-023).

CAPÍTULO 1- Avaliamos a V_E , V_T , fR , $\dot{V}O_2$ e T_c de ratos intactos, orquidectomizados (ORX) e orquidectomizados tratados com testosterona (ORX+T) submetidos à hipercapnia e hipóxia. Adicionalmente, avaliamos a presença de AR no CB por imunistoquímica.

CAPÍTULO 2- Avaliamos a resposta ventilatória, metabólica e termorreguladora à hipóxia em ratas intactas, ovariectomizadas (OVX) e ovariectomizadas tratadas com estradiol e progesterona (OVX+E₂P).

CAPÍTULO 3 – Quantificamos as monoaminas e seus metabólitos em diferentes regiões do SNC, através do método de HPLC-ED em ratos e ratas Wistar intactos e castrados.

CAPÍTULO 4 – Avaliamos as características morfológicas das células de micróglia no cNTS, Rafe, PVN e LC de ratas intactas e OVX expostas durante normocapnia e hipercapnia.

4. PRINCIPAIS RESULTADOS ENCONTRADOS

CAPÍTULO 1- Demonstramos que a orquidectomia diminui a ventilação durante a normóxia em ratos e a reposição com T foi capaz de restaurá-la. Além disso, a suplementação com T promoveu um aumento na quimiossensibilidade ventilatória durante hipóxia e hipercapnia, sem alteração do metabolismo ou da temperatura corporal, sugerindo que os andrógenos estimulam a resposta respiratória a baixos níveis de O₂ e ao desafio com CO₂. Um possível local de ação da T é o CB, já que detectamos a presença de receptores AR nessa estrutura. Entretanto, a T também poderia estar atuando no sistema nervoso central, uma vez que o AR está presente em regiões que incluem núcleos que participam do controle da respiração.

CAPÍTULO 2- Demonstramos que em fêmeas, a resposta ventilatória à hipóxia não se alterou durante as diferentes fases do ciclo estral em ratas intactas. Mas, os animais OVX mostraram uma menor resposta ventilatória à hipóxia em comparação com fêmeas intactas em estro, sugerindo que os hormônios ovarianos exercem uma modulação excitatória na resposta respiratória aos baixos níveis de O₂. Em nosso modelo experimental, a substituição com E₂ ou uma combinação de E₂ e P não mimetizaram as respostas de uma rata intacta, sugerindo que outros fatores ovarianos possam estar envolvidos. Além disso, no dia do estro, os animais exibiram uma temperatura corporal aumentada,

mas nenhuma diferença foi observada durante a exposição à hipóxia em comparação com outras fases do ciclo estral e dos animais OVX.

CAPÍTULO 3 - Demonstramos que hormônios sexuais exercem influência quanto a quantificação de monoaminas (e seus metabólitos) em resposta à hipercapnia e hipóxia no LC, núcleos da Rafe e MPA, em ratos e ratas Wistar intactos e castrados. Adicionalmente, a resposta é sexo-dependente em alguns núcleos.

CAPÍTULO 4 – Demonstramos que a ovariectomia promoveu uma mudança reativa na morfologia da micróglia do cNTS e LC, como indicado por um índice morfológico maior. Nestas estruturas, a hipercapnia teve um efeito oposto relativamente modesto. Tais alterações não foram observadas na rafe caudal ou no PVN. Conclui-se que os hormônios ovarianos podem prevenir a reatividade microglial em estruturas que participam da detecção de CO_2/H^+ . Esses dados sugerem que a micróglia pode contribuir para doenças respiratórias, especialmente aquelas que são influenciadas pelas flutuações cíclicas dos hormônios ovarianos ou da menopausa.

5. DISCUSSÃO GERAL

Demonstramos que ratos ORX apresentaram redução de \dot{V}_E , e $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ comparados aos animais controle (intactos) quando expostos a condições de normocapnia (21% O_2 e 0% CO_2), entretanto a reposição de T foi capaz de restaurar os níveis basais das variáveis. Além disso, a reposição com T aumentou a resposta ventilatória à hipóxia e hipercapnia, sem alterar a taxa metabólica e a temperatura corporal, sugerindo que esse hormônio pode atuar diretamente no quimiorreflexo periférico e/ou central. De fato, demonstramos a presença de AR no CB, indicando um possível local para a ação da T. O estudo de Tatsumi e colaboradores (1994) em gatos machos adultos castrados demonstrou que a administração de T promoveu aumento de 47% na resposta ventilatória hipercápnic e hipóxica (TATSUMI et al., 1994), assim, nossos dados corroboram com a literatura. Um fator diferencial em nosso estudo foi a comparação dos animais ORX com reposição

de T (modelo encontrado na literatura) com indivíduos gônada-intactos. As diferenças encontradas entre eles demonstraram que o nosso grupo de estudo ORX+T, mesmo utilizando uma dose fisiológica para suplementação hormonal (KALIL et al., 2013), não mimetizou as respostas observadas no grupo intacto, o que trouxe um dado novo sobre o papel da suplementação de T na quimiossensibilidade.

Já em fêmeas de ratos Wistar, nós demonstramos que apesar das flutuações hormonais que ocorrem nas diferentes fases do ciclo estral, não houve alterações na \dot{V}_E , e $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ em normóxia e hipóxia e que tanto a castração quanto reposição hormonal em fêmeas não alteraram os parâmetros ventilatórios durante normóxia. Os animais que tiveram reposição hormonal com E_2 ou E_2P não apresentaram diferença significativa na ventilação durante a hipóxia em comparação a fêmeas intactas no estro. Estudos anteriores do nosso grupo (MARQUES et al., 2015) não mostraram diferenças em respostas ventilatórias e metabólicas em normocapnia e hipercapnia entre animais em diferentes fases do ciclo estral. Diversos estudos investigaram os efeitos dos hormônios sexuais nas respostas ventilatórias à hipóxia, no entanto, apenas poucos estudos foram realizados em fêmeas. Tatsumi e colaboradores (TATSUMI et al., 1997) demonstraram que gatas OVX diminuíram as respostas ventilatórias do corpo carotídeo à frente a hipóxia. Além disso, Boukari et al. (2016b) demonstraram que a injeção intracerebroventricular de siRNA contra receptores de membrana de progesterona do tipo Beta, suprimiu as respostas ventilatórias à hipóxia em camundongos machos e fêmeas. Assim, demonstramos que em nosso modelo, os hormônios gonadais em fêmeas são importantes na resposta ventilatória a hipóxia, mas a reposição hormonal com E_2 ou E_2P pelo período realizado, não foi capaz de mimetizar a resposta de um animal gônada-intacto.

Demonstramos assim que os hormônios gonadais podem atuar nas respostas ventilatórias de machos e fêmeas de ratos Wistar.

Nós também demonstramos dimorfismo sexual nas concentrações de monoaminas em regiões do cérebro ligadas as respostas ventilatórias frente a hipercapnia e hipóxia. como LC, Rafe e MPA, o

que também pode estar relacionado com o dimorfismo sexual observado na ocorrência de diversas doenças respiratórias como SIDS, síndrome do pânico, distúrbios respiratórios, dentre outros (DALMAZ et al., 1991; GORMAN et al., 1994a; KINNEY et al., 2009; PORZIONATO; MACCHI; DE CARO, 2018).

Finalmente demonstramos que a OVX e a hipercapnia não afetaram a densidade de microglia no cNTS, rafe caudal, PVN ou LC de ratas adultas. No entanto, observamos que o OVX aumentou o índice morfológico do cNTS e LC. Este efeito específico da região está de acordo com a noção de que o tamanho e a densidade da microglia são heterogêneos dentro do encéfalo (LAWSON et al., 1990) e com a ativação região-específica por exposição hipercápica (BERQUIN et al., 2000). Entretanto, as respostas microgliais são complexas e, sem uma quantificação adequada, não é possível saber quais substâncias são liberadas quando confrontadas com um dado estímulo. Enquanto seu ambiente imediato é um determinante importante (FRANCO; FERNÁNDEZ-SUÁREZ, 2015; HABIB; BEYER, 2015; NAKAGAWA; CHIBA, 2015), a resposta a um dado estímulo pode mudar dependendo da idade ou da influência dos hormônios sexuais (CRAIN; NIKODEMOVA; WATTERS, 2009, 2013; LUO; CHEN, 2012; NISSEN, 2017; SOHRABJI; WILLIAMS, 2013) e a natureza das interações entre neurônios e microglia em diferentes áreas do encéfalo (CRAIN; NIKODEMOVA; WATTERS, 2009, 2013; HABIB; BEYER, 2015; KIM; SON; MOOK-JUNG, 2013; LUO; CHEN, 2012; NISSEN, 2017; SOHRABJI; WILLIAMS, 2013).

CAPÍTULO 1

Role of testosterone in the ventilatory, metabolic and thermal responses to hypercapnia and hypoxia in male rats

ABSTRACT

It is well known that many diseases of the respiratory system occur differently in males and females indicating a possible role of gonadal hormones in the respiratory control. In females, progesterone causes hyperventilation acting on central and peripheral receptors, however, the effects of testosterone (T) on ventilation are poorly studied even in the face of greater number of respiratory diseases in males. We hypothesized that T is important for the ventilatory chemosensitivity responses in males. To test this hypothesis, we used *Wistar* rats divided in three groups: i) control group gonad-intact (intact) ii) orchidectomized group (ORX) and iii) ORX group with T replacement (ORX+T) and evaluated ventilatory, metabolic, and thermal responses under normoxic normocapnia (0%CO₂, 21%O₂), and acute hypercapnia (7%CO₂) and hypoxia (7%O₂) conditions. At the end of the experiments, the seminal vesicle was removed and the mass was evaluated to confirm the efficiency of the surgery and T replacement. We also performed carotid body (CB) immunohistochemistry to evaluate the presence of androgen receptor (AR) in the structure of intact male animals. Our results showed that orchidemy promotes a reduction in ventilation (\dot{V}_E) and in the ventilatory equivalent ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$) under room air conditions and T treatment restores it. On the other hand, during hypoxia or hypercapnia animals that received T replacement had a higher ventilation (\dot{V}_E) and $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ than the animals of the other two groups, without changes in metabolic and thermal variables. We also demonstrated the presence AR in the CB of intact animals. Our findings demonstrated that orchidectomy decrease ventilation during room air conditions and T is able to restore it. In addition, T replacement promotes an increase in the ventilatory chemosensitivity under hypoxia and hypercapnia without changing metabolism or body temperature. A putative site of T action is the CB, since we detected the presence of AR receptors in this structure.

Key words: Gonadal hormone, androgens, respiratory system, chemosensitivity

1. INTRODUCTION

Many breathing disorders such as sleep apnea and sudden infant death syndrome (SIDS) have higher occurrence in males than females, which may indicate sex differences in the respiratory control (BEHAN; WENNINGER, 2008; CHAHROUR; ZOGHBI, 2007; KAPSIMALIS; KRYGER, 2002). A central issue that may play an important role in the differences between males and females is the presence of sex hormones, e.g., progesterone, estradiol and testosterone (T), produced by both sexes in different concentrations throughout life (BEHAN et al., 2011). Many studies have pointed out testosterone as a potential cause of the higher prevalence of sleep disorders in men causing a destabilization in ventilatory control during sleep (LOZO et al., 2017; MATEIKA et al., 2004). This idea was reinforced by studies reporting that the apnea/hypopnea index increased in hypogonadal men after T replacement (MATSUMOTO et al., 1985; SCHNEIDER et al., 1986). Further, inhibition of T action via the 5α -reductase pathway alleviates breathing instability during sleep (CHOWDHURI et al., 2013).

Sex hormones can act on membrane and nuclear receptors, androgen or estrogen receptors, widely distributed in brain regions important for the respiratory control such as the retrotrapezoid nucleus (RTN), nucleus of the solitary tract (NTS), locus coeruleus (LC), caudal medullary raphe and other medullary and hypothalamic structures (Behan et al., 2011; Hannhart et al., 1990; Loiseau et al., 2014; Pascual et al., 2002; Szawka et al., 2009; for a review see Nattie and Li, 2012). Estradiol and progesterone receptors were also described in the CB, a main peripheral site involved in the control of ventilation (JOSEPH et al., 2006). Although it is well known the presence of androgen receptors (AR) in brain chemosensitive sites (SIMERLY et al., 1990) there is no data in the literature regarding the presence of androgen receptors (AR)

in peripheral sites, such as the CB. A study by Tatsumi et al. (1994) suggested a direct action of T in the CB, because T replacement increased the carotid sinus nerve response to hypoxia, and this greater chemosensitivity was eliminated by the transection of the carotid sinus nerve. However, there are no reports so far of the presence of androgen receptor (AR) in the cells of CB. Data in the literature regarding the effect of T on breathing control is still controversial probably due to differences in experimental designs. For instance, some authors have showed that ventilation rises after T replacement in both humans (FOGEL et al., 2001; WHITE et al., 1985) and animals (Tatsumi et al., 1994), whereas others found no change (KOEPCHEM, 1953; TENORIO-LOPES et al., 2017b) or even inhibition (BAYLISS et al., 1987). In fact, it has been suggested that the impact of T on breathing regulation in animals and humans requires the conversion of T to estradiol by aromatase. Thus, the role of T in breathing function may ultimately be mediated by estradiol, whose availability is controlled by aromatase (SIMPSON et al., 2002; ZABKA; MITCHELL; BEHAN, 2006). Likewise, there is no agreement regarding the role of T in ventilatory response to hypercapnia and hypoxia (BOUKARI et al., 2016a; FOURNIER et al., 2014; JOSEPH et al., 2002; MATSUMOTO et al., 1985; TATSUMI et al., 1994; TENORIO-LOPES et al., 2017b; WHITE et al., 1985).

Besides breathing control, it is known that T can also regulate metabolic rate and body temperature. For instance, replacement of T in 12 hypogonadal men during 30 days causes an increase in $\dot{V}O_2$ (WHITE et al., 1985). Additionally, it was demonstrated that the pre-optical region of the hypothalamus (POA), an important region for body temperature regulation, have a large distribution of AR (SIMERLY et al., 1990), and T indeed affect the activity of temperature sensitive and insensitive neurons in slices of POA (SILVA; BOULANT, 1986) . Thus, it is reasonable to consider a certain degree of interaction between metabolic, thermoregulatory and reproductive functions.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 *Animals*

Experiments were performed on unanesthetized adult male *Wistar* rats obtained from UNESP (Botucatu, Brazil; body mass 250–310 g). The animals had free access to water and food and were housed in a controlled temperature room ($25\pm 1^\circ\text{C}$) with a 12:12h light–dark cycle (lights on at 6:00 AM). The experimental protocols were run between 9AM and 1PM and were in agreement with the guidelines of the National Council of Control in Animal Experimentation (CONCEA, Brazil) and approved by the local Animal Care and Use Committee (CEUA # 8.129/16).

2.1.1 *Surgery*

Animals were anesthetized with ketamine-xylazine (100 and 10 mg kg^{-1} , intraperitoneal, respectively) and the body area designated for the procedure was shaved and cleaned with Chlorhexidine Digluconate 2% (Rioquimica, SP, Brazil). The animals were prophylactically treated with antibiotic (enrofloxacin 5%, subcutaneous; 0.5 mg kg^{-1} , Schering-Plough) and, immediately after surgery, with analgesic anti-inflammatory (flunixin meglumine, intramuscular; 2.5 mg kg^{-1} , Schering-Plough). Ten days before experiments, animals were submitted to the following surgical procedures:

2.1.2 *Implantation of temperature-measuring device*

All the three groups of animals were implanted with a miniature temperature datalogger (SubCue Dataloggers, Canada) into the peritoneal cavity via midline laparotomy to record body

temperature (T_b). After implantation of the device, the abdominal muscles and skin were sutured in layers.

2.1.3 *Orchidectomy and hormone treatment*

Two groups of rats (ORX and ORX+T) were submitted to bilateral orchidectomy by incision in the scrotum, the spermatic cords were ligated and the skin was sutured. Three days after the surgeries, animals were treated daily at 10:00 a.m. for seven consecutive days prior to the experiment with (1) vehicle (corn oil, ORX group; 0.2 mL/rat, s.c., Liza; Cargill, Sao Paulo, Brazil) or (2) T propionate (ORX+T group; 0.25 mg/0.2 mL/rat, s.c.; dose: 830 μ g kg⁻¹). This dose of T has been reported to yield high physiological plasma hormonal levels (KALIL et al., 2013). After experiments, animals were euthanized with tribromoethanol (0.3 ml/ 100 g, i.p.), the seminal vesicle was removed and its wet mass was measured. The mass of seminal vesicle was used to confirm the effectiveness of hormonal treatment, as T causes trophic effects on the seminal vesicle (de Carvalho et al., 2015).

2.1.4 *Ventilatory, T_b , and Metabolic Measurements*

The \dot{V}_E measurements were obtained using the barometric method (whole body plethysmography), as previously described by Bartlett and Tenney (1970) and performed in our laboratory (BIANCARDI et al., 2008; MARQUES et al., 2015). During \dot{V}_E measurements, the flow was interrupted, the chamber was sealed for short periods of time (~2 min) and the pressure oscillations caused by breathing were monitored using a differential pressure transducer (TSD 160A, Biopac Systems, Santa Barbara, USA). The signals were fed into a differential pressure signal conditioner (DA 100C, Biopac Systems, USA), passed through an analog-to-digital converter, and digitized on a microcomputer equipped with data acquisition

software (AcqKnowledge MP 100, BioPac Systems, Inc., Santa Barbara, CA, USA). The volume was calibrated during each experiment by injecting 1 mL of air into the animal chamber. The tidal volume (V_T) was calculated using the formula from Drorbaugh and Fenn (1955):

$$V_T = (PT/PK) \times VK \times (PB - PC) / (Tb \times (PB - PC) - Ta \times (PB/PR))$$

Where PT is the pressure deflection associated with each V_T , PK is the pressure deflection associated with the injection of the calibration volume (VK); Tb is the body temperature of the animal, PB is the barometric pressure, PC is the water vapor pressure in the animal chamber; Ta is the air temperature in the animal chamber; PR is the water vapor pressure at Tb. The PC was calculated indirectly using an appropriate table (DEJOURS, 1981), assuming that chamber was fully saturated. \dot{V}_E was calculated as the product of the fR and the V_T . V_T and consequently \dot{V}_E were corrected by body mass. Tb and Ta in were monitored using a thermoprobe (model 8502- 10, Cole Parmer, Chicago, IL). The flow inside the chamber was measured by a flowmeter (822-13-OV1-PV2-V4, Sierra Instruments, Monterey, CA) and kept at 0.8- 1 L min⁻¹.

Tb was recorded each 5 min by the use of a temperature datalogger as described under “*Surgery*” section. The metabolic rate was measured by indirect calorimetry ($\dot{V}O_2$) using a closed respirometry system, as described previously (ALMEIDA et al., 2004; MARQUES et al., 2015). At the end of the normocapnic and normoxic or hypercapnic/hypoxic intervals, the airflow in the chamber was interrupted for 5 min, and the air was continuously sampled by an O₂ analyzer (PowerLab System. ADInstruments, Sydney, Australia). The percentage of oxygen’s decline inside the chamber was plotted against time, and the slope of the resulting curve was corrected by chamber volume and body mass of animals in order to estimate the $\dot{V}O_2$.

The values are presented in milliliters of oxygen per min per kilogram in STPD (standard conditions of temperature, pressure, and dry air). Before the experiments, O₂ analyzer was calibrated with two known gas mixtures. Over the 5 min the chamber is sealed, the reduction of O₂ fraction inside it was about 0.5-1% which is not considered significant to the animal (ALMEIDA et al., 2004; MARQUES et al., 2015).

2.2 *Experimental Protocol*

Each animal was individually placed in a plethysmograph chamber (5 L), kept at 25 °C and allowed to move freely, while the chamber was flushed with humidified room air. The basal measurements (time zero) of \dot{V}_E and $\dot{V}O_2$ were taken after animals had acclimatized for approximately 1 h. Subsequently, a hypercapnic gas mixture (7% CO₂ and N₂ balance. White Martins, Sertaozinho, Sao Paulo, Brazil) or hypoxic mixture (7% O₂ and N₂ balance. White Martins) was flushed through the chamber for 30 min, and \dot{V}_E and $\dot{V}O_2$ were measured at 30 min (time 30). Then, the chamber was flushed with room air for 90 mins so the ventilatory parameters could return to basal values. After that, a hypoxic or hypercapnic mixture gas was pushed into the chamber for 30 min and once again \dot{V}_E and $\dot{V}O_2$ were measured at 30 min (time 30). The order of gas exposure (hypercapnia and hypoxia) was randomly chosen and the percentage of CO₂ and O₂ and the exposure time were chosen based on pilot experiments and previous studies (BIANCARDI et al., 2008; DA SILVEIRA SCARPELLINI et al., 2009). The experiments were carried out from 9a.m. to 1p.m. T_b was continuously measured during the experiment.

2.2.1 CB Removal and Immunohistochemistry

Adult males were anesthetized with ketamine-xylazine (100 and 10 mg kg⁻¹, intraperitoneal, respectively), an incision in the ventral surface of the neck was made and, using forceps, the carotid bifurcations were removed “*en bloc*”. The dissected tissue was 24 h post-fixed in 4% PFA and maintained in 30% sucrose solution at 4°C, as described (JOSEPH et al., 2006). The tissue was fixed in tissue Tek OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA), cut in 40-µm sections using a cryostat (CM1860 – Ag Protect; Leica, Wetzlar, Germany), and mounted on glass slides for subsequent immunofluorescence analysis.

2.2.2 Immunofluorescence

Glass slides containing CB sections were treated for 30 min in a target retrieval solution (Dako, Glostrup, Denmark) at 70°C for an antigenic recovery process. The slides stayed at room temperature for 20 mins. Subsequently, the sections were washed using phosphate-buffered saline (PBS), five times for five mins each, and then incubated for 1 h in a 0.4% triton X-100 (TX-100) and 10% rabbit serum PBS solution to prevent non-specific labeling, followed by 24 h of incubation with a mix of mouse monoclonal anti-TH antibody (dilution 1:400; T1299 Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) and rabbit anti-AR antibody (1:200; ab133273Abcam, city, state, USA) diluted in a solution PBS 0.4% TX-100, 3% rabbit serum. In the next day the slides were washed five times for five mins each, using PBS and then incubated for 4 h at room temperature with a cocktail containing the AlexaFluor 594-coupled anti-mouse goat IgG and the AlexaFluor 488-coupled anti-rabbit goat IgG (dilution 1:1000; #A11032 and # A11015 Life Technologies, Paisley, UK) in PBS 0.4% TX-100, 3% rabbit serum, then washed five times of 5 mins in PBS and using ProLong™ Gold (Molecular Probes) covered to be examined by confocal microscopy. In our study, we also performed a positive and negative control (without

a primary antibody) to test the specificity of or immunohistochemistry protocol (TORLAKOVIC et al., 2014). In addition, we also performed at the same time the immunohistochemistry in a tissue of the testis of the rats, a well known tissue that have TH and AR positive labeling (MAYERHOFER et al., 1996; VORNBERGER et al., 1994).

2.3 Statistical Analysis

Data are presented as means \pm SEM. Seminal vesicle mass, \dot{V}_E , f_R , V_T , T_b , $\dot{V}O_2$ and $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ data through normoxia were analyzed using one-way ANOVA. The effect of castration and gas exposure (hypoxia or hypercapnia) were analyzed using two-way ANOVA for repeated measurements. Whenever ANOVA resulted in significant main effects or interaction, a Bonferroni *post hoc* test was performed to verify where the differences existed. Differences were considered to be significant when $p < 0.05$. Symbols (*, † and #) were used only when the post-test detected difference between treatments, the p value when the pairs were analyzed were demonstrated in the graphs. Data were analyzed using GraphPad Prism software (version 6.0 for Windows).

3 RESULTS

All data of ventilatory, metabolic and thermal variables during normoxia normocapnic, hypoxia and hypercapnia gas exposure conditions among groups, are described on Table 1. Two-way Anova values of the effects of castration and gas exposure (hypoxia or hypercapnia) in all parameters of intact, ORX and ORX+T groups are described on Table 2. One differential in this study was the use of a physiological dose of testosterone (a dose in which after replacement the resulting plasma concentration of T was similar as the levels in intact rats) (KALIL et al., 2013), and also a comparison of our castrated with an intact animals.

3.1 *Effect of orchidectomy and T replacement on seminal vesicle mass*

The orchidectomy significantly reduced the seminal vesicle mass compared to control animals (Table 1). On the other hand, T replacement on ORX animals not only reversed the effect of the testicles removal, but caused a further increase in the seminal vesicle mass (Table 1).

Table 1. Seminal vesicle weight, ventilatory, metabolic, and body temperature data for ORX, and ORX +T groups over normoxic control gas condition (21% O₂; 0% CO₂), hypercapnia (7% CO₂) and hypoxia (7% O₂) exposure.

	INTACT		ORX		ORX+T	
number of animals	11		11		6	
Seminal vesicle weight (mg/100 g)	336.63	± 19.29 [#] †	89.03	± 16.00 [†]	627.94	± 35.31
Normoxia						
\dot{V}_E , L.min ⁻¹	552.68	± 23.83	471.57	± 19.16 ^{*†}	612.15	± 25.51
\dot{V}_T , mL	6.28	± 0.37	5.55	± 0.33 [†]	7.15	± 0.47
fR, breaths min ⁻¹	90.63	± 3.43	86.09	± 2.56	87.00	± 5.48
$\dot{V}O_2$, mL.Kg ⁻¹ .min ⁻¹	17.32	± 0.51	17.79	± 0.50	19.04	± 0.52
$\dot{V}_E/\dot{V}O_2$	31.99	± 1.24	26.63	± 1.13 ^{*†}	32.34	± 1.89
Body temperature (°C)	37.12	± 0.11	37.00	± 0.15	37.22	± 0.11
Hypoxia						
\dot{V}_E , L.min ⁻¹	997.95	± 54.63	950.08	± 57.02	1341.80	± 109.55 ^{*#}
\dot{V}_T , mL	8.57	± 0.06	8.76	± 0.40	10.24	± 0.69
fR, breaths min ⁻¹	121.27	± 5.77	109.09	± 6.05	131.00	± 5.00
$\dot{V}O_2$, mL.Kg ⁻¹ .min ⁻¹	10.33	± 0.41	11.21	± 0.41	11.17	± 0.32
$\dot{V}_E/\dot{V}O_2$	96.71	± 5.83	85.12	± 4.86	119.48	± 7.44
Body temperature (°C)	35.90	± 0.17	35.92	± 0.23	36.20	± 0.35 ^{*#}
Hypercapnia						
\dot{V}_E , L.min ⁻¹	1277.19	± 46.18	1247.04	± 59.60	2002.11	± 188.72 ^{*#}
\dot{V}_T , mL	9.47	± 0.38	9.46	± 0.52	13.08	± 1.24 ^{*#}
fR, breaths min ⁻¹	136.72	± 2.88	130.19	± 2.02	153.33	± 3.78 ^{*#}
$\dot{V}O_2$, mL.Kg ⁻¹ .min ⁻¹	14.84	± 0.43	15.60	± 0.36	16.48	± 0.37
$\dot{V}_E/\dot{V}O_2$	87.17	± 2.97	78.91	± 4.01	124.37	± 8.85 ^{*#}
Body temperature (°C)	36.90	± 0.18	37.00	± 0.13	37.00	± 0.20

Values are mean ± SE. ORX = Orchidectomized group; ORX + T = Orchidectomized + testosterone propionate replacement group. * means significant difference from Intact, # means significant difference from ORX. † means significant difference from ORX+T

considering $P < 0.05$. One-way Anova statistical analyzes was used for comparing Seminal vesicle weight, ventilatory, metabolic, and body temperature data through Normoxia condition among groups. Two-way Anova statistical analyzes was used for comparing Hypoxic with normoxia variables or Hypercapnia with Normoxia variables among groups (factors: gas exposure and castration effect through gas. Two-way Anova results are represented in Table 2).

3.2 *Effect of orchidectomy and T replacement on thermal responses to hypercapnia and hypoxia*

Neither hypercapnia nor orchidectomy or T replacement affected the T_b of rats. Regarding the animals exposed to hypoxia, 7% of O_2 decreased the T_b of all animals in a similar way (Table 2).

Table 2. Two-way Anova results from ventilatory, metabolic, and body temperature data for ORX, and ORX +T groups over hypercapnia (7% CO_2) and hypoxia (7% O_2) exposure compared with normocapnia condition. The gross data is represented in Table 1.

TWO-WAY ANOVA RESULTS			
	Gas effect (Comparison with normocapnia)	Castration effect	Fatorial interaction
Hypoxia			
\dot{V}_E , L.min ⁻¹	p<0.0001 F_(1,25)=10.27	p=0.0006 F_(2,25)=202.20	p=0.02 F_(2,25)= 4.44
\dot{V}_T , mL	p<0.0001 F_(1,25)=100.40	p=0.055 F _(2,25) =3.28	n.s
fR, breaths min ⁻¹	p<0.0001 F_(1,25)=60.50	p=0.081 F _(2,25) =2.27	n.s
$\dot{V}O_2$, mL.Kg ⁻¹ .min ⁻¹	p<0.0001 F_(1,25)=615.20	p=0.094 F _(2,25) =2.62	n.s

$\dot{V}_E/\dot{V}O_2$	p<0.0001 F_(1,25)=460.9	p=0.0013 F_(2,25)=8.94	p<0.007 F_(1,25)=6.23
Body temperature (°C)	p<0.0001 F_(1,25)=100.2	p=0.610 F _(2,25) =0.504	n.s
Hypercapnia			
\dot{V}_E , L.min ⁻¹	p<0.0001 F_(1,25)=386.00	p<0.0001 F_(2,25)=20.58	p<0.0001 F_(1,25)=15.23
\dot{V}_T , mL	p<0.0001 F_(1,25)=163.6	p=0.0016 F_(2,25)=8.42	p=0.019 F_(1,25)=4.62
fR, breaths min ⁻¹	p<0.0001 F_(1,25)=740.5	p=0.03 F_(2,25)=4.07	p=0.0003 F_(1,25)=11.32
$\dot{V}O_2$, mL.Kg ⁻¹ .min ⁻¹	p<0.0001 F_(1,25)=91.03	p=0.052 F _(2,25) =3.32	n.s
$\dot{V}_E/\dot{V}O_2$	p<0.0001 F_(1,25)=392.4	p=0.002 F_(2,25)=7.82	p=0.002 F_(2,25)=7.81
Body temperature (°C)	p=0.073 F _(1,25) =3.487	p=0.854 F _(2,25) =0.0158	n.s

Values are mean \pm SE. ORX = Orchidectomized group; ORX + T = Orchidectomized + testosterone propionate replacement group. * means significant difference from Intact, # means significant difference from ORX, † means significant difference from ORX+T considering P<0.05.

3.3 Effect of orchidectomy and T replacement on ventilation

The orchidectomy reduced \dot{V}_E by 15% compared to intact and ORX+T group under room air condition, mainly by an effect on V_T . T replacement restored the baseline \dot{V}_E and V_T (Fig. 1).

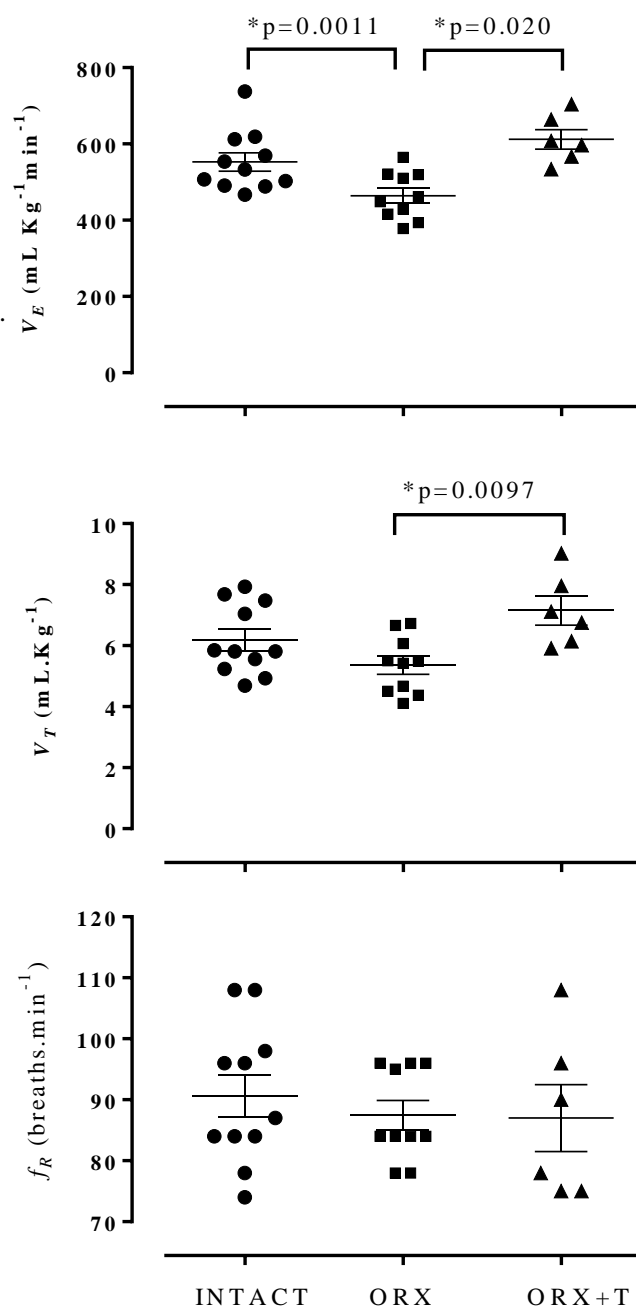


Fig. 1. Effect of orchidectomy and T replacement on \dot{V}_E , V_T and f_R of rats exposed to normocapnia (0% CO₂ and 21% O₂) *means statistic significant difference considering $p < 0.05$, using one-way Anova with Bonferroni post hoc test. The difference between pairs are represented and p value when significant. In the graph, each point represents one animal data, the gross values are described in table 1.

Hypoxia caused an increase in the ventilatory variables in all groups (Figure 2). ORX did not affect \dot{V}_E , V_T and f_R under hypoxia compared to intact animals. On the other hand, T replacement caused a further rise on \dot{V}_E compared to Intact group due to a higher f_R .

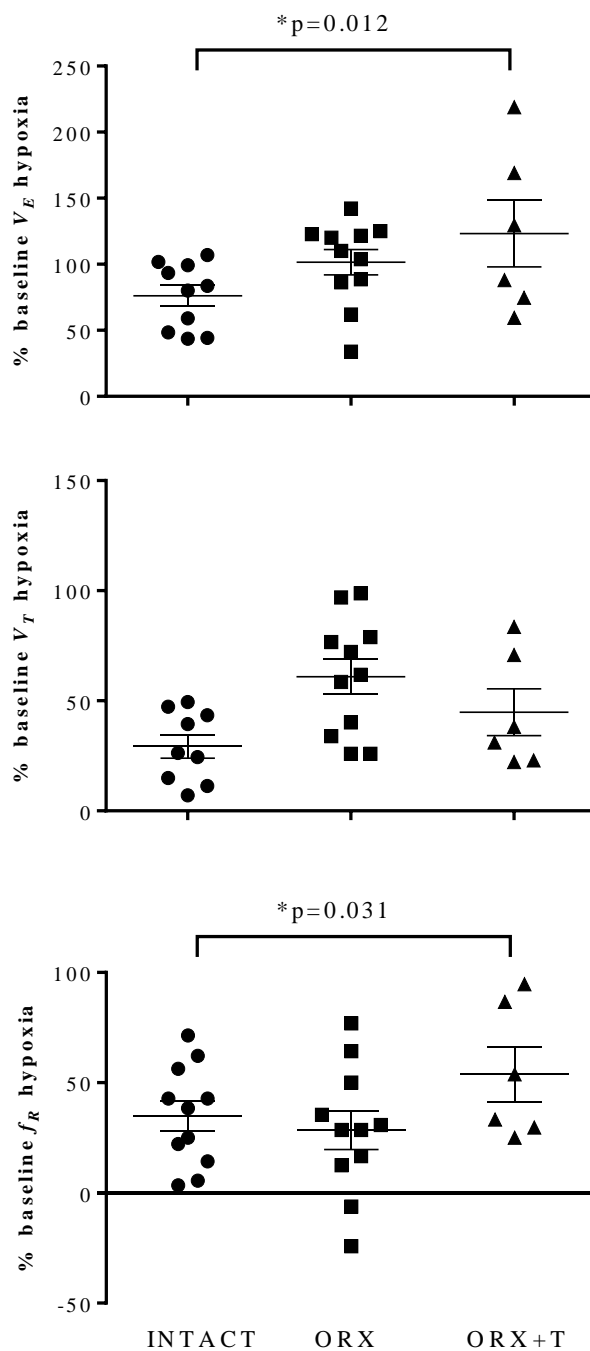


Fig. 2. Effect of orchidectomy and T replacement on \dot{V}_E , V_T and f_R of rats exposed to hypercapnia (7% CO_2 and 21% O_2). Values are presented as % from baseline. *means statistic significant difference considering $p < 0.05$, using one-way Anova with Bonferroni *post hoc* test. The difference between pairs are represented and p value when significant. In the graph, each point represents one animal data, the gross values are described in table 1.

Hypercapnia caused an increase in the ventilatory variables in all groups (Figure 3). CO₂ exposure increased similarly all respiratory variables in Intact and ORX animals. Nonetheless a further increase in \dot{V}_E and f_R was observed in ORX animals that received T replacement compared to Intact and ORX groups. In addition, a statistical difference was also observed in V_T of ORX+T animals compared to Intact group.

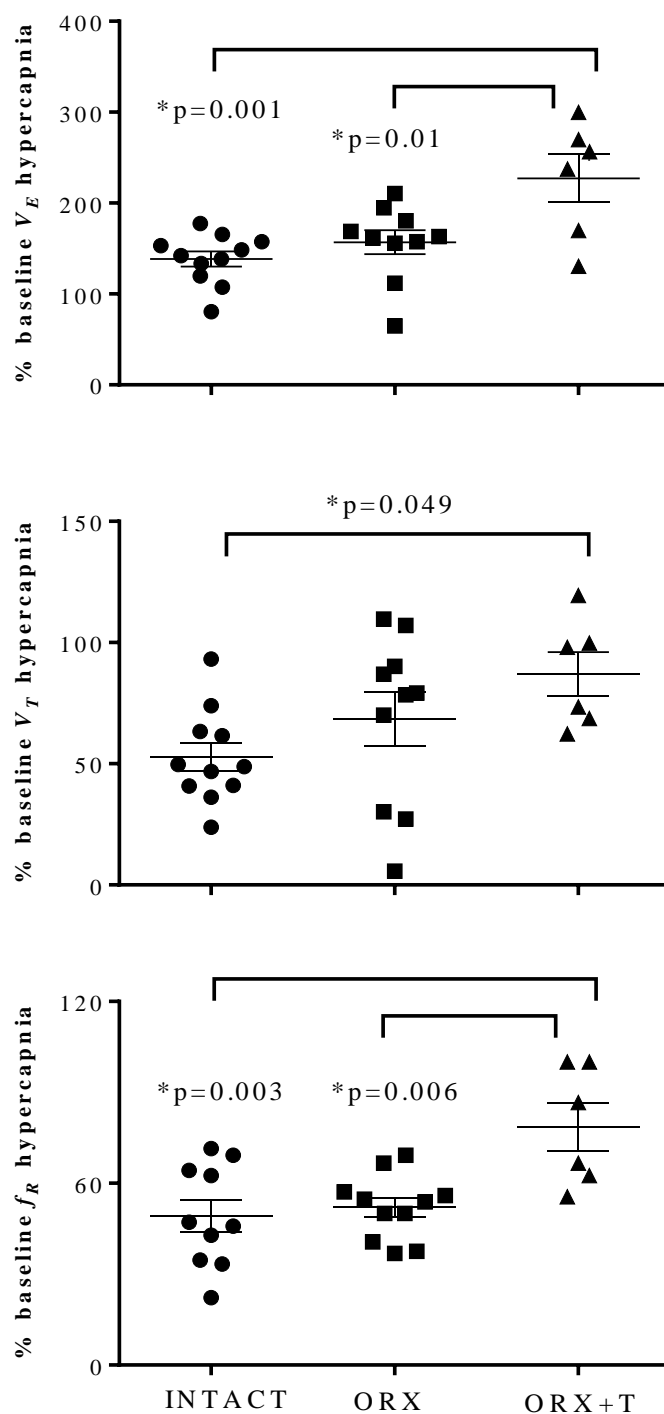


Fig. 3. Effect of orchidectomy and T replacement on \dot{V}_E , V_T and f_R of rats exposed to hypoxia (7% O₂ and 0% CO₂). Values are presented as % from baseline. *means statistic significant difference considering $p < 0.05$, using one-way Anova with Bonferroni *post hoc* test. The difference between pairs are represented and p value when significant. In the graph, each point represents one animal data, the gross values are described in table 1.

3.4 *Effect of orchidectomy and T replacement on metabolic variables*

$\dot{V}O_2$ during room air conditions was not affected by orchidectomy and T replacement (Figure 4). Hypoxia and hypercapnia caused a reduction in $\dot{V}O_2$ with no difference among treatments (Figure 4).

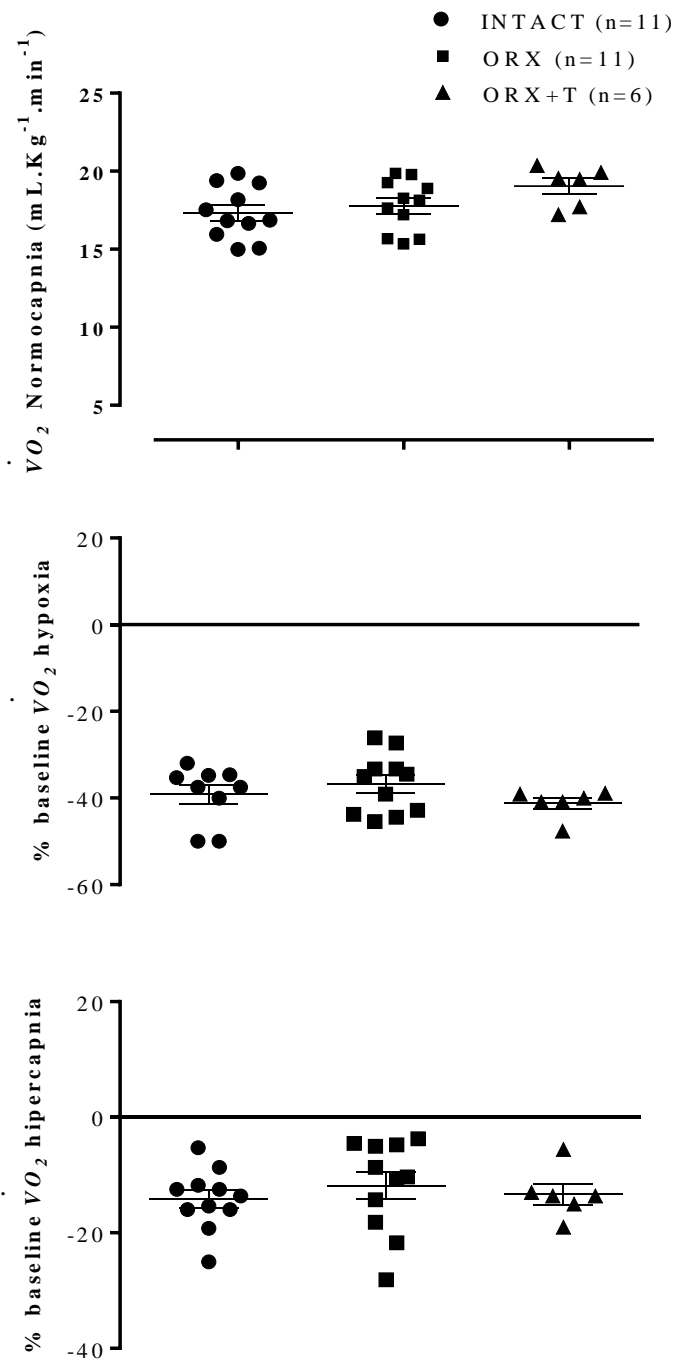


Fig. 4. Effect of orchidectomy and T replacement on metabolic rate of rats exposed to normocapnia (0% CO₂ and 21% O₂, top), hypoxia (7% O₂ and 0% CO₂-middle) and hypercapnia (7% CO₂ and 21% O₂). Values are presented as % from baseline. There was no statistic significant difference among groups considering $p < 0.05$, using one-way Anova with Bonferroni *post hoc* test. In the graph, each point represents one animal data, the gross values are described in table 1.

The orchidectomy decreased the ratio $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ under normoxia by 16% and T replacement restored it to the baseline values (Figure 5, top). Under hypoxia and hypercapnia, the ratio $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ was increased in all groups with a further rise observed in ORX+T rats (Figure 5, middle and bottom).

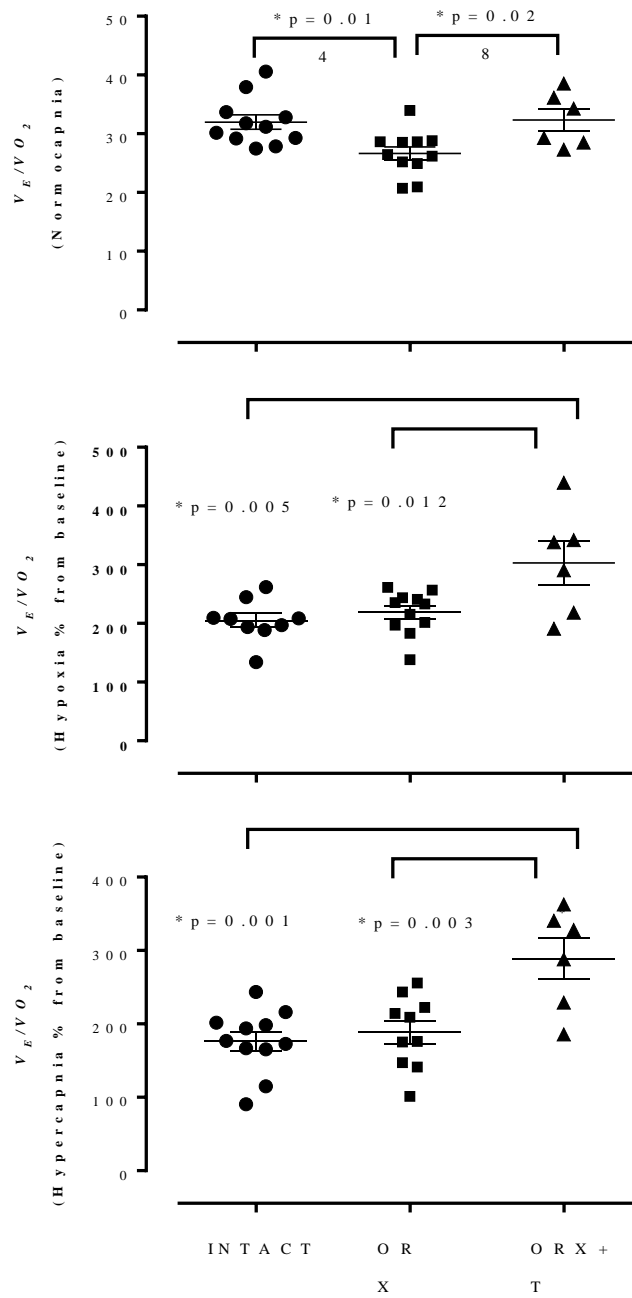
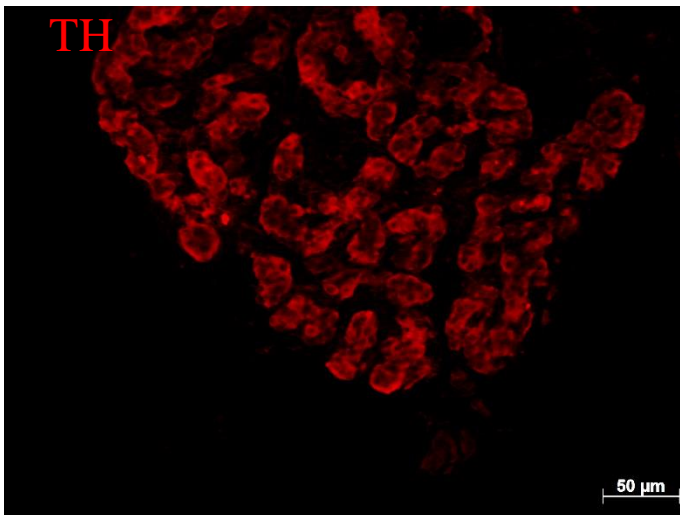


Fig. 5. Effect of orchidectomy and T replacement on respiratory equivalent ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$, bottom) of rats exposed to normocapnia (0% CO_2 and 21% O_2 , top), hypoxia (7% O_2 and 0% CO_2 , middle) and hypercapnia (7% CO_2 and 21% O_2). Values are presented as % from baseline. *means statistic significant difference considering $p < 0.05$, using one-way Anova Bonferroni *post hoc* test. The difference between pairs are represented and p value when significant. In the graph, each point represents one animal data, the gross values are described in table 1.

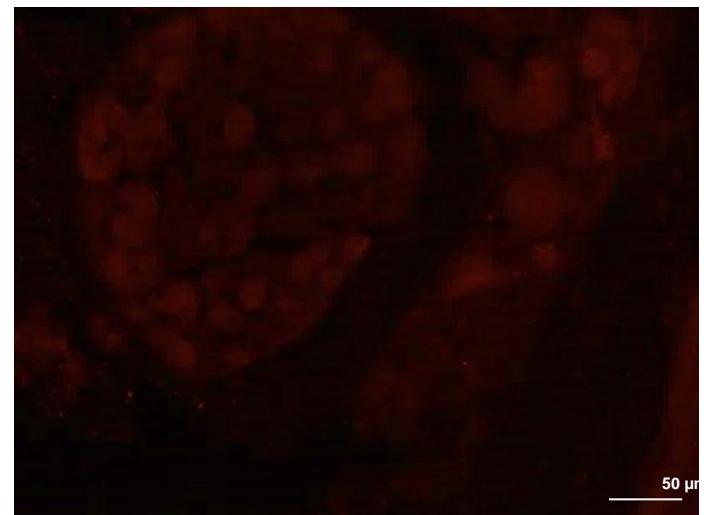
3.5 CB Immunohistochemistry

Immunohistochemistry revealed that the CB (labeled in red for TH) is richly endowed with AR receptors (labelled in green) (Figure 6). In the figure 6 is possible to observe our positive and negative (without a primary antibody) tissue labeling that showed the specificity of our immunohistochemistry (TORLAKOVIC et al., 2014) for AR. At the same time, we performed the same double labeling in a tissue from the rat testis, in which there was a strong labeling of AR further supporting our finding in the CB. This result is presented as figure 7.

(A) Positive labelings



Negative control labelings



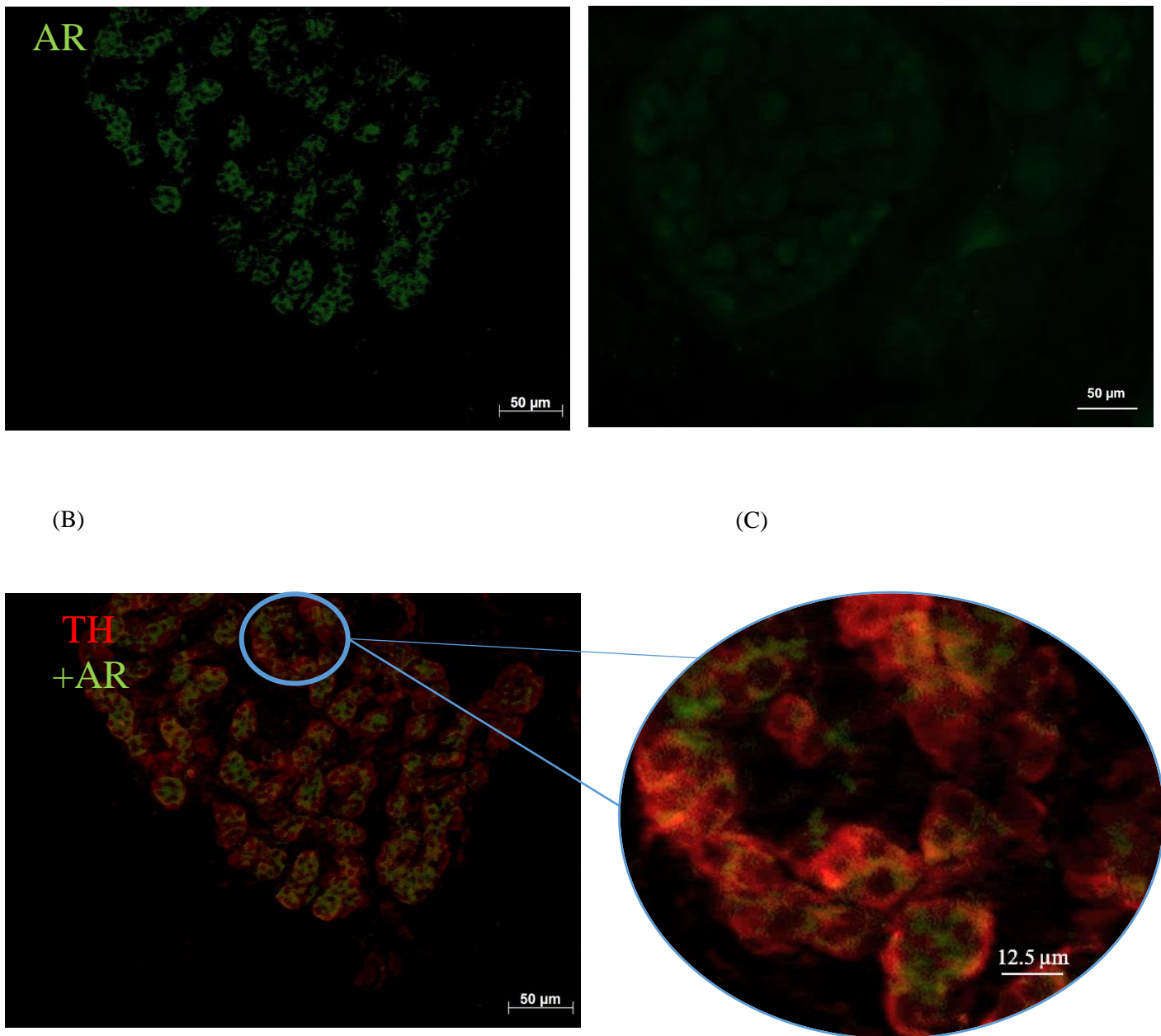


Fig. 6. Immunofluorescence for Tyrosine Hydroxylase (TH -red) and androgen receptor (AR-green) in the carotid body of adult male rat. Pictures are presented as (A) positive staining in left side and negative (without first antibody) in right, (B) merged image of positive staining. (C) detail of overlap TH+AR photobiographies.

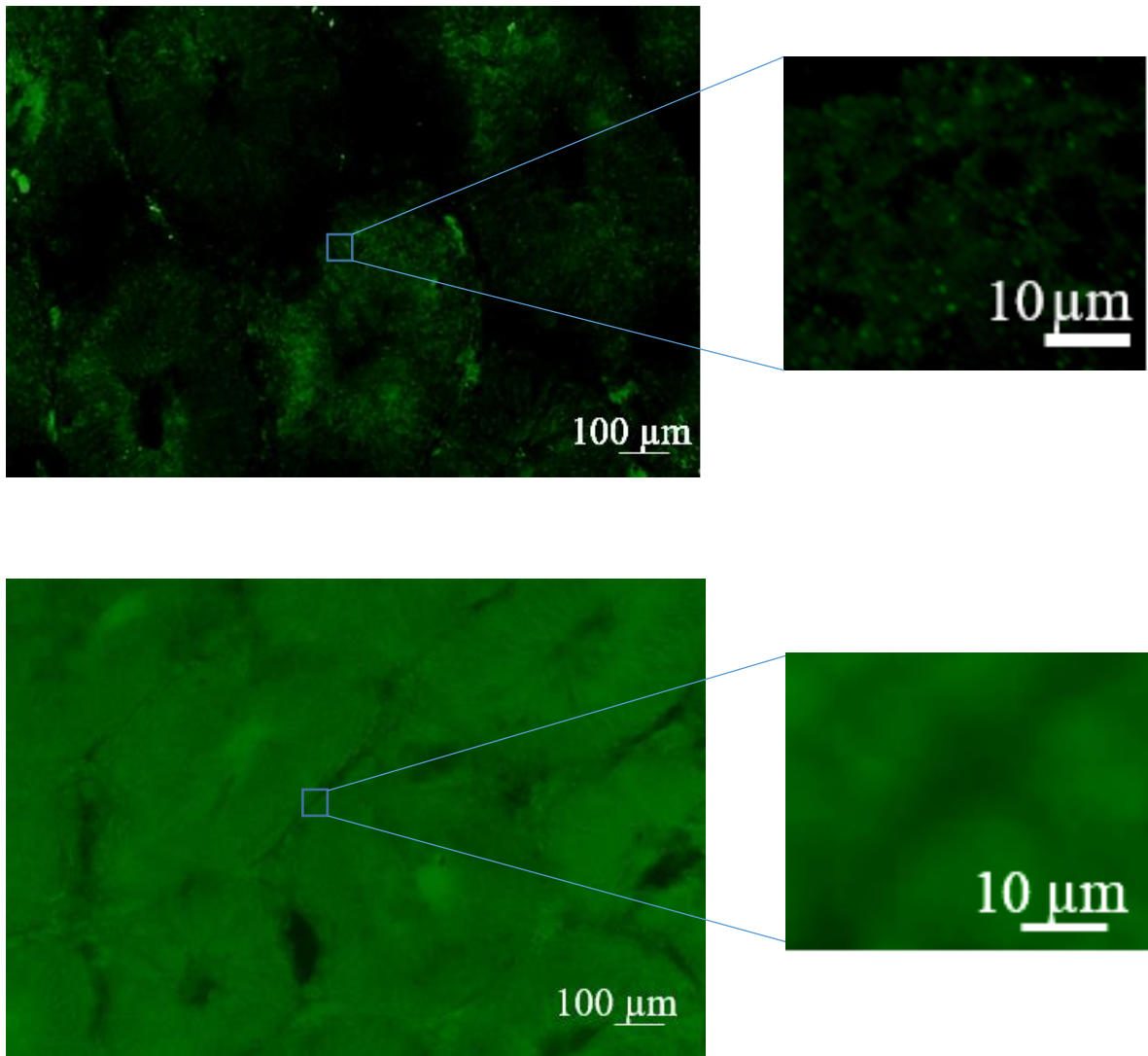


Fig. 7. Immunohistology of rat testis. (A) AR positive labeling in green. (B) detail of AR labeling. (C) AR negative photobiography (without the first antibody) with green background (D) detail of AR negative photobiography (without the first antibody) with green background.

4 DISCUSSION

The present study showed that orchidectomy promotes a reduction in \dot{V}_E and $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ during room air conditions and T replacement was able to restore it. In addition, T replacement increased the ventilatory response to hypoxia and hypercapnia, without changing metabolic rate and body temperature, suggesting that this hormone may act directly in peripheral and/or central chemoreflex. In fact, we demonstrate the presence of AR in the CB, indicating a putative site for T action. The efficacy of orchidectomy and T replacement was confirmed by the respective effects in decreasing and increasing the mass of seminal vesicles (DE CARVALHO et al., 2015).

Our study revealed that ORX rats had a decrease in ventilation during room air conditions due to a lower V_T , and T replacement restored it to control values. These data are in contrast with previous studies, in which castration did not affect \dot{V}_E (BAIRAM et al., 2009; FOURNIER et al., 2014; TENORIO-LOPES et al., 2017b). The reason for such difference is unclear. It is known that elevated plasmatic concentrations of T have an impact on respiratory parameters (FOGEL et al., 2001; GONZALES et al., 2011) and AR receptors are expressed in brainstem nuclei related to breathing (SIMERLY et al., 1990). In fact, White et al. (1985) showed that \dot{V}_E increases following T administration in hypogonadal men, and that this increase is associated with comparable increases in metabolic rate. In women, T also increases baseline ventilation during wakefulness (Fogel et al., 2001). On the other hand, Koepchen (1953) reported that administration of T had no acute effects on ventilation in human males under room air conditions, while in male cats, T substantially inhibited phrenic activity (BAYLISS et al., 1987).

Differently from our previous studies in female rats in which ovariectomy reduces hypoxic and hypercapnic ventilatory response (Marques et al., 2015; 2017), no changes in

hypoxia and hypercapnia chemoreflexes were observed in ORX males in the present study (comparing Intact and ORX). In addition, we provide here the information that metabolic rate and T_b under hypercapnia or hypoxia were not affected by gonadectomy either. Actually, the non-effect of castration on ventilatory responses to hypercapnia and hypoxia had already been indirectly suggested by Stewart and colleagues (1992) who used an androgen blocker as a treatment to eight men with sleep apnea and observed no changes in \dot{V}_E under hypercapnia and hypoxia. More recently, Tenorio-Lopes et al. (2017) have demonstrated that hyperventilation caused by 5% CO_2 exposure was not influenced by castration. However; at higher CO_2 levels (10%), ORX rats displayed a greater increase in hypercapnic ventilatory response compared to intact rats. Since we used 7% CO_2 , it is possible that higher levels of CO_2 are needed to observe the castration effect on the response to hypercapnia.

According to the present study, supplementation of T in ORX rats caused an increase in \dot{V}_E under hypoxia and hypercapnia, without changing metabolic rate, indicating a primary effect on respiratory chemosensitivity. The findings regarding the effect of T treatment and CO_2 drive to breathing are contradictory. For instance, the hypercapnic ventilatory drive did not change significantly after T treatment in hypogonadal men (MATSUMOTO et al., 1985; WHITE et al., 1985). On the other hand, manipulation of T levels in healthy women increased ventilatory sensitivity to CO_2 (AHUJA et al., 2007). The same was observed in adult castrated male cats, in which the administration of T promoted a 47% increase in the hypercapnic ventilatory response (Tatsumi et al., 1994). Additionally, T has also been shown to depress the hypercapnic ventilatory drive in infant monkeys during sleep (EMERY; HLASTALA; MATSUMOTO, 1994). In the present study, we used a paradigm of hormonal treatment aimed to yield high physiological plasma levels of T (Kalil 3013), therefore, the different responses found in our study compared to the previous contradiction in the literature may be related to the differences among species and experimental protocols, or even the doses of T used.

We demonstrated that hypoxic ventilatory response was also increased by T replacement as observed in the study of Tatsumi et al., (1994), in which T-treated cats have greater CB chemosensitivity to hypoxia. Regarding humans, one study found a decrease, whereas another observed an increase in hypoxic ventilatory response after T treatment in hypogonadal males (MATSUMOTO et al., 1985; WHITE et al., 1985). In the present study, we performed immunohistochemistry to confirm the presence of AR in the CB, suggesting a cellular site that could explain the role of T in the hyperventilation observed through hypoxic conditions. Thus, our positive findings provide evidence that T leads to a higher \dot{V}_E under low O₂ partial pressure, at least in part, by the modulation of peripheral chemoreceptors.

Regarding Tb, the treatment with T did not affect the changes induced by high levels of CO₂ or low levels of O₂. It is important to point out that, although the dose used in the present study provides high physiological levels of T (Kalil et al., 2013), the effect of testosterone replacement was specific on the ventilatory measurements without affecting thermal or metabolic variables, demonstrating a specific physiological effect.

Our study demonstrated that castrated animals that received T had increases in V_E of 104% under hypercapnia and 46% during hypoxia compared to intact animals. Schneider et al. (1986) studied respiratory rhythm during sleep in 11 hypogonadal men, before and after T-replacement therapy and showed that apneas and hypopneas increased significantly during testosterone replacement. These results suggest that T participates in sleep-disordered breathing (SDB). In fact, a more recent study described that therapy with a high dose of T in elderly men can disrupt sleep and breathing, increase sleep-related hypoxemia, and potentially precipitate obstructive sleep apnea (LIU et al., 2003).

The fact that T treatment can lead to respiratory disorders such as SDB is a very important aspect to be considered. Our study used adult middle-age animals gonad-intact, ORX and ORX+T. As far as we know, previous studies that evaluated the effects of T

supplementation on ventilatory control that used adult, middle-age, men or animals (the model of our study) did not use an intact group with normal physiologic T levels as reference for comparison, which might have led to wrong conclusions underestimating the effects of T on ventilation. Studies mentioned above evaluated ventilatory chemosensitivity changes in hypogonadal men with or without T supplementation (Matsumoto et al., 1985; Schneider et al., 1986; White et al., 1985). Similarly, in the study by Tatsumi et al. (1994) castrated cats with or without T replacement were used. Thus, a differential factor in our study was the comparison of ORX animals with ORX plus T replacement (similar model as we found in current literature) with gonad-intact subjects. The differences found among them demonstrated that ORX+T group, even using a physiological dose for supplementation, did not mimic the responses observed in the intact group, what shed new light about the role of T replacement on chemosensitivity. The difference of endogenously produced T and supplementation effects on ventilation might be related to circadian rhythm of T release or even due to the fact that testicles also produce other hormones such as the anti-Mullerian hormone and the peptide hormones inhibins, activins, and follistatins (ANDERSON et al., 1998; MATUSZCZAK et al., 2013; YING, 1988) that might affect the respiratory control. Therefore, future studies are needed to verify whether these other gonadal hormones are important to the breathing control. Another possibility is that testicles are also responsible for converting part of produced T in the potent metabolite dihydrotestosterone (DHT). Thus, although the role of DHT in ventilation remains unknown, T supplementation in ORX animals is expected to result in lower circulating DHT concentrations in comparison to gonad-intact animals (DORRINGTON; FRITZ, 1975; FOLMAN; HALTMEYER; EIK-NES, 1972; LIU; VELDHUIS, 2018; STEERS, 2001).

Sexual hormones as testosterone are used with few restrictions by people (BEHAN et al., 2011). Currently several anabolic steroids such as oxandrolone, oximetilone, and stanozolol are available in the market for people use (GAO; BOHL; DALTON, 2005). In our work, we

demonstrated that T can change ventilatory chemosensitivity. Given that breathing disorders are the second most frequent respiratory disorder, surpassed only by asthma, and it is estimated that approximately 1 of every 5 adults has at least mild symptoms and that 1 of every 15 adults has at least moderate to severe symptoms (AZAGRA-CALERO et al., 2012; YOUNG; PEPPARD; GOTTLIEB, 2002), we suggest that the current androgenic treatments as well as the development of new synthetic androgenic drugs should take into account the impacts on the respiratory system of people.

5 CONCLUSION

In summary, the present study demonstrated that orchidectomy in rats decreases ventilation during room air conditions and T is able to restore it. In addition, T replacement promotes an increase in the ventilatory chemosensitivity under hypoxia and hypercapnia without change metabolism or body temperature, suggesting that androgens stimulate the respiratory response to low O₂ levels and CO₂ challenge. A putative site of T action is the CB, since we detected the presence of AR receptors in this structure. However, T could be also acting in central nervous system since AR is present in regions that includes nucleus that participates in breathing control. The present findings contribute to elucidate the modulation of sex hormones on the control of ventilation, metabolism, and body temperature in male unanesthetized adult rats.

CAPÍTULO 2

Influence of estrous cycle hormonal fluctuations and gonadal hormones on the ventilatory response to hypoxia in female rats

ABSTRACT

Sex hormones may influence many physiological processes. Recently, we demonstrated that hormonal fluctuations of cycling female rats do not affect respiratory parameters during hypercapnia. However, it is still unclear whether sex hormones and hormonal fluctuations that occur during the estrous cycle can affect breathing during a hypoxic challenge. Our study aimed to evaluate respiratory, metabolic and thermal responses to hypoxia in female rats on different days of the estrous cycle (proestrus, estrus, metestrus and diestrus) and in ovariectomized rats that received replacement with oil (OVX), estradiol (OVX+E₂), or a combination of estradiol and progesterone (OVX+E₂P). Ventilation (V_E), tidal volume (V_T), respiratory frequency (fR), oxygen consumption ($\dot{V}O_2$) and $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ were not different during the estrous cycle in normoxia or hypoxia. Body temperature (Tb) was higher during estrus, but decreased similarly in all groups during hypoxia. Compared with intact females in estrus, gonadectomized rats also had lower Tb in normoxia, but not in hypoxia. OVX rats experienced a significant drop in the ventilatory response to hypoxia, but hormonal replacement did not restore values to the levels of an intact animal. Our data demonstrate that the different phases of the estrous cycle do not alter ventilation during normoxia and hypoxia, but OVX animals display lower ventilatory responses to hypoxia compared with ovary-intact rats. Because estradiol and progesterone replacement did not cause significant differences in ventilation, our findings suggest that a yet-to-be-defined non-steroidal ovarian hormone is likely to stimulate the ventilatory responses to hypoxia in females.

Keywords: estrous cycle, sex hormones, breathing, body temperature, castration, hormone replacement

1 INTRODUCTION

Natural fluctuations in circulating sexual hormones across the estrous and menstrual cycles might be associated with changes in breathing (MACNUTT et al., 2012; ZABKA; BEHAN; MITCHELL, 2001). Throughout life, estrogen (E_2) and progesterone (P) influence the respiratory function of animals and human beings. (BEHAN et al., 2003; DEMPSEY; OLSON; SKATRUD, 2011; TATSUMI; HANNHART; MOORE, 1995). In women, during the luteal phase (LP), significant increases in circulating P and E_2 occur, ventilation and tidal volume increase (DEMPSEY; OLSON; SKATRUD, 2011; SCHOENE et al., 1981; SLATKOVSKA et al., 2006) and the central and peripheral chemosensitivity to hypercapnia and hypoxia are increased, compared to the follicular phase (when P levels are lowest) (DUTTON; BLANKSBY; MORTON, 1989; SCHOENE et al., 1981; WHITE et al., 1983b).

Recently, we demonstrated that despite the hormonal fluctuations during the estrous cycle, the ventilatory response to CO_2 in female rats is similar along the cycle (MARQUES et al., 2015). Interestingly, we found that ovariectomy promoted an attenuation (43%) of the hypercapnic hyperventilation, compared with the response obtained from intact animals in estrus (MARQUES et al., 2015). However, hormonal replacement with E_2 or E_2 and P did not restore the effects of ovariectomy on CO_2 chemosensitivity.

Combined action of E_2 and P reduces the occurrence of respiratory disorders like sleep obstructive apnea (BLOCK et al., 1979b; SAARES RANTA; POLO, 2002) , but the mechanisms of action and the effects of ovarian steroids are not yet fully elucidated. It is suggested that E_2 's main actions are mediated primarily through the activation of intracellular estrogen receptors, which are distributed throughout multiple organs, such as the uterus, breast, ovary, lungs, kidneys, bones and brain (BIRZNIECE et al., 2006; ÖSTERLUND, 2010). Estrogen and progesterone receptors are also found in the carotid body of adult and neonate rats

(JOSEPH et al., 2006) where they exert an excitatory effect on baseline activity and hypoxic chemoresponsiveness (HANNHART; PICKETT; MOORE, 1990; JOSEPH et al., 2002; TATSUMI et al., 1991b, 1997), and are, therefore, potential protective factors against the occurrence of sleep apneas in women (SAARES RANTA; POLO, 2002; SHAHAR et al., 2003; YOUNG; PEPPARD; GOTTLIEB, 2002).

The vast majority of studies in respiratory physiology use rats as the experimental model, with males being the preferred gender. When females are used in studies, authors frequently do not take into account the wide variations in circulating hormonal levels that occur during the estrous cycle. This last consideration has emerged as an important factor to be considered when working with female animals in clinical scenarios and in several research areas (SINGLE TARY et al., 2005). Several studies have demonstrated that the ventilatory responses to hypoxia in women vary during the different phases of the menstrual cycle, showing that hormonal fluctuations may be important and should be considered (DOMBOVY et al., 1987; DUTTON; BLANKSBY; MORTON, 1989; ENGLAND; FARHI, 1976; MACNUTT et al., 2012; TAKANO, 1985; WHITE et al., 1983b). Despite the studies that investigated the women's menstrual cycles, only a few studies have examined the influence of the estrous cycle on breathing in animal models (WENNINGER et al., 2009). As far as we are concerned, it remains to be explored whether the hormonal fluctuations of the estrous cycle affect the hypoxic ventilatory response, and what the potential effects of ovariectomy might have on the peripheral chemoreflex. In addition to the hormonal influence on ventilatory responses, it has been reported that E_2 is also involved in the regulation of body temperature (T_b) (BERENDSEN; KLOOSTERBOER, 2003; NELSON, 2008) in both animal models and in women. Many peri- and post-menopausal women suffer from face-flushing, sweating, and hotness with a reduction

of body temperature. Although E₂ is unlikely to be the sole factor involved, a replacement with estrogen is often used as a therapy (UCHIDA et al., 2010b).

Given the data in the literature, we hypothesized that hormonal fluctuations observed throughout the rat estrous cycle would have an impact on the ventilatory, metabolic and body temperature regulation during hypoxia. We also evaluated the possible role of E₂ and P in these physiological responses to hypoxia.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Animals

Experiments were performed on conscious, adult female Wistar rats, weighing 250–300 g. The animals had free access to water and food, and were housed in a temperature-controlled chamber at 24–26°C (ALE 9902001; Alesco, Monte Mor, SP, Brazil) with a 12:12 h light/dark cycle (lights on at 6:00 a.m.). Animal care was carried out in compliance with the Brazilian College of Animal Experimentation guidelines and approved by the local Animal Care and Use Committee (protocol no. 007827-09). We used cycling female rats on the days of proestrus (n = 7), estrus (n = 6), metestrus (n = 6), and diestrus (n = 5), and OVX rats treated with corn oil (OVX+O; n = 5), E₂ (OVX+E₂; n = 6), or a combination of E₂ and P (OVX+E₂P; n = 4).

2.2 Determination of the estrous cycle

Vaginal smears were taken daily to verify the regularity of the estrous cycle, and only those rats showing at least five consecutive regular 4- or 5-day estrous cycles were included in the study. The wet smears were collected at 9:00 a.m., immediately rolled onto a glass slide and allowed to air dry. Slides were examined for the following features: cornified epithelial cells, nucleated epithelial cells, and leukocytes. Estrous cycle stages were then determined

using the following criteria: 1) proestrus, predominantly nucleated epithelial cells; 2) estrus, predominantly cornified epithelial cells; 3) metestrus, presence of nucleated cells, but predominantly leukocytes; and 4) diestrus: predominantly leukocyte cells (GOLDMAN; MURR; COOPER, 2007; MARQUES et al., 2015).

2.3 *Surgical procedures*

Animals were anesthetized with a solution of ketamine (100 mg/kg, i.p.; Agener, São Paulo, Brasil) and xylazine (10 mg/kg, i.p.; Coopers, São Paulo, Brasil) to perform the ovariectomy and the implantation of a temperature datalogger (SubCue, Calgary, AB, Canada) in the abdominal cavity. At the end of surgery, the animals were treated with antibiotics (10 mg/kg, s.c.; Enrofloxacin, Flotril, Schering-Plough, São Paulo, Brazil) and analgesic (2.5 mg/kg, s.c.; flunixin meglumine, Banamine, Schering-Plough, São Paulo, Brazil).

2.4 *Ovariectomy and hormonal replacement*

Ovariectomy was performed as previously described (MARQUES et al., 2015). A 3-cm long midline dorsal skin incision was made approximately halfway between the middle of the back and the base of the tail. After the peritoneal cavity was accessed, the ovary was found surrounded by a variable amount of fat tissue. The connection between the Fallopian tube and the uterine horn was cut and the ovary moved out, according to the method described by Lasota and Danowska-Klonowska (LASOTA; DANOWSKA-KLONOWSKA, 2004). Eight days after ovariectomy, rats were treated with corn oil (0.2 mL, s.c.) or E₂ (10 µg/0.2 mL, s.c., 17β-estradiol cypionate; Pfizer, São Paulo, Brazil), at 9 a.m. for three days. On the fourth day, oil-treated rats received a final oil injection (OVX+O group), while E₂-treated rats received an

injection containing corn oil (OVX+E₂ group) or P (2.5 mg/0.2 mL, s.c., OVX+E₂P group; Sigma, St. Louis, MO). The hormonal treatment regimens used were found to yield physiological levels of plasma 17 β -estradiol and progesterone (SZAWKA et al., 2009). All experiments were conducted on day-8 following ovariectomy. On the day of experiment, vaginal cytology was performed to monitor the effectiveness of the hormonal treatment, as described in Marques et al. (MARQUES et al., 2015). Estrus is the phase of the estrous cycle in which gonadal hormones are found to be in their lowest concentrations (SMITH; FREEMAN; NEILL, 1975). Here, we considered estrus to be a control for comparison with OVX animals.

2.5 Determination of pulmonary ventilation, body temperature and metabolism

Measurements of ventilation were taken by the whole-body plethysmography method (BARTLETT; TENNEY, 1970), and T_b was recorded by use of a temperature datalogger (SubCue, Calgary, AB, Canada) implanted within the abdominal cavity and programmed to acquire data every 5 min, as previously described in the literature (BIANCARDI et al., 2008; DE CARVALHO et al., 2010; MARQUES et al., 2015). Two respiratory variables, fR and V_T, were measured. V_T was calculated by the equations provided by Bartlett and Tenney (BARTLETT; TENNEY, 1970), and V_E was calculated by the product of fR and V_T. Freely-moving rats were kept in a 5-L chamber ventilated with either room air or a hypoxic gas mixture containing 7% O₂ (White Martins, Sertãozinho, Brazil). The flow rate (1.5 L.min⁻¹) of the gas into the animal chamber was monitored by a flowmeter (model 822-13-OV1-PV2-V4; Sierra Instruments, Monterey, CA, USA). V_E was calculated before (time zero) and 30 min after hypoxia exposure. During measurement, the flow was interrupted and the chamber sealed for short periods of time (~1 min); pressure oscillations due to respiration were monitored by a

differential pressure transducer (TSD 160A; Biopac Systems, Santa Barbara, CA, USA). The signals were fed into a differential pressure transducer (DA 100C; Biopac Systems), passed through an analog-to-digital converter and digitized on a microcomputer equipped with data acquisition software (MP100A-CE; Biopac Systems). The sampling frequency was 200 samples s^{-1} . The results were analyzed using the data analysis software, Acknowledge (v3.8.1 data acquisition system; Biopac Systems). Calibration for volume was obtained during each experiment by injecting the animal chamber with 1 mL of air.

Metabolic rate was calculated by an indirect calorimetry method, using a closed respirometry system (ALMEIDA et al., 2004; MARQUES et al., 2015). Following gas exposure (normoxia or hypoxia), the air flow of the chamber was interrupted for 2 min and the air was continuously sampled by an O_2 analyzer (PowerLab System, ADInstruments®/Chart Software, version 7.3. Sydney, Australia). The decline in O_2 concentration during the 2-min interval was used to calculate $\dot{V}O_2$. Values were presented in $ml \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$ in STPD (standard conditions of temperature, pressure and dry air). All experiments were performed between 9:00 a.m and 1:00 p.m to minimize any influence of circadian rhythms.

2.6 *Statistical analyses*

V_E , fR , V_T , T_b , and $\dot{V}O_2$ were compared among groups using two-way ANOVA for repeated measures. The significance level was set to $P < 0.05$. The statistical analyses were performed using computer software (sigma stat; Systat Software, Point Richmond, CA, USA). Data are presented as group means \pm S.E.M. for each parameter investigated.

3 RESULTS

Ventilatory, metabolic, and body temperature data for different phases of the estrus cycle, and the comparisons of OVX, OVX+E₂ and OVX+E₂P animals with intact animals in the estrous phase, during normoxia and hypoxia are shown in Tables 1 and 2.

Table 1. Ventilatory, metabolic, and body temperature data for different phases of estrus cycle during normoxia and hypoxia conditions.

	PROESTRUS		ESTRUS		METAESTRUS		DIESTRUS	
<i>n</i>	7		6		6		5	
Weight, g	255.9	± 9.7	276.2	± 9.7	292.0	± 6.4	260.4	± 10.5
Normoxia								
\dot{V}_E , L.min ⁻¹	589.4	± 36.4	593.7	± 70.5	535.2	± 60.2	552.9	± 59.1
\dot{V}_T , mL	7.1	± 0.6	7.5	± 0.8	6.4	± 0.5	7.5	± 0.4
fR, breaths min ⁻¹	84.4	± 5.6	79.2	± 6.4	82.7	± 5.5	73.8	± 6.0
$\dot{V}O_2$, mL.Kg ⁻¹ .min ⁻¹	19.8	± 0.5	19.6	± 0.8	18.3	± 0.6	19.1	± 1.1
$\dot{V}_E/\dot{V}O_2$	29.8	± 1.9	30.2	± 3.2	29.8	± 4.1	29.8	± 4.3
Tb, °C	37.2	0.2	38.1**	0.1	37.4	0.1	37.2	0.1
Hypoxia								
\dot{V}_E , L.min ⁻¹	1410.3	± 96.5	1567.7	± 99.0	1517.2	± 153.1	1442.2	± 248.5
\dot{V}_T , mL	12.8	± 1.0	13.9	± 0.7	13.0	± 1.2	13.9	± 1.6
fR, breaths min ⁻¹	110.3	± 2.1	112.7	± 2.6	117.0	± 9.1	102.4	± 9.2
$\dot{V}O_2$, mL.Kg ⁻¹ .min ⁻¹	11.0	± 0.5	10.7	± 0.7	10.7	± 0.4	11.5	± 0.5
$\dot{V}_E/\dot{V}O_2$	130.7	± 11.6	155.5	± 13.74	142.4	± 14.9	124.8	± 19.2
Tb, °C	35.7	± 0.2	36.0	± 0.3	35.7	± 0.1	35.5	± 0.3

Values are mean ± SE; n, n°. of rats. **Difference of estrus vs proestrus, diestrus and metaestrus. P<0.05.

Table 2. Ventilatory, metabolic, and body temperature data comparing OVX, OVX+E₂ and OVX+E₂P animals with intact animal in Estrus phase, in normoxia and hypoxia conditions.

	ESTRUS	OVX+O	OVX+E ₂	OVX+E ₂ P
<i>n</i>	6	5	6	4
Weight, g	276.2 ± 9.7	289.4 ± 12.9	299.7 ± 10.2	302.0 ± 3.3
Normoxia				
\dot{V}_E , L.min ⁻¹	593.7 ± 70.5	397.9 ± 17.8	468.9 ± 32.7	417.1 ± 37.0
\dot{V}_T , mL	7.5 ± 0.8	5.3 ± 0.6	6.0 ± 0.3	5.4 ± 0.5
fR, breaths min ⁻¹	79.2 ± 6.4	78.2 ± 7.1	79.0 ± 4.2	77.5 ± 3.9
$\dot{V}O_2$, mL.Kg ⁻¹ .min ⁻¹	19.6 ± 0.8	17.6 ± 0.6	18.1 ± 0.8	17.6 ± 0.4
$\dot{V}_E/\dot{V}O_2$	30.2 ± 3.2	23.1 ± 0.9	27.7 ± 2.5	26.1 ± 1.8
Tb, °C	37.2* ⁺ # ± 0.2	37.3 ± 0.2	37.4 ± 0.2	37.2 ± 0.3
Hypoxia				
\dot{V}_E , L.min ⁻¹	1567.7* ⁺ ± 99.0	895.1 ± 42.1	1020.0 ± 88.6	1112.8 ± 75.0
\dot{V}_T , mL	13.9* ⁺ ± 0.7	7.5 ± 0.5	9.3 ± 0.8	9.6 ± 1.1
fR, breaths min ⁻¹	112.7 ± 2.6	110.8 ± 2.5	109.8 ± 3.3	118.5 ± 6.7
$\dot{V}O_2$, mL.Kg ⁻¹ .min ⁻¹	10.7 ± 0.7	10.3 ± 0.2	10.7 ± 0.2	11.0 ± 0.7
$\dot{V}_E/\dot{V}O_2$	155.5* ⁺ # ± 13.7	86.8 ± 3.9	96.3 ± 9.5	102.1 ± 7.7
Tb, °C	35.7 ± 0.2	35.0 ± 0.6	35.9 ± 0.3	35.2 ± 0.3

Values are mean ± SE; n, n^o. of rats. * Difference estrus vs OVX, + Difference estrus vs OVX+E₂, # Difference estrus vs OVX+E₂P. P<0.05

3.1 *Estrous cycle: Ventilation, body temperature and metabolism in normoxia and hypoxia*

3.1.1 *Ventilation*

In normoxic conditions, no differences in V_E were observed in the four different phases of the estrous cycle. Hypoxia caused an increase in V_E in all groups [hypoxia effect: $P < 0.0001$; $F_{(3,20)} = 133.7$; without interaction], resulting from a combination of V_T [hypoxia effect: $P < 0.0001$; $F_{(3,20)} = 98.3$; without interaction] and fR [hypoxia effect: $P < 0.0001$; $F_{(3,20)} = 75.9$; without interaction]. However, there was no difference among groups, as shown in Fig. 1.

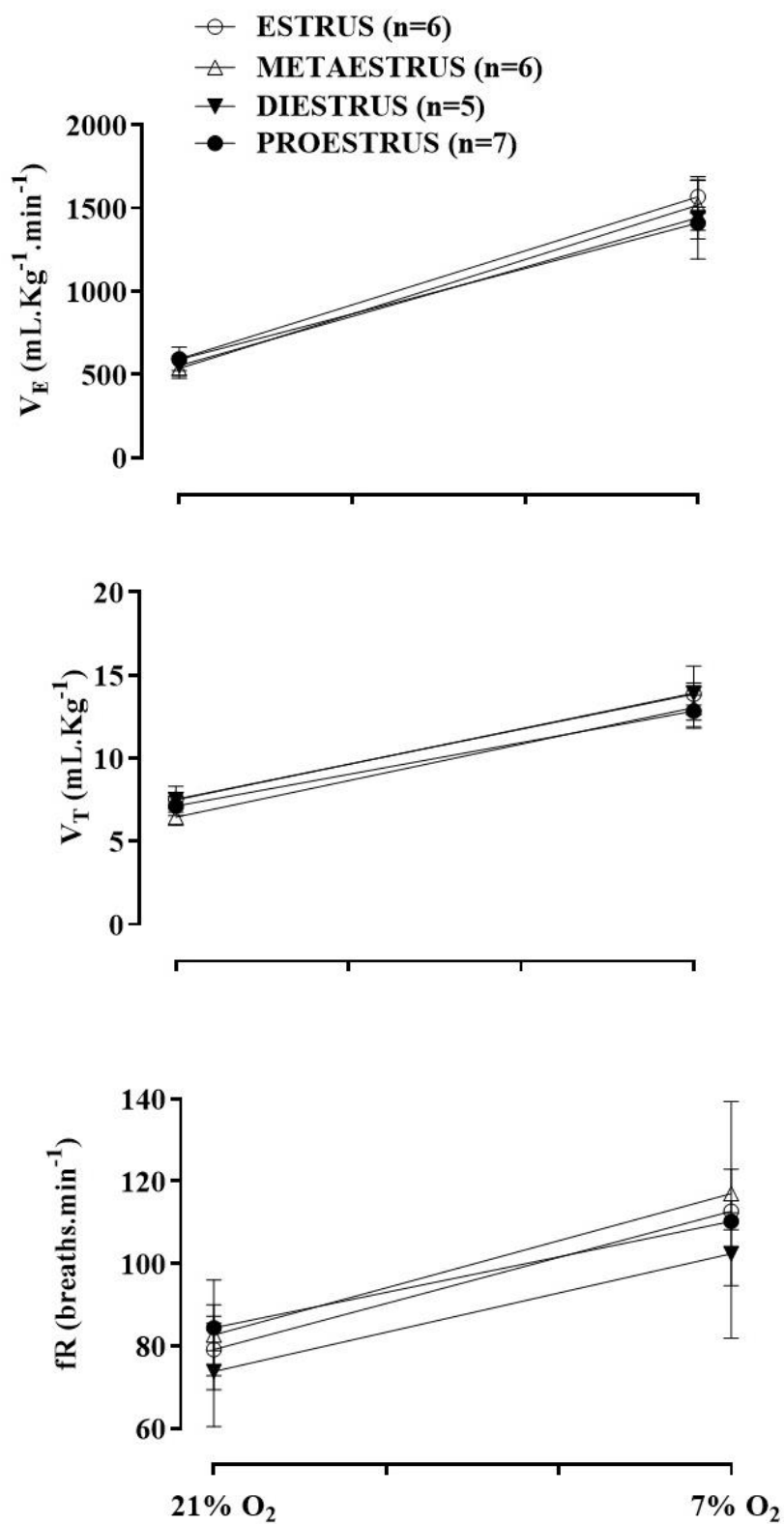


Fig. 1: Ventilation (V_E), Tidal volume (V_T) and respiratory frequency (fR) of intact rats in proestrus, estrus, metaestrus and diestrus during normoxia (21% O_2) and hypoxia (7% O_2); Values are means \pm SE; n, n^o. of rats.

3.1.2 Metabolism

In normoxic conditions, no differences in $\dot{V}O_2$ and $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ were observed in the different phases of the estrous cycle (Fig. 2). Hypoxia caused a decrease in $\dot{V}O_2$ in all groups [hypoxia effect: $P < 0.0001$; $F_{(3,20)} = 491.6$; without interaction] and a significant increase in the $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ [hypoxia effect: $P < 0.0001$; $F_{(3,20)} = 227.9$; without interaction], and no difference was found among groups.

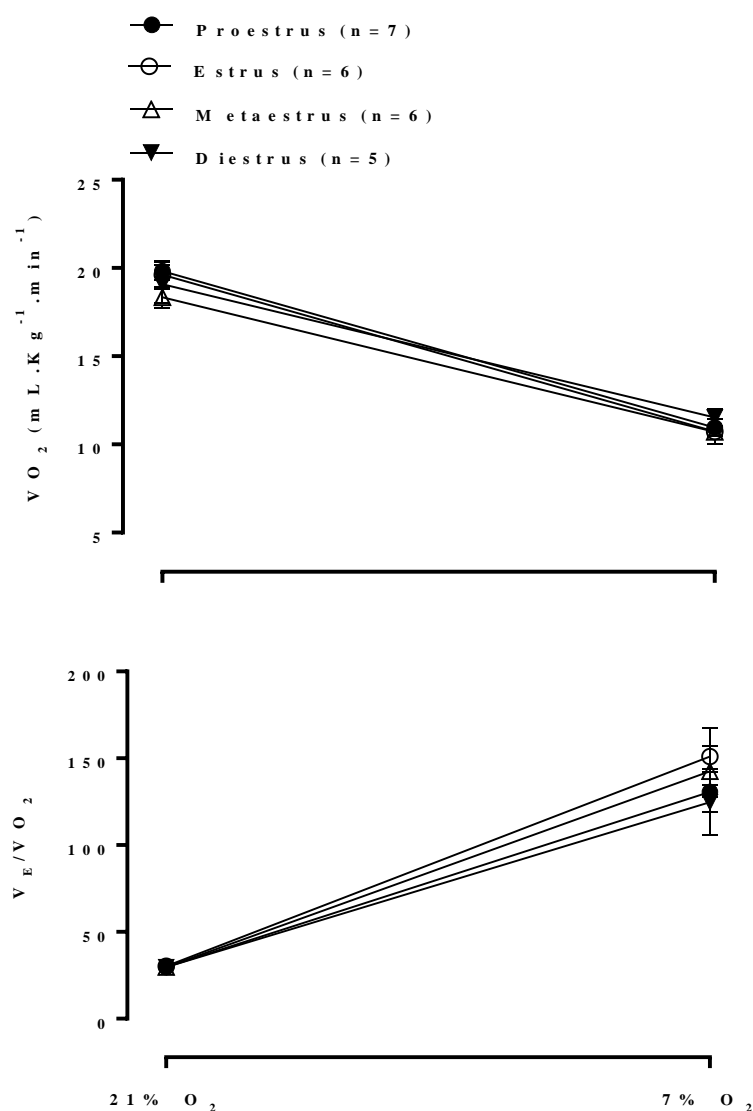


Fig.2: Oxygen consumption $\dot{V}O_2$ and respiratory equivalent $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ of rats in proestrus, estrus, metaestrus, and diestrus during normoxia (21% O_2) and hypoxia (7% O_2). Values are means \pm SE; n, n°. of rats.

3.1.3 Body temperature

Tb of rats in estrus was higher than in other phases of the estrous cycle during normoxia [cycle effect: $P = 0.0022$, $F_{(3,20)} = 4.0$; without interaction]. Hypoxia caused a decrease in Tb in all groups [hypoxia effect: $P < 0.0001$; $F_{(3,20)} = 173.3$; without interaction] but there was no difference among them, as shown in Fig. 3.

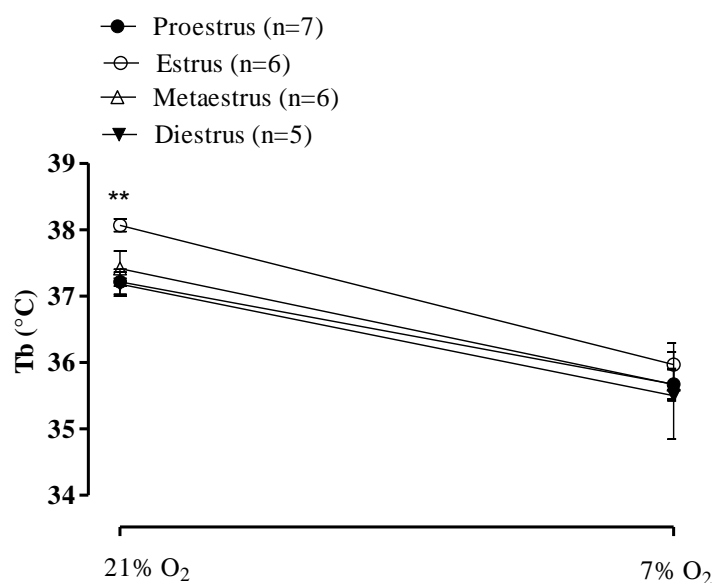


Fig. 3: Body temperature (Tb) of female rats in proestrus, estrus, metaestrus and diestrus during normoxia (21% O₂) and hypoxia (7% O₂). Values are means \pm SE; n, no. of rats. ** indicates that Tb of rats on estrus was higher than the other phases during normoxia, $P < 0.01$.

3.2 Ovariectomy and hormonal replacement: Ventilation, body temperature and metabolism in normoxia and hypoxia

3.2.1 Ventilation

Comparing OVX animals, treated or not with ovarian steroids, with cycling rats in estrus in normoxia, there was no significant difference in ventilatory parameters among groups (Fig.

4). Hypoxia caused a significant increase in V_E in all groups [effect of hypoxia: $P < 0.0001$, $F_{(3,18)} = 169.3$], resulting from a combination of increased V_T [effect of hypoxia: $P < 0.0001$, $F_{(3,18)} = 69.3$; effect of OVX: $P < 0.0001$; interaction among groups: $P < 0.05$] and fR [effect of hypoxia: $P < 0.0001$, $F_{(3,18)} = 72.6$; no OVX effect, and no significant interaction]. Nevertheless, OVX+O, OVX+E₂ and OVX+E₂P showed an attenuated hypoxic ventilatory response, compared to rats in estrus [effect of castration: $P < 0.0001$, $F_{(3,18)} = 18.9$; interaction among groups: $P = 0.014$] (Fig. 4).

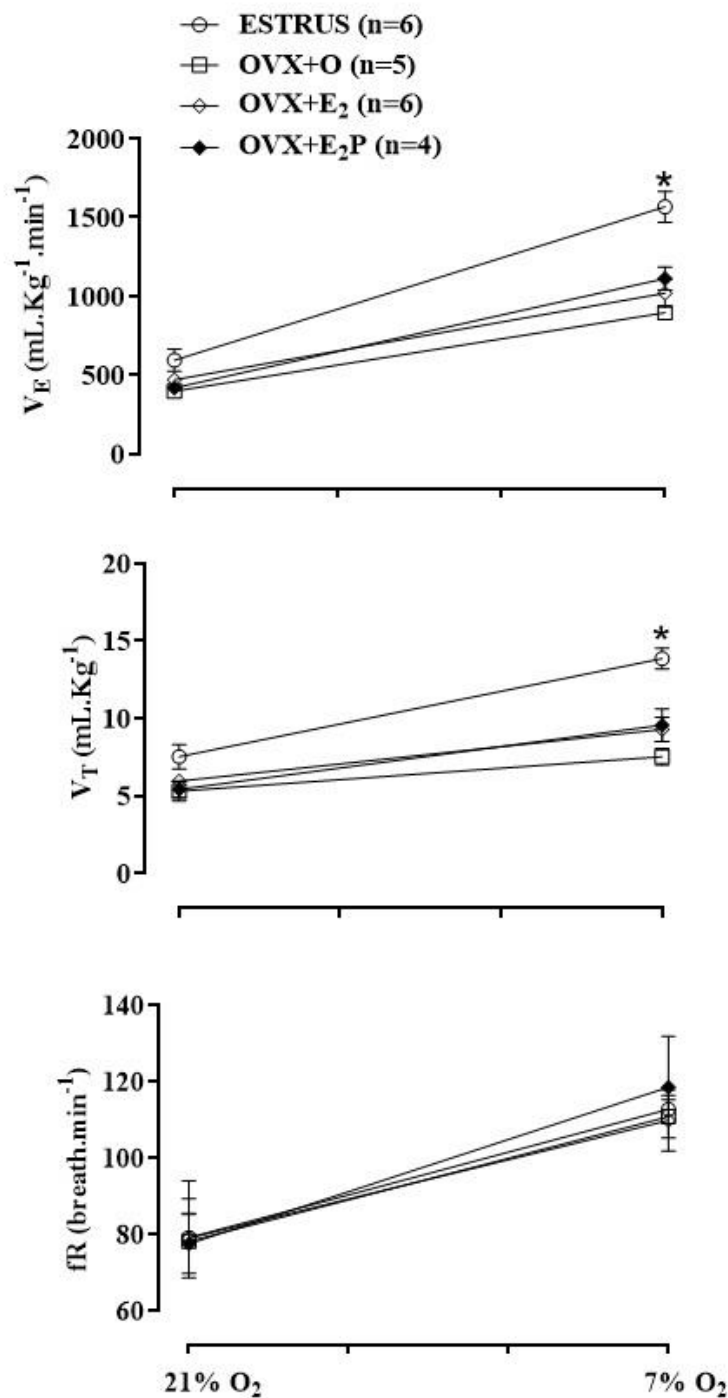


Fig. 4: Ventilation (V_E), tidal volume (V_T) and respiratory frequency (fR) of intact rats in estrus, ovariectomized (OVX) rats with corn oil replacement (OVX+O), OVX rats replaced with E₂ (OVX+ E₂), and OVX rats replaced with a combination of E₂ and P (OVX+ E₂P) during normoxia (21% O₂) and hypoxia (7% O₂). Values mean \pm SE; n , n^o. of rats. Asterisk indicates a difference between the estrus group compared to OVX + O, OVX + E₂, and OVX + E₂P groups ($P < 0.05$).

3.2.2 Metabolism

As seen in Fig. 5, during normoxic conditions, no differences in $\dot{V}O_2$ were observed in OVX rats (OVX+O, OVX+E₂ and OVX+E₂P) compared to intact rats in estrus (P = 0.18). Hypoxia caused a decrease in $\dot{V}O_2$ in all groups [hypoxia effect: P < 0.0001; F_(3,18) = 452.8; without interaction]. $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ was not different between estrous and OVX animals during normoxia. Hypoxia caused an increase in this equivalent in all groups [hypoxia effect: P < 0.0001; F_(3,18) = 266.3; with interaction: P = 0.0014; F_(3,18) = 8.2] with rats in estrus displaying a higher $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ response compared to all OVX groups [P < 0.001; F_(3,18) = 10.2].

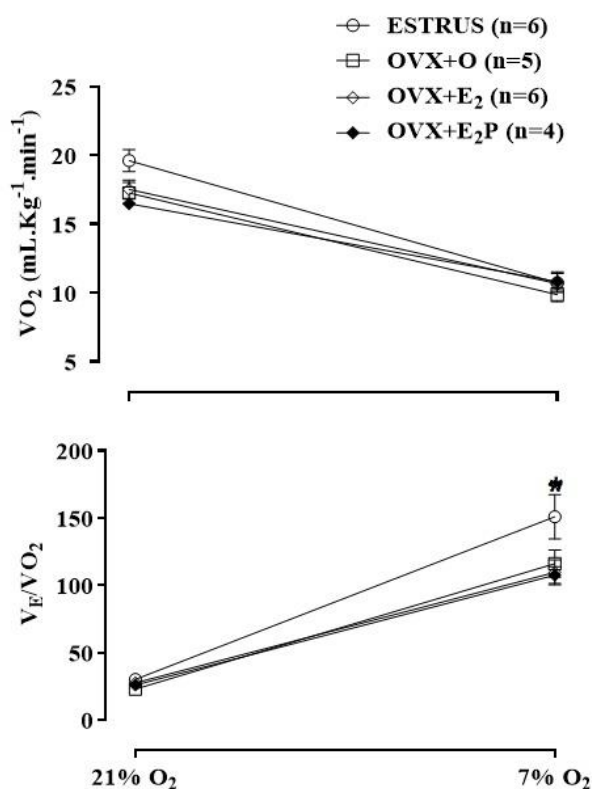


Fig. 5: Oxygen consumption $\dot{V}O_2$ and respiratory equivalent $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ of intact rats in estrus, ovariectomized (OVX) rats with corn oil replacement (OVX+O), OVX rats replaced with E₂ (OVX+ E₂), and OVX rats replaced with a combination of E₂ and P (OVX+ E₂P) during normoxia (21% O₂) and hypoxia (7% O₂). Values are means \pm SEM; n, n^o. of rats. Asterisk indicates a difference between the estrus group compared to OVX + O, OVX + E₂, and OVX + E₂P groups (P < 0.05).

3.2.3 Body temperature

During normoxia, the Tb of rats in estrus was higher than rats in all OVX groups, which did differ among themselves [cycle effect: $P = 0.019$, $F_{(3,18)} = 4$] (MARQUES et al., 2015). Hypoxia decreased Tb in all groups [hypoxia effect: $P < 0.0001$; $F_{(3,20)} = 111.30$; without interaction] and there were no differences among them, as shown in Fig. 6.

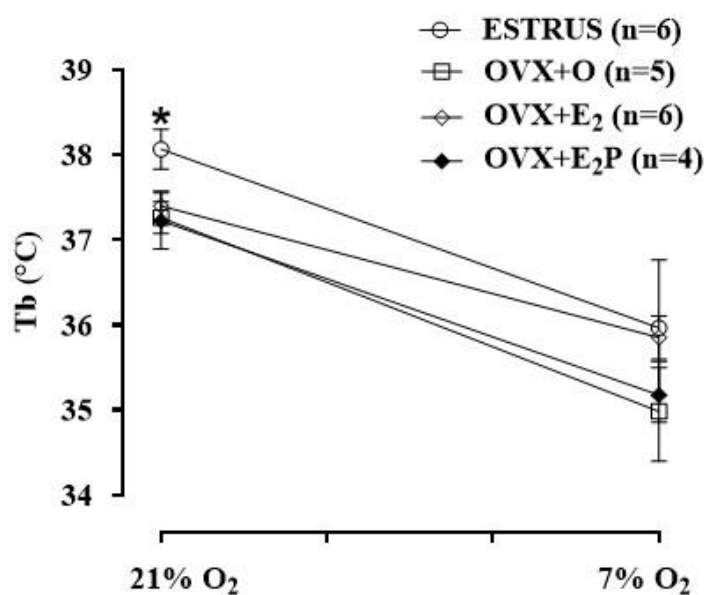


Fig. 6: Body temperature (Tb) of intact rats in estrus, ovariectomized (OVX) rats with corn oil replacement (OVX+O), OVX rats replaced with E₂ (OVX+ E₂), and OVX rats replaced with a combination of E₂ and P (OVX+ E₂P) during normoxia (21% O₂) and hypoxia (7% O₂). Values are means \pm SE; n , n° . of rats. Asterisk indicates a difference between the estrus group compared to OVX + O, OVX + E₂, and OVX + E₂P groups ($P < 0.05$).

4 DISCUSSION

In the current study, we have demonstrated that different phases of the estrous cycle, during which hormonal fluctuations occur, did not promote alterations in \dot{V}_E , and $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ during both normoxia and hypoxia. Both ovariectomy and ovarian-steroid replacement did not change the ventilation parameters in normoxia. OVX+O, OVX+E₂ and OVX+E₂P rats showed an attenuated \dot{V}_E , and $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ response to hypoxia, compared to estrous animals. The attenuated hypoxic ventilatory response in OVX rats suggests that ovarian hormones likely modulate an excitatory response of the respiratory adjustments to hypoxia. However, replacement with physiological levels of E₂ and P was unable to restore this attenuated response to the level of an intact cycling rat. As demonstrated in previous studies, Tb was higher in estrus compared to the other phases of the estrous cycle, and with OVX animals (OVX+O, OVX+E₂, and OVX+E₂P) during normoxia. During hypoxia, Tb did not change during the estrous cycle and was similar in OVX models and cycling rats in estrus, showing that gonadal hormones do not participate in body temperature regulation during hypoxia.

4.1 *Estrous cycle: Ventilation, body temperature and metabolism in normoxia and hypoxia*

Studies on ventilatory alterations during the menstrual cycle have demonstrated that the ventilatory response to hypoxia was higher in women in the luteal phase during exercise and resting conditions (BEHAN et al., 2011). Indeed, some studies have reported that peripheral chemoreceptors can be modulated by hormones, such as progesterone (JOSEPH; NIANE; BAIRAM, 2012; UPPARI; JOSEPH; BAIRAM, 2017). Conversely, the present data show that estrous cycle fluctuation does not affect the ventilatory response to hypoxia in cycling adult rats. A study by Zabka et al. (ZABKA; BEHAN; MITCHELL, 2001) demonstrated that the

short-term ventilatory response to hypoxia in anesthetized rats did not differ among phases of the estrous cycle. Similarly, Marques et al. (MARQUES et al., 2015) showed no differences between the ventilatory and metabolic responses in normocapnia and those that are induced by hypercapnia throughout the rat estrous cycle. Herein, our results corroborate these previous studies in the literature, suggesting that compensatory responses exist for these hormonal fluctuations, resulting in the maintenance of ventilation during normoxic and hypoxic conditions in rats.

We also demonstrated an increase in body temperature on the day of estrus, as reported in other studies (KENT; HURD; SATINOFF, 1991; MARQUES et al., 2015; YANASE; TANAKA; NAKAYAMA, 1989). In rodents, it is known that there is an increase in Tb immediately before ovulation (REFINETTI; MENAKER, 1992). In our experiments, Tb was approximately 0.6°C higher during estrus compared to the other phases during normoxia. However, this difference was not observed following hypoxia, suggesting that the hormonal fluctuations that occur during the estrous cycle do not participate in the hypoxia-induced drop in Tb.

4.2 *Ovariectomy and hormonal replacement: Ventilation, body temperature and metabolism in normoxia and hypoxia*

Our study revealed that OVX rats under hormonal replacement showed no significant differences in the ventilatory parameters during normoxia compared to intact animals in estrous. However, OVX animals had lower a ventilatory response to hypoxia than cycling rats in estrous. Fournier et al. (FOURNIER et al., 2015) showed that rats with reduced circulating levels of ovarian hormones (whether by ovariectomy or aging) had reduced hypoxic ventilatory responses when compared to young intact females. This result is in agreement with the findings

of the present study, suggesting that ovarian hormones play a role in the ventilatory control system, providing an important signal that drives breathing. Sexual hormone receptors are expressed in the peripheral chemoreceptors of rats (JOSEPH et al., 2006) and are localized in brainstem areas involving respiratory control (BRINTON et al., 2008; HAYWOOD et al., 1999; HELENA et al., 2009; SCHLENKER; HANSEN, 2006).

Many studies have investigated the effects of sex hormones in the ventilatory responses to hypoxia, however only few studies were performed in female animals. Tatsumi et al. (TATSUMI et al., 1997) found that OVX cats decreased ventilatory and carotid body responses to hypoxia. Another study (HANNHART; PICKETT; MOORE, 1990) with anesthetized and castrated male cats showed that replacement with a combination of E₂ and P increases both the carotid body neural output responsiveness to hypoxia and the hypoxic ventilatory response in conscious animals. The authors also demonstrated that the results were not different following replacement with progesterone or estrogen alone, indicating the importance of both for ventilatory responses to hypoxia. Additionally, Boukari et al. (BOUKARI et al., 2016a) showed that the intracerebroventricular injection of small interfering RNA (siRNA) against membrane progesterone receptors Beta suppressed the ventilatory responses to hypoxia in male and female mice.

Taken together, these data suggest that sex hormones in the central and peripheral nervous system regulate processes involved in the ventilatory responses to hypoxia. Our results show a decrease of ventilatory responses to hypoxia in OVX rats compared to intact rats in the estrus phase, and that replacement with E₂ and E₂ plus P did not mimic the response as of an intact animal. It is worth noting that these regimens of hormonal replacement were effective in restoring the systemic effects of E₂ and P, as changes were observed in the cytology of vaginal smears, as described in (MARQUES et al., 2015). Thus, although estradiol and progesterone

are the main feminine gonadal hormones, it is likely that other ovarian factors may play a role in ventilation. Besides female gonadal steroids, ovarian hormones include androgens and peptide hormones, such as activin, inhibin, follistatin (KNIGHT; GLISTER, 2001; MUTTUKRISHNA; LEDGER, 2001) and anti-müllerian hormone (VIGIER et al., 1984), which might be involved. However, there are no studies yet reporting the involvement of these hormones in ventilation. During their lifetimes, people manipulate their sexual hormone levels in different ways with oral contraceptives, hormonal replacement, etc. The respiratory consequences of these manipulations are not completely understood (BEHAN et al., 2011). In this context, the present study contributes to our understanding of sex hormones and the ventilatory adjustments to hypoxia exposure, however the mechanisms are still poorly understood.

Our experiments were performed in Wistar rats; however, we believe that this pattern of response is also valid to other rat strains. According to Hodges et al. (HODGES et al., 2002), hyperventilation during hypoxia is similar among different female and male rat strain (Brown Norway, Dahl salt-sensitive, Fawn-hooded Hypertensive, Sprague-Dawley). Further, no differences were observed among different rat strain regarding duration of the estrous-cycle phases and hormonal variation (PASCOTTO et al., 2015).

In the current study, we also compared the Tbs of intact and gonadectomized animals. Our results showed that Tb was higher in intact animals in estrus than OVX animals (OVX+O, OVX+E₂, and OVX+E₂P) during normoxia. During hypoxia, there was difference in Tb in OVX animals and intact rats in estrus. Based on this, we suggest that gonadal hormones do not participate in Tb regulation during hypoxia. It is known that hypothalamic neurons can affect thermoregulation, and that these neurons can be affected by sexual hormones. Uchida et al. (UCHIDA et al., 2010a) demonstrated that injections of E₂ in the medial preoptic nucleus (MPO) of castrated female rats maintained Tb constant during cold exposure. Moreover, Tb in

castrated females that received E₂ injections in the MPO was higher during cold exposure than castrated females that did not receive E₂ (UCHIDA et al., 2010a). However, we showed that the drop in Tb observed during hypoxia seemed to occur despite the levels of ovarian hormones, because this response happened in the same way in both cycling and OVX animals. Nevertheless, it still remains unclear how sex hormones and castration affect body temperature and/or body temperature regulation during hypoxia.

5 CONCLUSION

The ventilatory response to hypoxia did not change during the different phases of the estrous cycle in intact female rats. But, OVX animals showed a lower ventilatory response to hypoxia compared to intact females in estrus, suggesting that ovarian hormones exert an excitatory modulation in the respiratory response to low O₂ levels. In our experimental model, replacement with E₂ or a combination of E₂ and P did not mimic the responses of an intact cycling female rat, suggesting that other ovarian factors may be involved. Moreover, on the day of estrus, animals displayed an increased body temperature, but no difference was observed during hypoxia exposure compared with other phases of estrous cycle and OVX animals. The present findings contribute to elucidate the modulation of sex hormones in the ventilation, metabolism and body temperature control in female unanesthetized adult rats. Further investigation using female rats as an experimental model to assess the mechanisms of sex hormones in the respiratory control system might contribute to the understanding and the development of specific therapies for respiratory disorders that are sex-specific.

CAPÍTULO 3

Influência dos hormônios sexuais na concentração de monoaminas e seus metabólitos em resposta à hipercapnia e hipóxia no LC, núcleos da Rafe e área pré-óptica, em ratos e ratas *Wistar* intactos e castrados.

RESUMO

De acordo com literatura atual, existem muitas diferenças entre os sexos no controle da ventilação uma vez que estudos demonstram um dimorfismo sexual em humanos em anormalidades do sistema respiratório como as apnéias repetidas, hipopnéias, e oscilações de respiração que apresentam uma incidência 3 vezes maior em homens do que em mulheres. Diferenças sexo-específicas também são observadas no controle da temperatura corporal (Tc) uma vez que mulheres apresentam uma temperatura variável ao longo do ciclo menstrual. Tanto a dopamina (DA), como a noradrenalina (NOR) e a serotonina (5-HT) são neurotransmissores classificados como monoaminas que participam no controle da ventilação e da termorregulação atuando em regiões como o LC, Rafe e MPA, que por sua vez são regiões sexualmente dimórficas. Assim sendo, analisamos a influência dos hormônios sexuais na concentração de monoaminas e seus metabólitos em resposta à hipercapnia e hipóxia através da técnica de HPLC-ED no LC, núcleos da Rafe e MPA, em ratos e ratas *Wistar* intactos e castrados. Em **normocapnia** não foram observadas alterações de nenhuma das monoaminas analisadas, seus metabólitos ou na relação entre eles na **MPA** mas diferenças foram encontradas no **LC e Rafe**. Tanto hipercapnia quanto hipóxia causaram diferenças nas concentrações de monoaminas e/ou seus metabólitos em pelo menos algum dos tratamentos entre os grupos analisados. Assim, demonstramos que a castração e a exposição gasosa levam a alterações na concentração de monoaminas nas diferentes regiões analisadas.

Palavras-chave: SNC, dimorfismo-sexual, catecolaminas, punch, HPLC-ED, pletismografia, reposição hormonal, castração, ratos *Wistar*.

1 INTRODUÇÃO

As monoaminas são definidas como neurotransmissores derivados de aminoácidos sendo os principais a NOR, DA e 5-HT que juntos constituem um importante grupo de neurotransmissores do SNC que exercem uma modulação tônica sobre a rede respiratória (CONNELL; KARIKARI; HOHMANN, 2004; DOBBINS; FELDMAN, 1994; FUXE, 1964; GUYENET et al., 1993; HILAIRE et al., 2004; OYAMADA et al., 1998; VIEMARI; TRYBA, 2009; VIEMARI et al., 2004). De fato, LI; NATTIE, (2006) demonstraram que em ratos adultos a lesão dos neurônios catecolaminérgicos do tronco encefálico levou a diminuição da ventilação, devido a diminuição da frequência respiratória durante a exposição a 7% de CO₂. Entretanto, um estudo do nosso laboratório demonstrou que a lesão dos neurônios catecolaminérgicos do tronco encefálico de ratos *Wistar* machos e fêmeas P20-21 reduz significativamente a resposta ventilatória à hipercapnia em machos (33%) mas leva a um aumento em fêmeas (33%), demonstrando que os neurônios catecolaminérgicos promovem uma modulação inibitória em machos e excitatória em fêmeas nesta idade.

Os neurônios monoaminérgicos podem estar envolvidos em diversas doenças ligadas ao sistema respiratório que são sexualmente dimórficas. Considerando-se a 5-HT é sabido que disfunções nos neurônios serotoninérgicos podem estar envolvidos com a SIDS (CUMMINGS et al., 2011; KINNEY et al., 2009) já que a lesão dos neurônios serotoninérgicos em leitões recém-nascidos ou camundongos, causa uma queda significativa na resposta ventilatória de CO₂ (HODGES et al., 2005; PENATTI et al., 2006). Adicionalmente estudos demonstram a influência dos grupamentos noradrenérgicos do SNC com o desenvolvimento da síndrome de Rett, em que os neurônios TH positivos estão em menor número (VIEMARI et al., 2005). Já a hiper-responsividade ao CO₂ foi demonstrada como um fator que pode resultar em ataques de

pânico (GORMAN et al., 1994b), já que alguns estudos têm proposto que indivíduos com transtorno de pânico apresentam quimiossensibilidade aumentada ao CO₂ e pressão parcial de CO₂ aumentada (PCO₂). Mesmo indivíduos saudáveis apresentam reações semelhantes ao pânico quando expostos a uma única inalação de mistura de gases de 35% CO₂ e 65% O₂ (VAN DUINEN et al., 2007).

Em um estudo com recém nascidos DALMAZ et al. (1991) avaliou que em bebês prematuros (n = 8) saudáveis ou prematuros com distúrbios respiratórios (n = 10) durante o primeiro mês de vida e demonstrou que as concentrações plasmáticas de NOR, epinefrina e DOPAC (metabólito da dopamina) em situação de repouso são semelhantes entre indivíduos. No entanto, nos indivíduos com distúrbios respiratórios, a DA estava significativamente em maiores concentrações sanguíneas do que em indivíduos saudáveis. Os autores também demonstraram que após uma inalação de 5% CO₂ por 10 min, não houve alterações significativas das concentrações plasmáticas de catecolaminas nos prematuros doentes, mas houve um aumento significativo dos níveis plasmáticos de epinefrina e uma elevação moderada dos valores de NOR e DA nos prematuros saudáveis. Este estudo indica a participação das catecolaminas na modulação das respostas ventilatórias basais e em situação de um desafio gasoso desde o início da vida (DALMAZ et al., 1991).

Curiosamente, sabe-se que as doenças citadas relacionadas a respiração são sexualmente dimórficos. A SIDS por exemplo é uma das principais causas de morte em crianças até 1 ano de idade em países desenvolvidos, e 60% são meninos (MOON; HORNE; HAUCK, 2007). Já a síndrome do pânico tem 2 a 3 vezes mais probabilidade de se desenvolver em mulheres durante do que em homens (KESSLER et al., 1994; SHEIKH; LESKIN; KLEIN, 2002; YONKERS et al., 1998) possivelmente ligados a hormônios sexuais.

Assim, em nossos estudos avaliamos o efeito do sexo e dos diferentes desafios gasosos nas concentrações de monoaminas em diferentes regiões do SNC que fazem parte da rede de controle respiratório. Adicionalmente, avaliamos o efeito do sexo e dos hormônios gonodais na liberação de monoaminas e seus metabólitos na MPA, (KELLY; SHANNON, 1987; SIMERLY et al., 1990) já que demonstramos previamente que a Tc é sexualmente dimórfica e varia de acordo com a concentração de hormônios gonodais (MARQUES et al., 2015).

Estudos recentes do nosso laboratório demonstraram a importância dos neurônios NOR do LC nas respostas respiratórias a hipercapnia em machos e fêmeas (BIANCARDI et al., 2008; DE CARVALHO et al., 2017). É sabido que assim como a NOR, a 5-HT dentro do LC participam na modulação das respostas ventilatórias à elevadas concentrações de CO₂ uma vez que a microinjeção de WAY-100635 (antagonista seletivo de receptor 5-HT_{1A}) no LC resultou na diminuição da resposta ventilatória à hipercapnia (DE SOUZA MORENO et al., 2010). O LC é densamente innervado por fibras serotoninérgicas, principalmente provenientes do núcleo dorsal da rafe (ASTON-JONES et al., 1991; KAEHLER; SINGEWALD; PHILIPPU, 1999).

Assim, nosso objetivo foi verificar a influência dos hormônios sexuais na concentração de monoaminas e seus metabólitos em resposta à hipercapnia e hipóxia através da técnica de HPLC- ED no LC, núcleos da Rafe e MPA, em ratos e ratas *Wistar* intactos e castrados.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 *Animais*

Os experimentos foram realizados com ratos e ratas Wistar, pesando de 200 a 300g com idade entre 90 e 120 dias. Os animais foram acondicionados em caixas plásticas coletivas à temperatura controlada de $24 \pm 26^{\circ}\text{C}$ e submetidos a um ciclo claro/escuro de 12/12h com livre acesso à água e ração. Os experimentos foram realizados entre as 8:00h e 13:00h visando minimizar o efeito das alterações hormonais circadianas, já que é sabido que existem mudanças nas concentrações hormonais de acordo com o período do dia, como pode ser visto no estudo de Szawka e colaboradores (SZAWKA et al., 2005).

Os animais utilizados foram fêmeas intactas em cada fase do ciclo estral (estro, diestro, metaestro e proestro) bem como ovariectomizadas e ovariectomizadas com reposição hormonal e machos intactos, orquidectomizados e orquidectomizados com suplementação hormonal.

2.1.1 *Procedimentos cirúrgicos*

2.1.1.1 *Castração e Reposição hormonal*

As ratas foram anestesiadas e posicionadas em decúbito ventral, foi realizada uma incisão de aproximadamente três centímetros na pele e tecido celular subcutâneo sob a linha mediana. A parede muscular foi então divulsionada para o acesso à cavidade abdominal, localizando o ovário em meio a uma massa gordurosa. A retirada do ovário foi realizada após ligadura da extremidade da tuba uterina, seccionando entre a ligadura e o ovário. Após a retirada dos ovários, suturou-se a parede muscular e, em seguida, a pele.

As ratas ovariectomizadas tiveram 4 dias de recuperação e posteriormente foram tratadas com óleo de milho (grupo OVX - 0,2 mL/rata, s.c., Liza; Cargill, São Paulo, Brasil) por 4 dias consecutivos, ou com 17β -E₂ (grupo OVX+E₂ - 10 µg / 0,2 mL / rata, s.c., E₂ Cypionate, Pfizer, São Paulo, Brasil; Szawka *et al.*, 2009) por 3 dias e óleo (0,2 mL/rata, s.c., Liza; Cargill, São Paulo, Brasil) no quarto dia; ou uma combinação de 3 dias de 17β -E₂ (10 µg/0,2 mL/rata, s.c., cipionato de E₂, Pfizer, São Paulo, Brasil; Szawka *et al.*, 2009) e P no quarto dia (grupo OVX + EP - 2,5 mg / 0,2 mL / rato, sc, Sigma, St Louis, MO, EUA), sendo que os animais foram submetidos aos protocolos experimentais no 4º dia de reposição hormonal (DE CARVALHO *et al.*, 2017; MARQUES *et al.*, 2015; SZAWKA *et al.*, 2009)

As fêmeas ovariectomizadas foram assim, separadas em três grupos: grupo 1 (OVX+O) controle, grupo 2 – castradas com reposição de estradiol (OVX+E₂), grupo 3 castradas com reposição de estradiol e progesterona (OVX+E₂P). As doses utilizadas são consideradas doses fisiológicas (SZAWKA *et al.*, 2009).

Todas as injeções foram realizadas subcutâneas no dorso às 8:00 horas da manhã. No dia do experimento, o esfregaço vaginal foi realizado. Os animais cuja reposição hormonal não foi eficiente apresentavam leucócitos na lâmina, não sendo utilizados para nossos experimentos. Os animais cuja reposição hormonal foi eficaz apresentavam células queratinizadas na lâmina.

Nos machos, parte dos animais permaneceu intacta e parte foi submetida à remoção dos testículos (orquidectomia bilateral). Através de uma incisão no escroto, o testículo foi retirado, e então uma ligadura foi realizada e em seguida a pele foi suturada.

2.1.2 Soluções e mistura gasosa utilizadas

As misturas gasosas de 7% CO₂, 21% O₂ em N₂ balanço e de 7% O₂ em N₂ e CO₂ basais foram adquiridas na White Martins (Sertãozinho, SP).

2.1.3 Determinação da fase do ciclo estral

Os esfregaços vaginais foram realizados diariamente para verificar a regularidade do ciclo estral e somente ratas que mostrarem pelo menos cinco ciclos de 4 ou 5 dias regulares foram incluídas neste estudo. O esfregaço vaginal foi realizado as 9:00 horas e imediatamente colocado sobre uma lâmina de vidro e analisado a fresco ao microscópio óptico

Foram examinadas as seguintes características: células epiteliais cornificadas, células epiteliais nucleadas e leucócitos. A fase do ciclo estral foi determinada utilizando os seguintes critérios: 1) proestro- predomínio de células epiteliais predominantemente nucleadas; 2) estro- predomínio de células epiteliais cornificadas predominantemente; 3) metaestro – predomínio de leucócitos com a presença de células nucleadas e cornificadas em menores proporções e 4) diestro- predominância de leucócitos (GOLDMAN; MURR; COOPER, 2007; MARQUES et al., 2015). Um ciclo estral regular consiste na observação sequencial de todas as fases.

2.2 Protocolos Experimentais

2.2.1 Efeito da castração na concentração de monoaminas

Inicialmente os animais foram colocados em caixas individuais vedadas com abertura nas duas laterais, onde foi acoplado uma entrada de ar e uma saída. As caixas

foram encapadas com papel contact branco, imitando a caixa em que eles normalmente vivem no biotério.

Uma vez nas caixas, os animais sofreram uma exposição gasosa de 1 hora ao ar ambiente. Após esta exposição inicial, um grupo foi mantido em ar ambiente, e os outros animais foram expostos à mistura gasosa hipercápnica (de 7% CO₂, 21% O₂ em N₂ balanço) ou hipóxica (de 7% O₂ em N₂ balanço) por mais uma hora. Após cada período de exposição, os animais foram decapitados para retirada e congelamento do encéfalo em isopentano (-50°C) por 1 min. Os encéfalos foram identificados e armazenados a -80°C para a posterior realização do punch e HPLC-ED (CRUZ et al., 2012).

Para a realização do punch, a porção posterior do encéfalo dos ratos e ratas foi fixada em um suporte e seccionado no criostato a uma temperatura de -20°C sendo as regiões de interesse, a saber MPA, LC e Rafe, removidos pela técnica de punch utilizando uma agulha de aço inoxidável com 0,6 mm de diâmetro interno (PALKOVITS, 1973). Para a localização da MPA, LC e Rafe que serviu como orientação para a realização do punch, usou-se as figuras do atlas de ratos (PAXINOS; FRANKLIN, 2007), em que identificamos elementos que serviram de guia, por exemplo, a MPA foi localizada através da observação do ventrículo lateral, que estava superior e separado do 3º ventrículo, que por sua vez estava centralizado, ao passo que não era mais possível observar o trato óptico. O LC foi identificado através da abertura do quarto ventrículo em que o cerebelo estava localizado acima do ventrículo, ponte e tronco cerebral, encontrados abaixo e era possível visualizar o nervo facial. A rafe caudal foi localizada ao longo da linha média ventral ao quarto ventrículo (caudal), no bulbo. Verificou-se que a extensão da MPA vai do Bregma -0,4 até -1,4 mm, -9,16 a -10,3 mm para o LC e -11,3 a -11,6 mm para os núcleos da Rafe caudal. Com base nessas coordenadas realizamos nossa microdissecção. Fotos exemplificando este processos podem ser observadas na figura 1 e 2.

A figura 1 mostra a microdissecção da região MPA e a figura 2 mostra a microdissecção do LC.

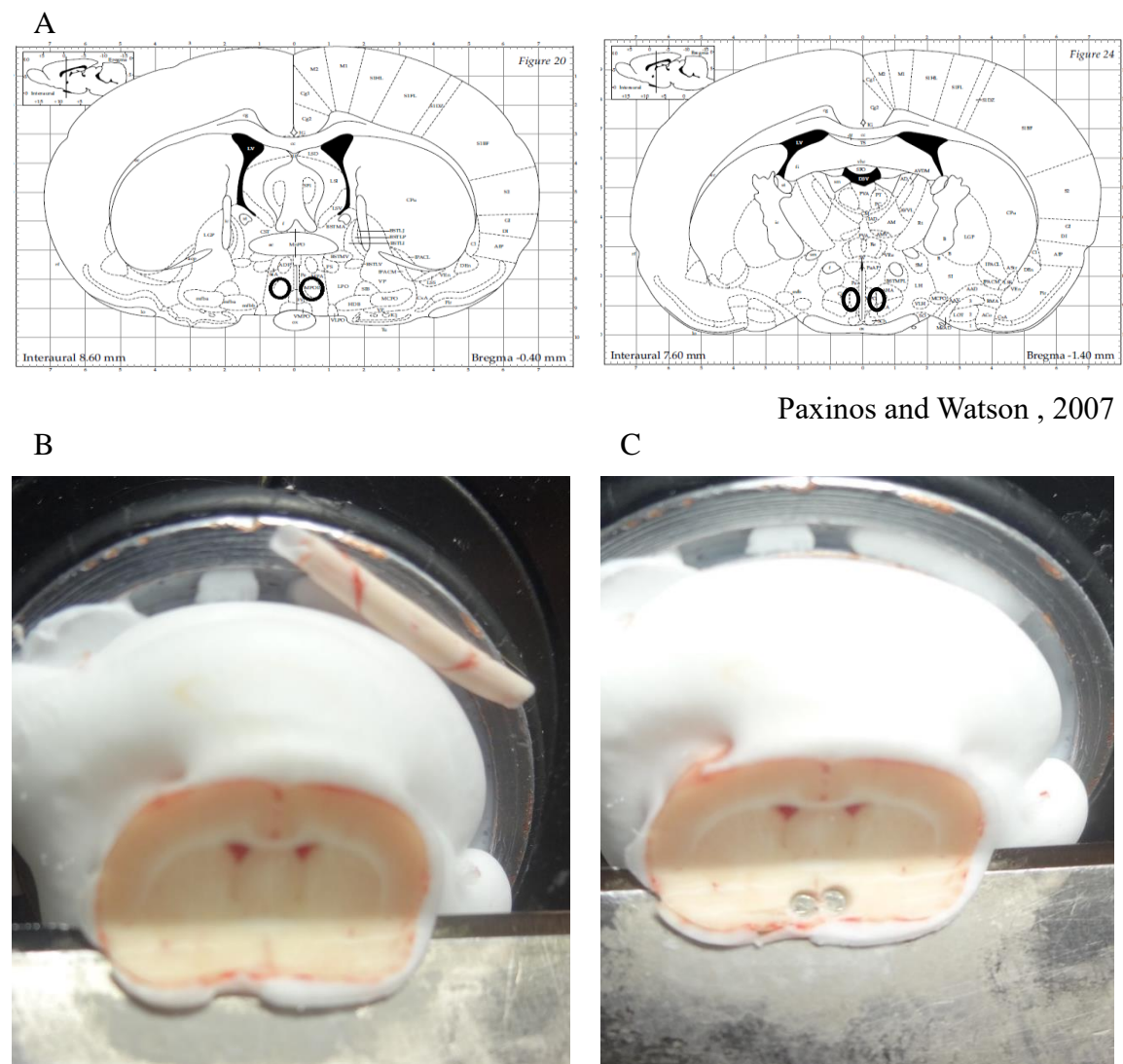


Fig. 1. (A) Diagrama esquemático da seção coronal que representa a localização da área pré-óptica medial (MPA), (B) fotografia de seção encefálica antes da microdissecção, em (C) é possível observar a seção após o procedimento.

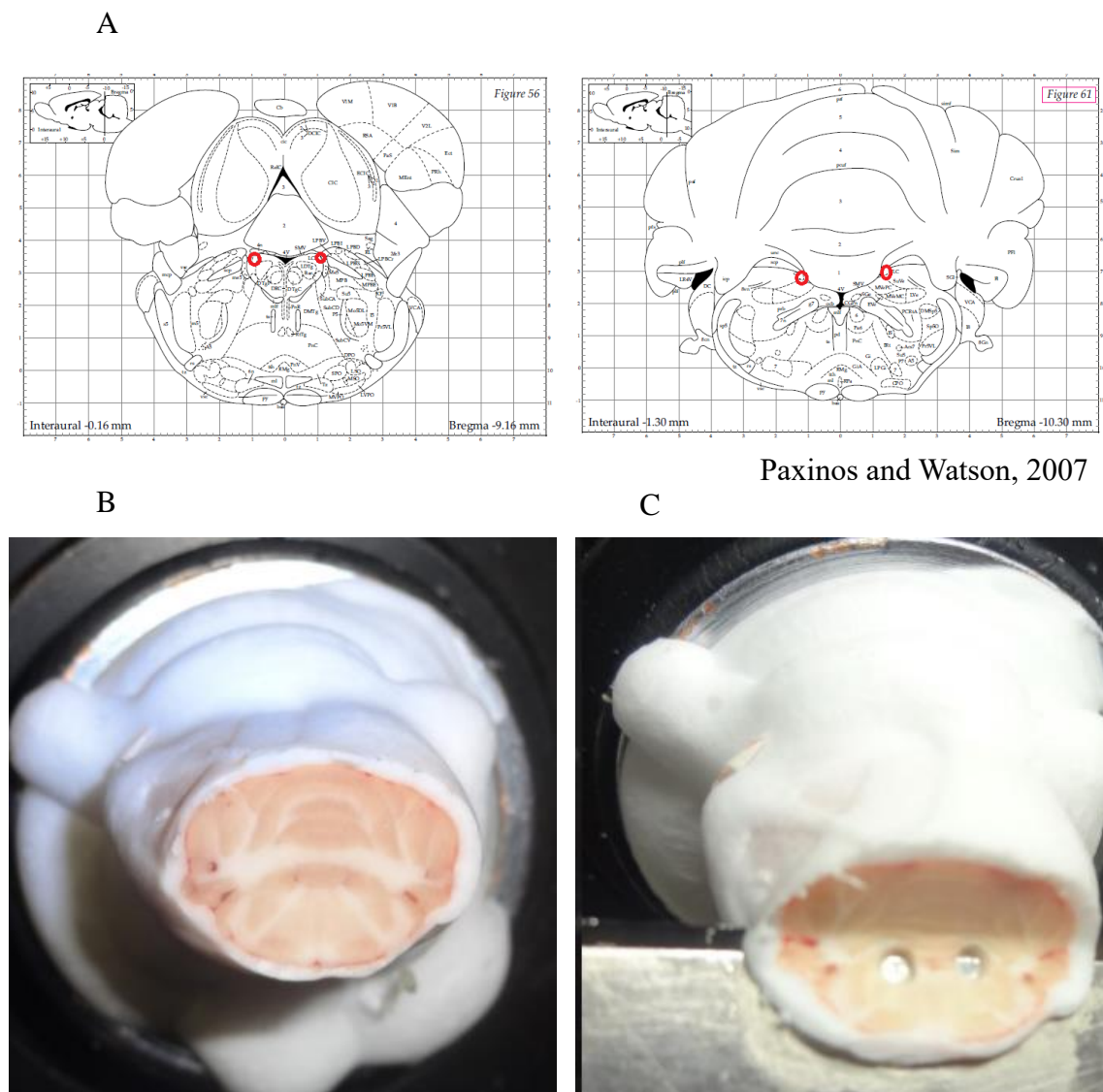


Fig 2. (A) Diagrama esquemático da seção coronal que representa a localização região do Locus Coeruleus (LC), (B) fotografia de seção cerebral antes da microdissecação, em (C) é possível observar a seção após o procedimento.

2.2.2 *Dosagem de monoaminas e seus metabólitos*

As concentrações de noradrenalina (NOR), serotonina (5-HT) e Dopamina (DA), assim como de seus metabólitos, MHPG, 5-HIAA e DOPAC respectivamente, foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector eletroquímico (HPLC-ED)

A atividade do neurotransmissor foi aferida pela razão metabólito/neurotransmissor uma vez que esta relação representa a síntese e degradação do neurotransmissor e portanto, sua utilização (BALDESSARINI, 1972; DALLA et al., 2008; KORF; AGHAJANIAN; ROTH, 1973).

2.2.3 *Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector eletroquímico (HPLC-ED)*

2.2.3.1 *Preparação das amostras*

As amostras receberam 150 μL de PCA (Ácido Percloroacético) 0,2M; 150 μL de EDTA 0,1mM e DHBA (Ácido 3,4-di-hidroxibenzóico) 0,4 ng/50 μL , foram homogeneizadas por ultrassom e centrifugadas por 20 minutos (12 rpm). O sobrenadante foi separado e filtrado por uma membrana de 0,22 μm , durapore (Millipore) e levado ao aparelho de HPLC – ED. A separação foi realizada em coluna de fase reversa C18 (Shim-pack VP-ODS, 5 μm , 250 X 4,6 mm; Shimadzu), precedida de pré-coluna C18 (Shim-pack VP-ODS, 5 μm , 10 X 4,6 mm; Shimadzu). A fase móvel foi preparada em água Millique (Millipore).

Para a dosagem de NA e MHPG a fase móvel foi constituída de NaH_2PO_4 100 mM, NaCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, ácido octanesulfônico de sódio 0,28 mM (Sigma), metanol 20% (Omnisolv, EMD Chemical Inc.) e pH 3,5, ajustado com H_3PO_4 .

Para a dosagem de 5-HT e 5-HIAA, a fase móvel foi composta de NaH_2PO_4 100 mM, NaCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, ácido octanesulfônico de sódio 0,2 mM, metanol 15% e pH 3,5.

Já a fase móvel utilizada para a análise da DA e DOPAC foi constituída de ácido cítrico 20 g; ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) 40 mg; ácido octanossulfônico 200 mg; 900 mL de água de miliQ; metanol 10%; pH ajustado em 4,0, posteriormente foi adicionado metanol até atingir-se uma concentração final de 10% (v/v)

O fluxo da bomba do HPLC foi de 0,5 mL/min e o potencial do detector eletroquímico, 0,6 V vs. in situ Ag/AgCl (Decade, VT-03 electrochemical flow cell; Antec Leyden). Os dados cromatográficos foram analisados utilizando-se o software Class-VP (Shimadzu). As monoaminas foram identificadas de acordo com seu tempo de eluição e quantificadas de acordo com a área do pico pelo método do padrão interno (DHBA, como padrão interno).

2.2.3.2 *Dosagem de proteína*

A quantidade de proteína foi usada para estimar a quantidade de massa do LC e MPA retirada no “punch”, esse valor corrigiu o valor obtido com o HPLC. As amostras foram dosadas utilizando-se o método de Bradford para dosagem de proteínas:

- Reagente de Bradford: dissolvido 100 mg do corante Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50 ml de etanol 95%, sendo adicionado a essa solução 100 mL de ácido fosfórico 85%, o volume foi completado para 1 litro com água Millique.

Foi usado como padrão Albumina Bovina (BSA) na concentração 2mg/mL que foi diluída para 1mg/mL. Foram feitas alíquotas do padrão (0; 2,5; 5; 7,5 e 10µg completando

para 100µL com água Milli que em duplicata) suficientes para fazer uma curva. Foi adicionado 1mL do corante de Bradford em seguida as amostras foram agitadas, após 5 minutos e levadas ao espectrofotômetro para serem lidas, formando uma curva que indicou qual diluição será usada para as amostras.

As amostras, contendo o precipitado de proteínas, receberam 150 µL de NaOH e foram homogeneizadas em ultrassom, em seguida receberam 1 mL de corante para serem lidas em espectrofotômetro após 5 minutos depois de colocado o corante.

2.3 *Análise de dados*

Para a quantificação das monoaminas os valores obtidos foram expressos como média ± Erro Padrão da Média (E.P.M). Os efeitos de castração e do gás foram analisados por ANOVA de dois fatores (medidas não repetidas), seguido pelo pós teste LSD Fisher. Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$. (PAOLICELLI et al., 2017). A análise estatística foi realizada utilizando o software de computador (GraphPad Prism versão 6.0 para Windows).

3 RESULTADOS

Foram realizados o punch e quantificação das monoaminas na área Pré-Optica medial (MPA), Locus Coeruleus (LC) e núcleos da Rafe, em 1) ratas nas diferentes fases do ciclo estral, 2) ratas OVX, 3) ratas OVX com suplementação hormonal de E₂, 4) ratos machos gônada-intactos, 5) ratos ORX. Os diferentes grupos foram submetidos uma hora de exposição gasosa à normocapnia seguida de uma hora adicional aos um dos tratamentos gasosos: ar ambiente, hipercapnia ou hipóxia.

3.1 *MPA: Avaliação das monoaminas nos diferentes grupos experimentais submetidos a exposição gasosa*

Os níveis de DOPAMINA e DOPAC foram indetectáveis, sugerindo, portanto, a baixa concentração ou a não presença deste. Portanto, apresentamos a quantificação de NOR, seu metabólito -MHPG, a relação MHPG/NOR e 5-HT, seu metabólito 5-HIAA e relação 5-HIAA/5HT. Os dados são apresentados em tabelas para cada estágio do ciclo estral durante a normóxia (tabela 1), hipercapnia ou hipóxia (tabela 2), comparando fêmeas intactas na fase Estro com animais OVX+O e OVX+E₂ em normocapnia (tabela 3) ou durante desafios gasosos (tabela 4) e machos intactos comparados com ORX em normóxia normocápica (tabela 5) ou durante exposições a hipercapnia ou hipóxia (Tabela 6). Além disso, os dados foram utilizados para avaliar o efeito do dimorfismo sexual na NOR, seu metabólito (MHPG) e a razão MHPG/NOR, 5-HT, seu metabólito (5-HIAA) e a relação de 5-HIAA/5-HT comparando Ratos machos intactos com fêmeas intactas na fase Estro. Apenas os resultados estatisticamente significativos foram representados nos gráficos. Uma tabela sistematizando os principais resultados encontrados na MPA, também foi apresentada (tabela 7).

3.1.1 *Efeito do ciclo estral nas concentrações de monoaminas na MPA*

Não houve diferenças significativas na quantificação das monoaminas analisadas, bem como seus metabólitos (NOR e MHPG, 5-HT e 5-HIAA) entre as fases do ciclo estral durante normóxia normocápica ou na relação (MHPG/NOR, 5-HIAA/5-HT).

Em hipercapnia, o metabólito da serotonina (5-HIAA) foi aumentado em 160% em ratos no Estro em comparação com a condição de normóxia normocápica. Animais em estro também apresentaram estatisticamente maior concentração de 5-HIAA quando comparado ao grupo diestro (103%, $p=0,01$) e proestro (160%, $p=0,02$). Animais em fase

de Estro também apresentaram maior relação 5-HIAA/5-HT durante a hipercapnia em comparação ao grupo que foi submetido a normóxia normocápnica (88% de aumento) e aumento da relação 5-HIAA/5-HT em relação ao grupo diestro (183% maior, $p = 0,01$) e proestro (240% maior, $p = 0,02$).

Em hipóxia a NOR foi aumentada em 64% em fêmeas na fase de Estro a quando comparado ao mesmo grupo em normóxia ($p=0,04$) (figura 3, lado esquerdo). Não foram observadas alterações no 5-HIAA comparando hipóxia e normóxia, nem entre os grupos, durante a condição de hipóxia (figura 3 - painel do meio do lado direito). Não foram observadas alterações de 5-HIAA/5-HT comparando hipóxia e normóxia, nem entre os grupos, durante a condição de hipóxia (figura 3 - painel inferior do lado direito).

Tabela 1. Comparação das concentrações de NOR e 5-HT, seus metabólitos (MHPG e 5-HIAA) e a relação entre eles (MHPG/NOR e 5HIAA/5-HT) entre as diferentes fases do ciclo estral depois de 2 horas em normóxia normocápnica (0% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço), **na MPA**.

<i>Normóxia</i>			
Concentração	Estro	Diestro	Proestro
NOR (ng/mg)	0,25 ± 0,04	0,30 ± 0,05	0,26 ± 0,03
MHPG (ng/mg)	2,00 ± 0,17	1,40 ± 0,47	2,47 ± 0,59
MHPG/NOR	9,01 ± 4,28	4,86 ± 0,96	6,65 ± 2,63
5-HT (ng/mg)	0,01 ± 0,004	0,03 ± 0,02	0,01 ± 0,0003
5-HIAA (ng/mg)	0,12 ± 0,04	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,01
5HIAA/5-HT	9,37 ± 2,54	9,62 ± 3,21	9,76 ± 1,06

Os resultados estão expressos em ± EPM. Os dados foram comparados utilizando-se ANOVA de uma via e não foram observadas diferenças estatisticamente significativa

Tabela 2. Comparação das concentrações de NOR e 5-HT, seus metabólitos (MHPG e 5-HIAA) e a relação entre eles (MHPG/NOR e 5HIAA/5-HT) entre as diferentes fases do ciclo estral depois de 1 hora em normóxia normocápica (0% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço) seguida por uma segunda hora de exposição ao desafio gasoso de hipercapnia (7% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço) ou hipóxia (0% CO₂, 7% O₂, N₂ balanço), **na MPA**.

Gás	Monoamina/concentração	Estro	Diestro	Proestro	Resultados ANOVA		
					Efeito do ciclo	Efeito do gás	Interação
Hipercapnia							
	NOR (ng/mg)	0,28 ± 0,04	0,32 ± 0,05	0,28 ± 0,05	P=0,54 F _(2,35) =0,61	P=0,64 F _(1,35) =0,22	n.s
	MHPG (ng/mg)	1,35 ± 0,26	1,68 ± 0,33	1,59 ± 0,24	P=0,38 F _(2,16) =1,02	P=0,15 F _(1,16) =2,29	n.s
	MHPG/NOR	8,80 ± 2,71	6,55 ± 0,38	5,01 ± 0,33	P=0,35 F _(2,10) =1,18	P=0,98 F _(1,10) =0,0004	n.s
	5-HT (ng/mg)	0,01 ± 0,004	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,00	P=0,23 F _(2,10) =1,71	P=0,84 F _(1,10) =0,04	n.s
	5-HIAA (ng/mg)	0,32 ± 0,06^{*†}	0,15 ± 0,02	0,12 ± 0,05	P=0,01 F_(2,15)=6,06	P=0,004 F_(1,15)=11,49	P=0,004 F_(2,15)=3,91
	5HIAA/5-HT	17,21 ± 0,62^{*†}	6,33 ± 1,48	5,20 ± 2,94	P=0,03 F_(2,15)=5,38	P=0,99 F _(1,15) =0,0005	P=0,022 F_(2,15)=6,01

Hipóxia

NOR (ng/mg)	0,41 ± 0,07*	0,29 ± 0,05	0,33 ± 0,04	P=0,75 F _(2,37) =0,28	P=0,10 F _(1,37) =2,83	n.s
MHPG (ng/mg)	1,38 ± 0,20	1,50 ± 0,35	1,88 ± 0,54	P=0,28 F _(2,15) =1,40	P=0,30 F _(1,15) =1,15	n.s
MHPG/NOR	5,58 ± 2,58	4,55 ± 1,41	6,37 ± 1,12	P=0,42 F _(2,12) =0,93	P=0,43 F _(1,12) =0,66	n.s
5-HT (ng/mg)	0,03 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01	P=0,94 F _(2,12) =0,06	P=0,40 F _(1,12) =0,78	n.s
5-HIAA (ng/mg)	0,09 ± 0,01	0,12 ± 0,04	0,07 ± 0,01	P=0,67 F _(2,18) =0,42	P=0,66 F _(1,18) =0,20	n.s
5HIAA/5-HT	11,02 ± 4,99†	5,39 ± 1,09	2,28 ± 0,56	P=0,012 F_(2,15)=6,002	P=0,17 F _(2,15) =1,93	n.s

Os dados são reportados como média ± EPM. * Significa diferença estatisticamente significativa em comparação com a condição normóxia. † significa estatisticamente significativa em comparação entre os grupos. Considerando P < 0,05. Os resultados de Anova se referem ao teste de duas vias, comparando a exposição gasosa a hipercapnia ou hipóxia com a condição de normóxia normocápnica.

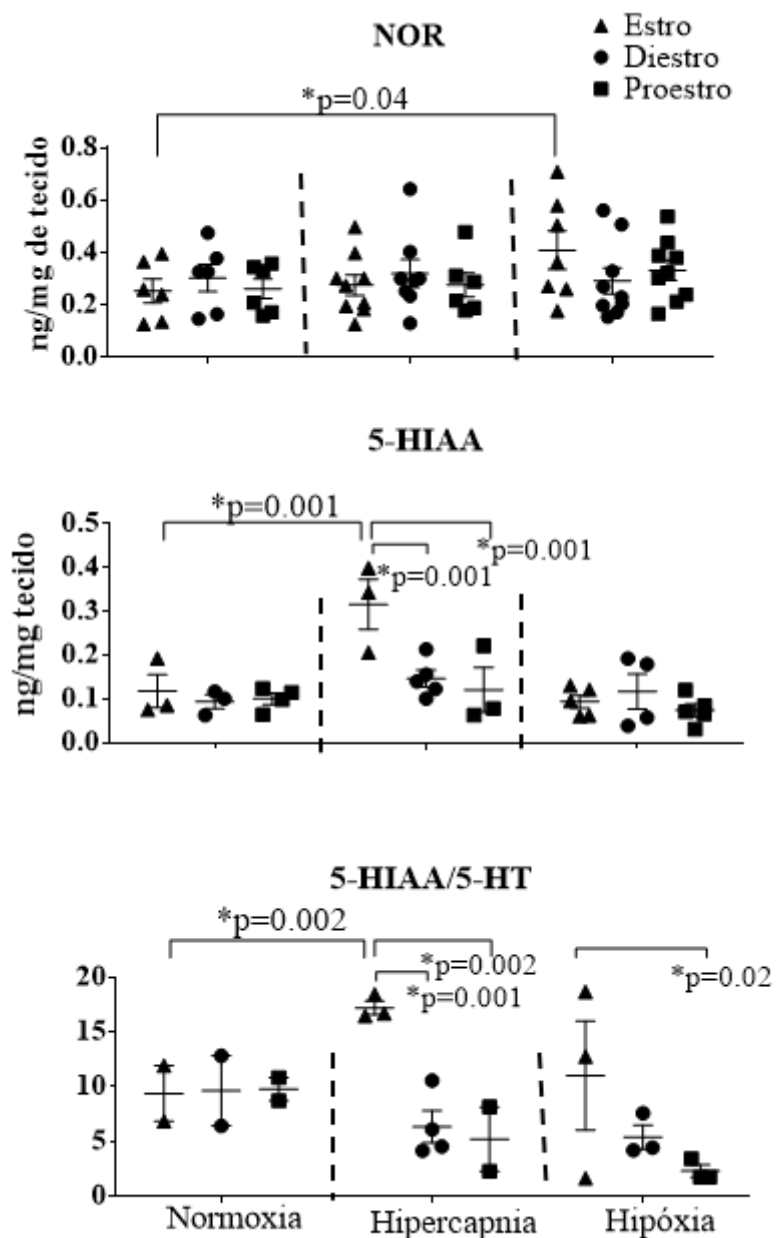


Fig. 3. Comparação das concentrações de NOR, 5-HT e 5-HIAA/5-HT entre as diferentes fases do ciclo estral em condições de normóxia normocápnica. (0% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço), hipercapnia (7% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço) ou hipóxia (0% CO₂, 7% O₂, N₂ balanço) na **MPA**. Cada ponto no gráfico representa o dado obtido de um animal, no gráfico é possível visualizar a média ± EPM. * Significa diferença estatisticamente significativa com P<0.05, quando houve diferença entre os pares, o valor de “p” foi reportado no gráfico.

3.1.2 Efeito da *ovariectomia* nas concentrações de monoaminas na MPA

Não houve diferenças significativas na quantificação das monoaminas analisadas e seus metabólitos (NOR e MHPG, 5-HT e 5-HIAA) entre os grupos Estro, OVX+O e OVX+E₂, nem na relação MHPG/NOR, 5-HIAA/5-HT em normóxia normocápnica (Figura 4). Hipercapnia e hipóxia não alteraram as concentrações de monoaminas entre os grupos OVX+O e OVX+E₂.

Por outro lado, as ratas OVX+O apresentaram menor concentração de 5-HIAA durante a hipercapnia quando comparados às fêmeas intactas no Estro (redução de 88%, $p=0,004$) (figura 4, painel médio do lado direito). Por fim, a relação 5-HIAA/5-HT foi 200% maior nos animais estro em comparação ao grupo ORX na condição de hipercapnia ($p<0,0001$). O grupo de reposição hormonal com estradiol não apresentou alteração nas concentrações de monoaminas e seus metabólitos quando comparado ao grupo OVX+O (figura 4, painel inferior do lado direito).

Em hipóxia, não foram encontradas diferenças significativas na quantificação das monoaminas analisadas bem como em seus metabólitos ou na relação entre eles, tanto no grupo ovariectomizado bem como na reposição hormonal (figura 4, painel inferior do lado direito).

Tabela 3. Comparação das concentrações de NOR e 5-HT, seus metabólitos (MHPG e 5-HIAA) e a relação entre eles (MHPG/NOR e 5HIAA/5-HT) entre o grupo intacto em estro e os grupos ovariectomizados sem ou com tratamento hormonal de estradiol em condições de 2 horas de normóxia normocápnica (0% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço) na **MPA**.

Normóxia			
Concentração	Estro	OVX+O	OVX+E ₂
NOR (ng/mg)	0,25 ± 0,04	0,34 ± 0,06	0,46 ± 0,07
MHPG (ng/mg)	2,00 ± 0,17	1,66 ± 0,26	1,82 ± 0,0
MHPG/NOR	9,01 ± 4,28	5,54 ± 76	7,92 ± 0,0
5-HT (ng/mg)	0,01 ± 0,004	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,004
5-HIAA (ng/mg)	0,12 ± 0,04	0,13 ± 0,06	0,15 ± 0,02
5HIAA/5-HT	9,37 ± 2,54	6,30 ± 1,44	6,67 ± 0,29

Os resultados estão expressos em ± EPM. Os dados foram comparados utilizando-se ANOVA de uma via e não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 4. Comparação das concentrações de NOR e 5-HT, seus metabólitos (MHPG e 5-HIAA) e a relação entre eles (MHPG/NOR e 5HIAA/5-HT) entre o grupo intacto em estro e os grupos ovariectomizados sem ou com tratamento hormonal de estradiol, depois de 1 hora em normóxia normocápnica (0% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço) seguida por uma segunda hora de exposição ao desafio gasoso de hipercapnia (7% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço) ou hipóxia (0% CO₂, 7% O₂, N₂ balanço) na **MPA**.

Gás	Monoamina/concentração	Estro	Diestro	Proestro	Resultados ANOVA (comparação com grupo normóxia)		
					Efeito do ciclo	Efeito do gás	Interação
Hipercapnia							
	NOR (ng/mg)	0,28 ± 0,04	0,42 ± 0,09	0,47 ± 0,07	P=0,15 F _(2,39) =1,99	P=0,88 F _(1,39) =0,02	n.s
	MHPG (ng/mg)	1,35 ± 0,26	1,71 ± 0,60	0,90 ± 0,006	P=0,80 F _(2,14) =0,23	P=0,20 F _(1,39) =1,84	n.s
	MHPG/NOR	8,80 ± 2,71	4,82 ± 1,19	4,01 ± 0,72	P=0,67 F _(2,17) =0,41	P=0,94 F _(1,17) =0,005	n.s
	5-HT (ng/mg)	0,01 ± 0,004	0,03 ± 0,003	0,02 ± 0,01	P=0,10 F _(2,11) =2,77	P=0,51 F _(1,11) =0,46	n.s
	5-HIAA (ng/mg)	0,32 ± 0,06^{**}	0,17 ± 0,04	0,16 ± 0,04	P=0,24 F _(2,13) =1,57	P=0,049 F_(1,13)=4,69	n.s
	5HIAA/5-HT	17,21 ± 0,62^{**}	5,94 ± 0,68	6,92 ± 0,44	P=0,0001 F_(2,9)=30,26	P=0,013 F_(1,9)=9,54	P=0,005 F_(2,9)=10,07

Hipóxia

NOR (ng/mg)	0,41 ± 0,07*	0,42 ± 0,06	0,47 ± 0,07	P=0,66 F _(2,37) =0,41	P=0,55 F _(1,37) =0,36	P=0.03 F_(2,37)=3.73
MHPG (ng/mg)	1,38 ± 0,20	1,71 ± 0,60	1,53 ± 0,25	P=0,92 F _(2,14) =0,08	P=0,47 F _(1,14) =0,55	n.s
MHPG/NOR	5,58 ± 2,58	3,72 ± 0,91	5,99 ± 1,49	P=0,39 F _(2,11) =1,02	P=0,22 F _(1,11) =1,76	n.s
5-HT (ng/mg)	0,03 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	P=0,69 F _(2,16) =0,37	P=0,33 F _(1,16) =0,98	n.s
5-HIAA (ng/mg)	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,09 ± 0,01	P=0,82 F _(2,19) =0,19	P=0,12 F _(1,19) =2,70	n.s
5HIAA/5-HT	11,02 ± 4,99	4,91 ± 1,31	4,66 ± 1,53	P=0,15 F _(2,13) =2,16	P=0,77 F _(1,13) =0,09	n.s

Os dados são reportados como média ± EPM. * Significa diferença estatisticamente significativa em comparação com a condição normóxia. † significa estatisticamente significativa em comparação entre os grupos. Considerando P < 0,05. Os resultados de Anova se referem ao teste de duas vias, comparando a exposição gasosa a hipercapnia ou hipóxia com a condição de normóxia normocápnica.

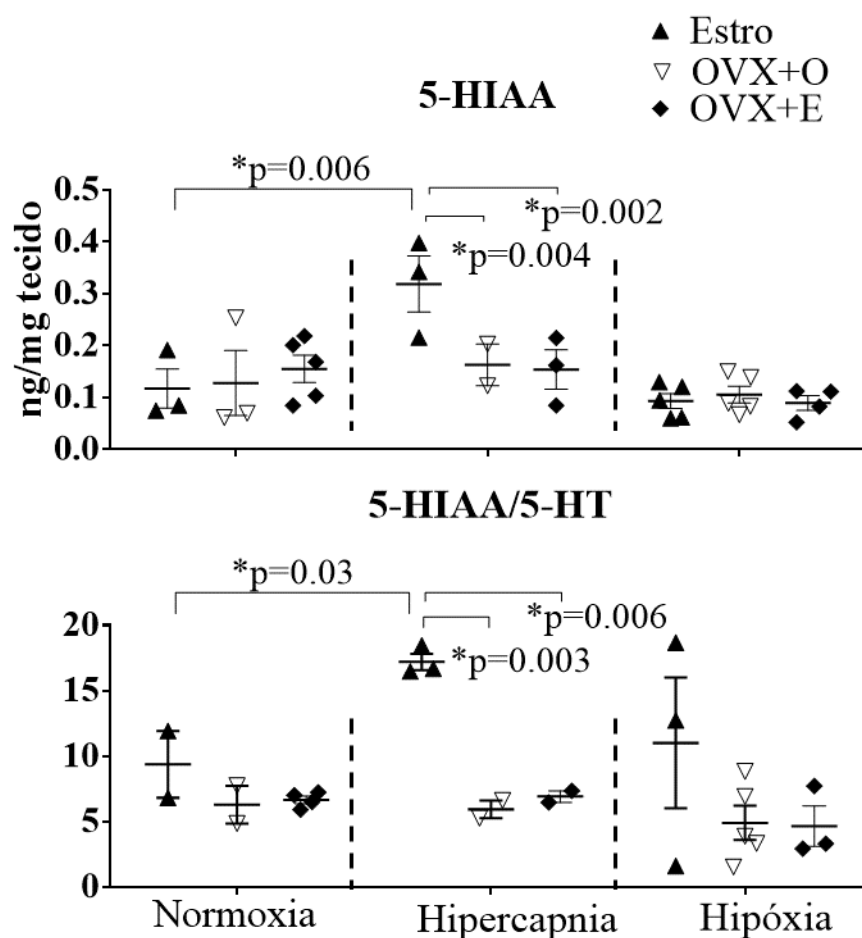


Fig. 4. Comparação das concentrações 5-HIAA e 5HIAA/5-HT entre o grupo intacto em estro e os grupos ovariectomizados sem ou com tratamento hormonal de estradiol em condições de normóxia normocápnica (0% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço), hipercapnia (7% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço) ou hipóxia (0% CO₂, 7% O₂, N₂ balanço) na **MPA**. Cada ponto no gráfico representa o dado obtido de um animal, no gráfico é possível visualizar a média ± EPM. * Significa diferença estatisticamente significativa com P<0.05, quando houve diferença entre os pares, o valor de “p” foi reportado no gráfico.

3.1.3 Efeito da *orquidectomia* nas concentrações de monoaminas na MPA

Ratos ORX apresentaram um aumento de 70% nas concentrações de NOR em relação ao grupo intacto ($p=0,02$) em normóxia normocápnica. Em hipercapnia, não foram encontradas diferenças significativas na quantificação das monoaminas analisadas bem como em seus metabólitos ou na relação entre eles, tanto no grupo intacto quanto no grupo ORX (figura 5, painel inferior do lado direito).

Não foram observadas alterações na razão MHPG, MHPG/NOR, 5-HT, 5-HIAA nem 5-HIAA/5HT, comparando os animais Intacto aos ORX sob condições de normóxia normocápnica, hipercapnia ou hipóxia (Figura 4, painéis de ambos os lados). Por outro lado, animais intactos apresentam aumento de 180% da NOR durante exposição à hipóxia quando comparados ao grupo submetido a normóxia normocápnica ($p = 0,04$), enquanto que animais ORX não apresentam alteração na concentração de NOR influenciada pelo desafio hipóxico (Figura 5, painel superior do lado esquerdo).

Tabela 5. Comparação das concentrações de NOR e 5-HT, seus metabólitos (MHPG e 5-HIAA) e a relação entre eles (MHPG/NOR e 5HIAA/5-HT) entre machos do grupo gônada-intacto e ORX em condições de 2 horas de normóxia normocápnica (0% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço) na MPA.

Concentração	Normóxia	
	Intacto	ORX
NOR (ng/mg)	0,27 ± 0,02[†]	0,46 ± 0,09
MHPG (ng/mg)	1,28 ± 0,05	1,99 ± 0,35
MHPG/NOR	6,00 ± 2,00	6,71 ± 2,30
5-HT (ng/mg)	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01
5-HIAA (ng/mg)	0,09 ± 0,01	0,12 ± 0,02
5HIAA/5-HT	6,65 ± 1,93	6,63 ± 3,39

Os dados são reportados como média ± EPM. † significa estatisticamente significativa em comparação entre os grupos. Considerando $P < 0,05$.

Tabela 6. Comparação das concentrações de NOR e 5-HT, seus metabólitos (MHPG e 5-HIAA) e a relação entre eles (MHPG/NOR e 5HIAA/5-HT) entre machos do grupo gônada-intacto e ORX em condições de 1 hora de normóxia normocápnica (0% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço) seguida por uma segunda hora de exposição a hipercapnia (7% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço) ou hipóxia (0% CO₂, 7% O₂, N₂ balanço) na **MPA**.

Gás	Monoamina/concentração	INTACTO	ORX	Resultados de ANOVA		
				Efeito da castração	Efeito do gás	Interação
Hipercapnia						
	NOR (ng/mg)	0,27 ± 0,02	0,34 ± 0,03	P=0,01 F_(1,28)=6,28	P=0,23 F _(1,28) =1,48	n,s
	MHPG (ng/mg)	1,76 ± 0,38	1,21 ± 0,56	P=0,86 F _(1,9) =0,03	P=0,76 F _(1,9) =0,09	n,s
	MHPG/NOR	11,30 ± 4,18	3,22 ± 1,61	P=0,44 F _(1,10) =0,63	P=0,85 F _(1,10) =0,04	n,s
	5-HT (ng/mg)	0,01 ± 0,004	0,03 ± 0,008	P=0,28 F _(1,9) =1,35	P=0,23 F _(1,9) =1,66	n,s
	5-HIAA (ng/mg)	0,14 ± 0,03	0,09 ± 0,01	P=0,73 F _(1,15) =0,12	P=0,58 F _(1,15) =0,31	n,s
	5HIAA/5-HT	9,83 ± 1,78	7,90 ± 2,01	P=0,17 F _(1,9) =0,36	P=0,36 F _(1,9) =0,89	n,s

Hipóxia

NOR (ng/mg)	0,49^{*†} ± 0,07	0,42 ± 0,08	P=0,42 F _(1,27) =0,66	P=0,21 F _(1,27) =1,61	n,s
MHPG (ng/mg)	1,71 ± 0,40	1,81 ± 0,06	P=0,67 F _(1,8) =0,19	P=0,17 F _(1,8) =2,19	n,s
MHPG/NOR	3,13 ± 0,93	8,13 ± 0,43	P=0,68 F _(1,9) =0,18	P=0,13 F _(1,9) =2,77	n,s
5-HT (ng/mg)	0,02 ± 0,001	0,03 ± 0,006	P=0,85 F _(1,8) =0,04	P=0,09 F _(1,8) =3,67	n,s
5-HIAA (ng/mg)	0,08 ± 0,02	0,11 ± 0,01	P=0,47 F _(1,15) =0,54	P=0,08 F _(1,15) =3,66	n,s
5HIAA/5-HT	7,35 ± 2,14	3,90 ± 1,25	P=0,47 F _(1,8) =0,56	P=0,67 F _(1,8) =0,19	n,s

Os dados são reportados como média ± EPM. * Significa diferença estatisticamente significativa em comparação com a condição normóxia. † significa estatisticamente significativa em comparação entre os grupos. Considerando P < 0,05. Os resultados de ANOVA se referem ao teste de duas vias, comparando a exposição gasosa a hipercapnia ou hipóxia com a condição de normóxia normocápnica.

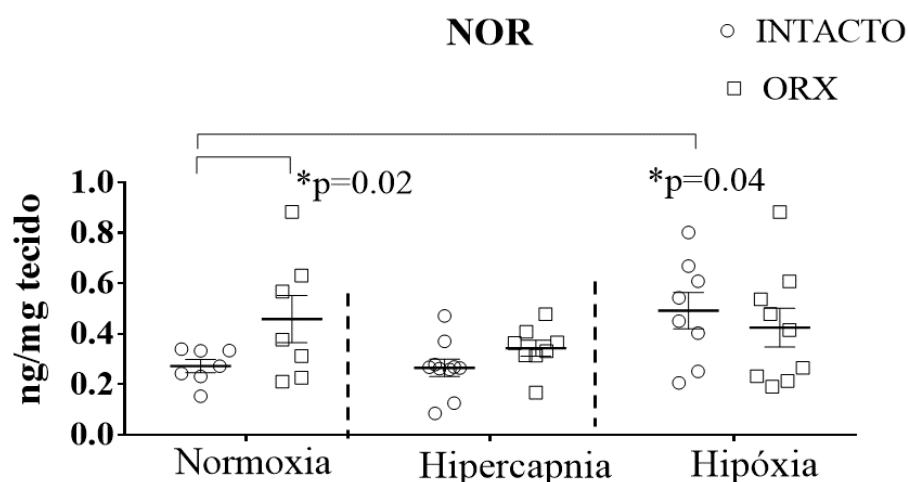


Fig. 5. Comparação das concentrações de NOR entre machos do grupo gônada-intacto e ORX em condições de normóxia normocápnica (0% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço), hipercapnia (7% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço) ou hipóxia (0% CO₂, 7% O₂, N₂ balanço) na MPA. Cada ponto no gráfico representa o dado obtido de um animal, no gráfico é possível visualizar a média ± EPM. * Significa diferença estatisticamente significativ com P<0.05, quando houve diferença entre os pares, o valor de “p” foi reportado no gráfico.

3.1.4 Efeito do sexo nas concentrações de monoaminas na MPA

Comparando machos intactos com fêmeas intactas durante o Estro, observamos dimorfismo sexual nas concentrações de 5HIAA e 5HIAA/5HT apenas em resposta à exposição à hipercapnia, uma vez que o 5HIAA foi aumentado em 128% comparando fêmeas em estro com machos intactos (p=0,0004) a relação 5HIAA/5HT foi aumentada em 75% (p = 0,001, figura 6).

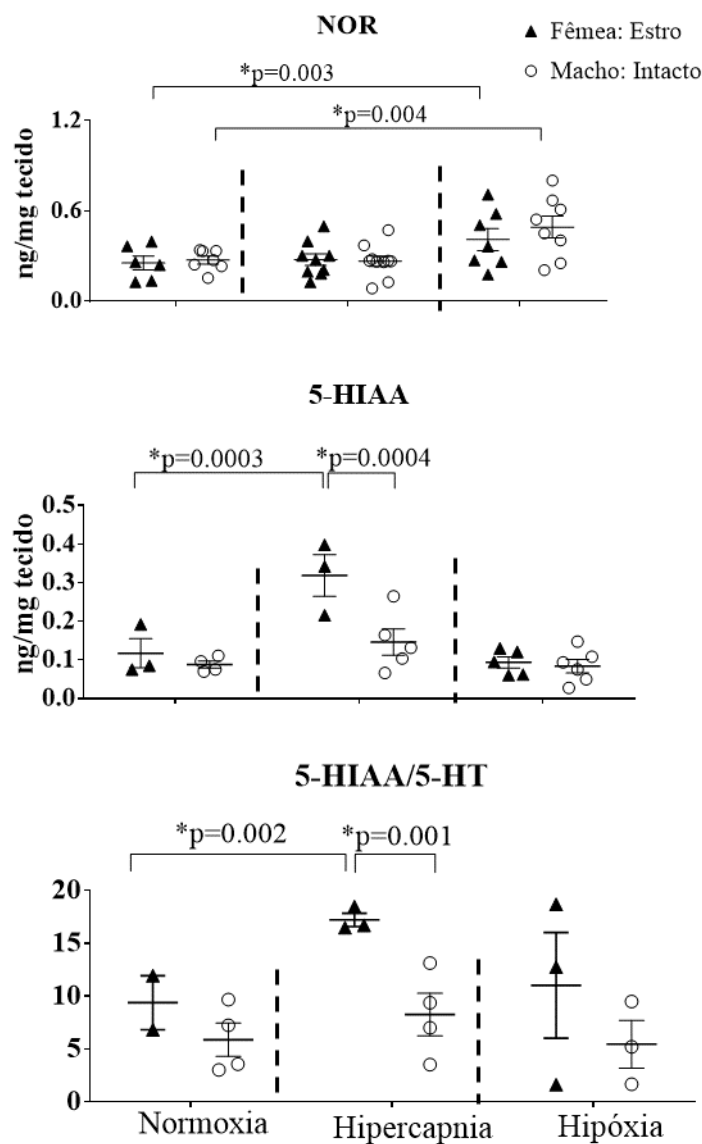


Fig. 6. Comparação das concentrações de NOR, 5-HIAA e na relação 5HIAA/5-HT entre fêmeas em Estro e machos gônada-intacto em condições de normóxia normocápnica (0% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço), hipercapnia (7% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço) ou hipóxia (0% CO₂, 7% O₂, N₂ balanço) na **MPA**. Cada ponto no gráfico representa o dado obtido de um animal, no gráfico é possível visualizar a média ± EPM. *Significa diferença estatisticamente significativa com P<0.05, quando houve diferença entre os pares, o valor de “p” foi reportado no gráfico.

3.1.5 Sistematização dos principais resultados encontrados nas concentrações de monoaminas na MPA

Uma tabela com a sistematização dos principais resultados pode ser observada a seguir. Usamos fêmeas na fase Estro como grupo de comparação para as demais fases do ciclo estral (Estro vs Fases do ciclo), em comparação a fêmeas castradas (Efeito da OVX) e com machos intactos (Estro vs macho intacto), machos intactos também foram comparados com o grupo ORX (Intacto vs ORX).

Tabela 7. Tabela sintetizando os principais resultados referentes as concentrações de monoaminas na MPA.

Região	Gás	Estro vs Fases do ciclo	Efeito da OVX	Intacto vs ORX	Estro vs Macho intacto
MPA					
	Normocapnia normóxica			↑NOR	
	Hipóxia	↓5-HIAA/5-HT			
	Hipercapnia	↓ 5-HIAA, ↓ 5-HIAA/5-HT	↓5-HIAA, ↓5-HIAA/5-HT		↓5-HIAA, ↓5-HIAA/5-HT

A seta ↑ indica aumento, a seta ↓ indica diminuição.

Em resumo, as fases Proestro e Diestro possuem concentrações menores de 5-HIAA/5-HT em comparação ao grupo Estro durante a exposição a hipóxia. O grupo estro apresentou concentrações maiores de 5-HIAA e 5-HIAA/5-HT em comparação com os demais grupos em diferentes fases do ciclo estral, em comparação a fêmeas OVX e machos intactos em hipercapnia. Machos ORX apresentaram maior concentração de NOR na MPA comparados a animais intactos.

3.2 *LC: Avaliação das monoaminas nos diferentes grupos experimentais submetidos a exposição gasosa*

Por razões metodológicas, não conseguimos quantificar os níveis de MHPG no LC. Portanto, apresentamos a quantificação de NOR, 5-HT, seu metabólito 5-HIAA, a relação 5-HIAA/5HT, DA, seu metabólito DOPAC e a relação DOPAC/DA. Os dados são apresentados em tabelas para cada estágio do ciclo estral durante a normóxia (tabela 8), hipercapnia ou hipóxia (tabela 9), comparando fêmeas intactas na fase Estro com animais OVX+O e OVX+E₂ em normóxia normocápnica (tabela 10) ou durante desafios gasosos (tabela 11) e machos intactos comparados com ORX em normóxia normocápnica (tabela 12) ou durante exposições a hipercapnia ou hipóxia (Tabela 13). Além disso, os dados foram utilizados para avaliar o efeito do dimorfismo sexual na comparando Ratos machos intactos com fêmeas intactas (na fase Estro). Apenas os resultados estatisticamente significativos foram representados nos gráficos. Uma tabela sistematizando os principais resultados encontrados no LC, também foi apresentada (tabela 14).

3.2.1 *Efeito do ciclo estral nas concentrações de monoaminas no LC*

Não houve diferenças significativas na quantificação das monoaminas analisadas, bem como seus metabólitos ou na relação entre eles (NOR, DA, DOPAC, DOPAC/DA, 5-HT e 5-HIAA) entre as fases do ciclo estral durante normóxia normocápnica (MHPG/NOR, 5-HIAA/5-HT).

Em hipercapnia, o metabólito da serotonina (5-HIAA) foi aumentado em 60% em ratas no Diestro em comparação com o grupo em condição de normóxia normocápnica ($p=0,028$). Animais em diestro também apresentaram estatisticamente maior concentração de 5-HIAA quando comparado ao grupo estro (57%, $p=0,017$) e proestro (73%, $p=0,035$).

Animais em fase de Proestro apresentaram maior relação 5-HIAA/5-HT durante a hipercapnia em comparação ao grupo normóxia normocápnica (183% de aumento). Em hipóxia a NOR em fêmeas na fase de Estro estava significativamente maior quando comparada a fase Diestro (157%, $p=0,04$) (figura 7).

Não foram observadas alterações nas concentrações de 5-HT, 5-HIAA ou na relação 5-HIAA/5-HT, nem entre os grupos, durante a condição de hipóxia, comparada com a normóxia (figura 7), entretanto, a DA e DOPAC em animais na fase de Estro estava significativamente maior em hipóxia comparado aos animais na mesma condição gasosa nas outras fases do ciclo estral. Curiosamente a relação DOPAC/DA não se alterou em nenhum grupo frente a exposição hipóxica.

Tabela 8. Comparação das concentrações de NOR, DA, 5-HT e os metabólitos 5-HIAA e DOPAC e a relação entre eles (5HIAA/5-HT, DOPAC/DA) entre as diferentes fases do ciclo estral depois de 2 horas em normóxia normocápnica (0% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço), no LC.

Concentração	Normóxia		
	Estro	Diestro	Proestro
NOR (ng/mg)	0,23 ± 0,07	0,24 ± 0,03	0,22 ± 0,05
DA (ng/mg)	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,007	0,04 ± 0,001
DOPAC (ng/mg)	0,04 ± 0,01	0,01 ± 0,004	0,03 ± 0,008
DOPAC/DA	0,63 ± 0,26	0,33 ± 0,08	0,71 ± 0,17
5-HT (ng/mg)	0,055 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,01
5-HIAA (ng/mg)	0,20 ± 0,05	0,23 ± 0,05	0,19 ± 0,03
5HIAA/5-HT	3,92 ± 0,91	6,49 ± 1,30	2,74 ± 0,39

Os resultados estão expressos em \pm EPM. Os dados foram comparados utilizando-se ANOVA de uma via e não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 9. Comparação das concentrações de NOR, DA, 5-HT e os metabólitos 5-HIAA e DOPAC e a relação entre eles (5HIAA/5-HT, DOPAC/DA) entre as diferentes fases do ciclo estral depois de 1 hora em normóxia normocápnica (0% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço) seguida por uma segunda hora de exposição ao desafio gasoso de hipercapnia (7% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço) ou hipóxia (0% CO₂, 7% O₂, N₂ balanço) no LC.

Gás	Monoamina/ concentração	Estro	Diestro	Proestro	Resultados de ANOVA (comparação com o grupo normóxia)		
					Efeito da castração	Efeito do gás	Interação
Hipercapnia							
	NOR (ng/mg)	0,24 ± 0,04	0,30 ± 0,06	0,24 ± 0,03	P=0,74 F _(2,35) =0,30	P=0,49 F _(1,35) =0,47	n.s.
	DA (ng/mg)	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,01	P=0,46 F _(2,31) =0,79	P=0,31 F _(1,31) =1,05	n.s.
	DOPAC (ng/mg)	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,00	P=0,33 F _(2,27) =1,1	P=0,42 F _(1,27) =0,67	n.s.
	DOPAC/DA	0,62 ± 0,18	0,69 ± 0,17	0,40 ± 0,06	P=0,77 F _(2,26) =0,26	P=0,92 F _(1,26) =0,001	n.s.
	5-HT (ng/mg)	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,03 ± 0,01	P=0,55 F _(2,35) =0,59	P=0,44 F _(1,35) =0,59	n.s.
	5-HIAA (ng/mg)	0,21 ± 0,02	0,33*† ± 0,04	0,19 ± 0,02	P=0,14 F_(1,35)=2,01	P=0,17 F_(1,35)=1,9	n.s.
	5HIAA/5-HT	5,61 ± 0,83	6,39 ± 1,66	7,78 ± 2,09	P=0,88 F _(2,33) =0,42	P=0,06 F _(1,33) =3,79	n.s.

Hipóxia

NOR (ng/mg)	0,33 ± 0,03	0,21 ± 0,03	0,23 ± 0,03	P=0,25 F _(2,38) =1,31	P=0,44 F _(1,38) =0,60	n.s.
DA (ng/mg)	0,10*† ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	P=0,03 F_(2,35)=3,39	P=0,38 F_(1,35)=5,51	n.s.
DOPAC (ng/mg)	0,07*† ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	P=0,001 F_(2,30)=5,43	P=0,04 F_(1,30)=4,75	n.s.
DOPAC/DA	0,72 ± 0,11	0,61 ± 0,24	0,65 ± 0,17	P=0,47 F _(2,31) =0,77	P=0,53 F _(1,31) =0,40	n.s.
5-HT (ng/mg)	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	P=0,85 F _(2,38) =0,15	P=0,79 F _(1,38) =0,06	n.s.
5-HIAA (ng/mg)	0,23 ± 0,03	0,16 ± 0,03	0,18 ± 0,03	P=0,53 F _(2,35) =0,64	P=0,86 F _(1,35) =0,03	n.s.
5HIAA/5-HT	4,07 ± 0,93	3,76 ± 0,95	2,82 ± 0,50	P=0,07 F _(2,35) =2,87	P=0,29 F _(1,35) =1,11	n.s.

Os dados são reportados como média ± EPM. * Significa diferença estatisticamente significativa em comparação com a condição normóxia.

†significa estatisticamente significativa em comparação entre os grupos. Considerando P <0,05. Os resultados de Anova se referem ao teste de duas vias, comparando a exposição gasosa a hipercapnia ou hipóxia com a condição de normóxia normocápnica.

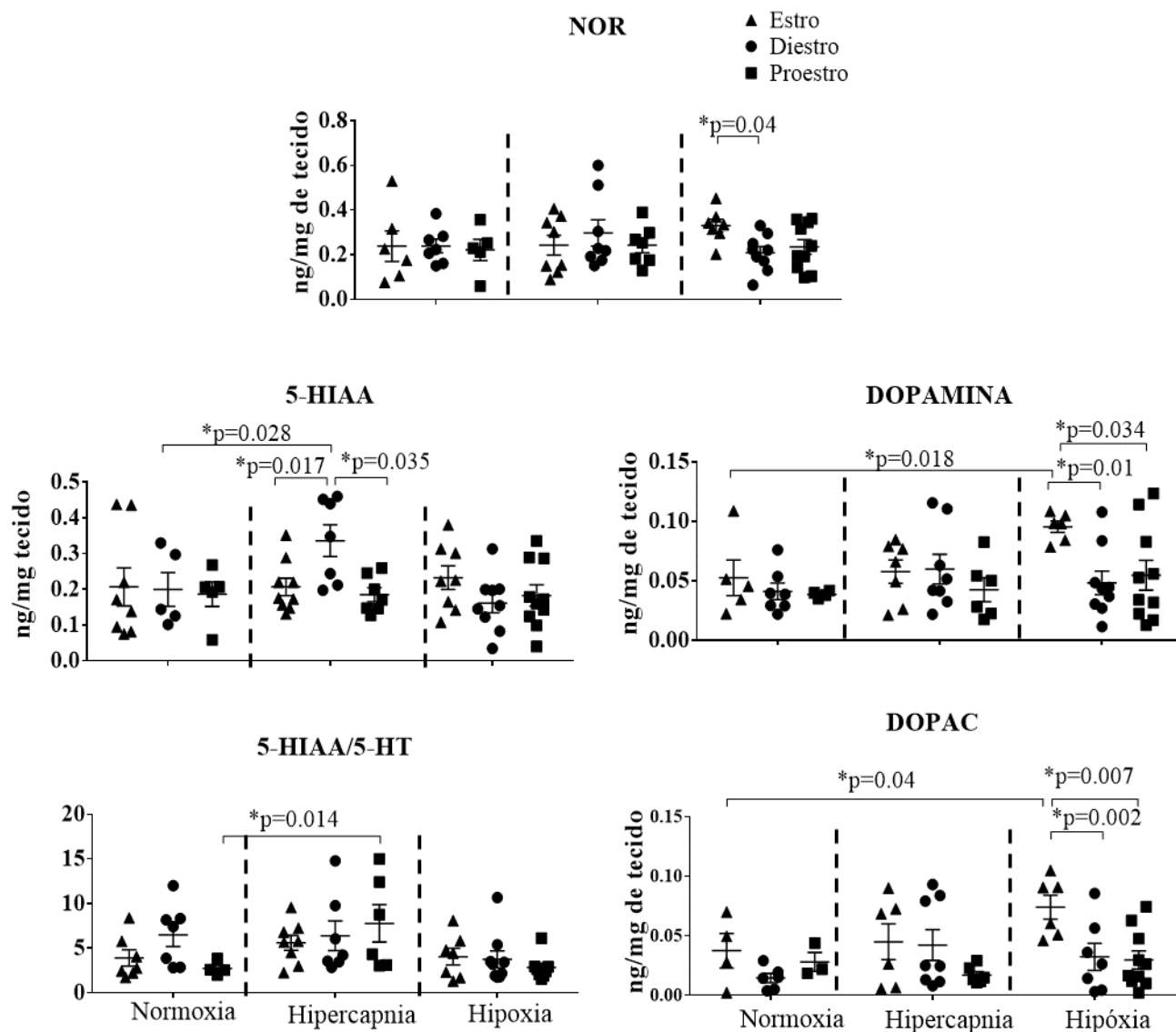


Fig. 7. Comparação das concentrações de NOR, 5-HT e Dopamina e seus metabólitos (5-HIAA e Dopac) e a relação entre eles (5HIAA/5-HT e DOPAC/DOPA) entre as diferentes fases do ciclo estral em condições de normóxia normocápnica (0% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço), hipercapnia (7% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço) ou hipóxia (0% CO₂, 7% O₂, N₂ balanço) no LC. Cada ponto no gráfico representa o dado obtido de um animal, no gráfico é possível visualizar a média ± EPM.* Significa diferença estatisticamente significativa com P<0.05, quando houve diferença entre os pares, o valor de “p” foi reportado no gráfico.

3.2.2 *Efeito da ovariectomia nas concentrações de monoaminas no LC*

Não houve diferenças significativas na quantificação das monoaminas analisadas, bem como seus metabólitos (NOR, DA, DOPAC, 5-HT e 5-HIAA) comparando-se os grupos OVX+O, OVX+E₂ com o grupo intacto em normóxia normocápnica. Também não foram observadas diferenças na relação 5HIAA/5-HT. Entretanto, no grupo OVX+O observou-se um valor significativamente maior na relação DOPAC/DA em normóxia normocápnica comparando-se aos demais grupos.

Em hipercapnia, não houve diferenças significativas na quantificação das monoaminas analisadas NOR, 5-HT, DA, nem no metabólito 5-HIAA ou nas relações DOPAC/DA, 5-HIAA/5-HT comparando-se os grupos OVX+O, OVX+E₂ com o grupo intacto em estro. No entanto, o metabólito da DA, o DOPAC, estava 333% maior em ratas OVX+E₂ em comparação com o grupo OVX+O e 250% em comparação com o grupo Estro (figura 8).

Em hipóxia, não foram observadas alterações das monoaminas analisadas, bem como seus metabólitos (NOR, DA, DOPAC, 5-HT e 5-HIAA) comparando-se os grupos OVX+O, OVX+E₂ com o grupo intacto em estro. Curiosamente, foi observada uma diminuição apresentando diferença estatisticamente significativa na relação 5-HIAA/5-HT do grupo OVX+O comparando o tratamento de hipóxia com o mesmo grupo em normóxia. Adicionalmente, o grupo OVX+E, apresentou um aumento estatisticamente significativo na relação DOPAC/DA (figura 8).

Tabela 10. Comparação das concentrações de NOR, DA, 5-HT e os metabólitos 5-HIAA e DOPAC e a relação entre eles (5HIAA/5-HT, DOPAC/DA) entre o grupo intacto em estro e os grupos ovariectomizados sem ou com tratamento hormonal de estradiol em condições de 2 horas de normóxia normocápnica (0% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço) , no LC..

Normóxia			
Concentração	Estro	OVX+O	OVX+E ₂
NOR (ng/mg)	0,24 ± 0,07	0,23 ± 0,03	0,23 ± 0,04
DA (ng/mg)	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01
DOPAC (ng/mg)	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,02
DOPAC/DA	0,63 ± 0,27	0,62 ± 0,24	0,32 ± 0,13
5-HT (ng/mg)	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,07 ± 0,02
5-HIAA (ng/mg)	0,21 ± 0,05	0,22 ± 0,04	0,19 ± 0,04
5HIAA/5-HT	3,92 ± 0,91	7,85† ± 1,73	2,82 ± 0,69

Os resultados estão expressos em ± EPM. Os dados foram comparados utilizando-se ANOVA de uma via † significa diferença estatisticamente significativa em comparação entre os grupos. Considerando P <0,05.

Tabela 11. Comparação das concentrações de NOR, DA, 5-HT e os metabólitos 5-HIAA e DOPAC e a relação entre eles (5HIAA/5-HT, DOPAC/DA) entre as diferentes fases do ciclo estral depois de 1 hora em normóxia normocápnica (0% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço) seguida por uma segunda hora de exposição ao desafio gasoso de hipercapnia (7% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço) ou hipóxia (0% CO₂, 7% O₂, N₂ balanço) , no LC.

Gás	Monoamina/ concentração	Estro	OVX+O	OVX+E ₂	Resultados de ANOVA		
					Efeito da castração	Efeito do gás	Interação
Hipercapnia							
	NOR (ng/mg)	0,24 ± 0,04	0,22 ± 0,02	0,24 ± 0,05	P=091 F _(2,38) =0,09	P=099 F _(1,38) =0,0001	n.s.
	DA (ng/mg)	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,02	P=0,69 F _(2,36) =0,36	P=0,72 F _(1,36) =0,12	n.s.
	DOPAC (ng/mg)	0,04* ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,10*† ± 0,02	P=0,25 F _(2,24) =1,49	P=0,037 F_(1,24)=4,85	P=0,043 F_(1,24)=3,57
	DOPAC/DA	0,62 ± 0,18	0,72 ± 0,25	0,84 ± 0,12	P=0,94 F _(2,20) =0,06	P=0,32 F _(1,20) =1,01	n.s.
	5-HT (ng/mg)	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	P=0,30 F _(2,37) =1,24	P=0,44 F _(1,37) =0,61	n.s.
	5-HIAA (ng/mg)	0,21 ± 0,02	0,23 ± 0,02	0,21 ± 0,04	P=0,76 F _(2,41) =0,27	P=0,65 F _(1,41) =0,19	n.s.
	5HIAA/5-HT	5,61 ± 0,83	7,18 ± 2,23	4,31 ± 1,00	P=0,02 F_(2,34)=4,05	P=0,44 F _(1,34) =0,59	n.s.

Hipóxia

NOR (ng/mg)	0,33 ± 0,03	0,25 ± 0,03	0,25 ± 0,04	P=0,47 F _(2,32) =0,75	P=0,24 F _(1,32) =1,44	n.s.
DA (ng/mg)	0,10* ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	P=0,03 F_(2,34)=3,87	P=0,01 F_(1,34)=7,72	n.s.
DOPAC (ng/mg)	0,07*† ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	P=0,41 F _(2,27) =0,93	P=0,029 F_(1,27)=5,29	n.s.
DOPAC/DA	0,72 ± 0,11	0,78 ± 0,23	1,02 ± 0,08*	P=0,98 F _(2,25) =0,02	P=0,043 F_(1,25)=4,51	n.s.
5-HT (ng/mg)	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	P=0,57 F _(2,37) =0,31	P=0,44 F _(1,37) =0,872	n.s.
5-HIAA (ng/mg)	0,23 ± 0,03	0,19 ± 0,03	0,15 ± 0,01	P=0,35 F _(2,39) =1,09	P=0,61 F _(1,39) =0,25	n.s.
5HIAA/5-HT	4,07 ± 0,93	3,73* ± 0,57	2,85 ± 0,35	P=0,018 F_(1,35)=4,45	P=0,11 F _(1,35) =2,26	n.s.

Os dados são reportados como média ± EPM. * Significa diferença estatisticamente significativa em comparação com a condição normóxia. † significa estatisticamente significativa em comparação entre os grupos. Considerando P <0,05. Os resultados de Anova se referem ao teste de duas vias, comparando a exposição gasosa a hipercapnia ou hipóxia com a condição de normóxia normocápnica.

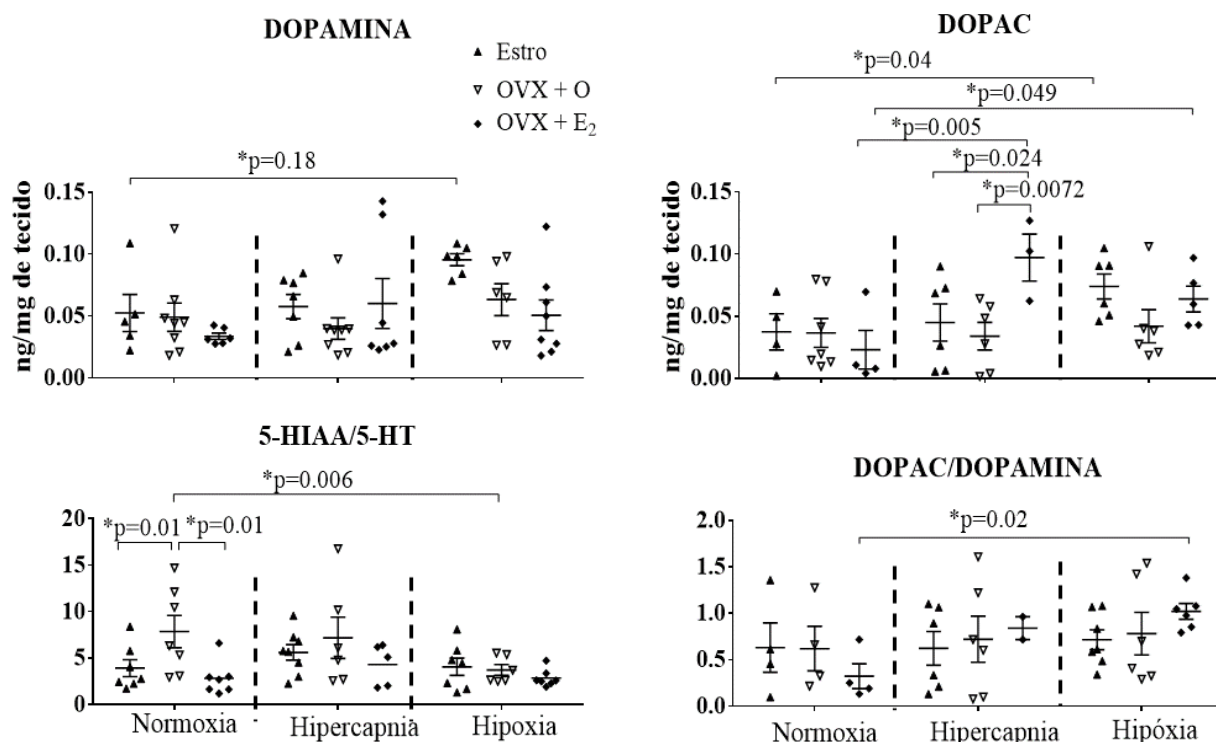


Fig. 8. Comparação das concentrações de Dopamina, Dopac e a relação 5HIAA/5-HT e DOPAC/DOPAMINA em animais em estro comparados ao grupo OVX+O sem e com reposição hormonal de estradiol em condições de normóxia normocápnica (0% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço), hipercapnia (7% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço) ou hipóxia (0% CO₂, 7% O₂, N₂ balanço) no LC. Cada ponto no gráfico representa o dado obtido de um animal, no gráfico é possível visualizar a média ± EPM. * Significa diferença estatisticamente significativa com P<0.05, quando houve diferença entre os pares, o valor de “p” foi reportado no gráfico.

3.2.3 Efeito da *orquidectomia* nas concentrações de monoaminas no LC

Em normóxia normocápnica, não foram encontradas diferenças significativas na quantificação das monoaminas analisadas bem como nas concentrações de DOPAC ou na relação entre metabólito/neurotransmissor. Apenas foi observada alteração na concentração de 5-HIAA, com um aumento de 60% no grupo ORX comparado ao grupo Intacto (figura 9).

Em animais intactos em hipercapnia foi observado um aumento nas concentrações de NOR em 57%, nos metabólitos 5-HIAA e DOPAC (76 e 300% respectivamente) e na relação 5-HIAA/5-HT e DOPAC/DA (79 e 575%, respectivamente) (figura 9). O grupo Intacto também apresentou concentrações maiores de 5-HT ($P=0,017$), DOPAC ($P=0,005$) e na relação 5-HIAA/5-HT ($P=0,003$) e DOPAC/DA ($P=0,003$) comparado ao grupo ORX. Animais ORX em hipercapnia não apresentaram alterações significativas na quantificação das monoaminas analisadas bem como em seus metabólitos ou na relação entre eles comparados a normóxia normocápnica.

Em hipóxia tantos animais intactos como ORX não apresentaram diferenças significativas na quantificação das monoaminas analisadas bem como em seus metabólitos comparados a situação de normóxia. Apenas alteração na relação DOPAC/DA foi observada em ambos grupos, com aumento de mais de 200%. Entretanto, em hipóxia o grupo ORX apresentou elevada quantificação de NOR, DA, 5-HIAA e DOPAC comparado ao grupo Intacto. (figura 9).

Tabela 12. Comparação das concentrações de NOR, DA, 5-HT e os metabólitos 5-HIAA e DOPAC e a relação entre eles (5HIAA/5-HT, DOPAC/DA) entre ratos gônada-intactos e ORX depois de 2 horas em normóxia normocápnica (0% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço), no LC.

Normóxia		
Concentração	Intacto	ORX
NOR (ng/mg)	0,19 ± 0,02	0,26 ± 0,05
DA (ng/mg)	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01
DOPAC (ng/mg)	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,00
DOPAC/DA	0,33 ± 0,09	0,34 ± 0,08
5-HT (ng/mg)	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01
5-HIAA (ng/mg)	0,13 ± 0,02	0,21[†] ± 0,03
5HIAA/5-HT	4,49 ± 1,31	3,57 ± 0,43

Os resultados estão expressos em ± EPM. Os dados foram comparados utilizando-se ANOVA de uma via † significa diferença estatisticamente significativa em comparação entre os grupos. Considerando P <0,05.

Tabela 13. Comparação das concentrações de NOR, DA, 5-HT e os metabólitos 5-HIAA e DOPAC e a relação entre eles (5HIAA/5-HT, DOPAC/DA) entre ratos gônada-intactos e ORX depois de 1 hora em normóxia normocápnica (0% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço) seguida por uma segunda hora de exposição ao desafio gasoso de hipercapnia (7% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço) ou hipóxia (0% CO₂, 7% O₂, N₂ balanço) no LC.

Gás	Monoamina/ concentração	INTACTO	ORX	Resultados de ANOVA		
				Efeito da castração	Efeito do gás	Interação
Hipercapnia						
	NOR (ng/mg)	0,30* ± 0,03	0,26 ± 0,03	P=0,62 F _(1,26) =0,25	P=0,11 F _(1,26) =2,67	n.s.
	DA (ng/mg)	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,01	P=0,71 F _(1,29) =0,14	P=0,93 F _(1,29) =0,006	n.s.
	DOPAC (ng/mg)	0,06 ± 0,01	0,02 ± 0,00	P=0,041 F_(1,20)=4,77	P=0,02 F_(1,20)=6,45	P=0,09 F _(1,20) =3,11
	DOPAC/DA	1,90*† ± 0,53	0,61 ± 0,18	P=0,04 F_(1,20)=4,85	P=0,005 F_(1,20)=9,99	P=0,04 F_(1,20)=4,96
	5-HT (ng/mg)	0,04 ± 0,01	0,07† ± 0,03	P=0,03 F_(1,28)=5,03	P=0,23 F _(1,28) =1,52	n.s.
	5-HIAA (ng/mg)	0,23*† ± 0,02	0,19 ± 0,03	P=0,40 F _(1,26) =0,71	P=0,12 F _(1,26) =2,45	P=0,032 F_(1,26)=5,14
	5HIAA/5-HT	8,06*† ± 1,50	3,11 ± 0,45	P=0,01 F_(1,24)=7,41	P=0,16 F _(1,24) =2,06	n.s.

Hipóxia

NOR (ng/mg)	0,17 ± 0,03	0,03[†] ± 0,04	P=0,01 F_(1,27)=7,49	P=0,59 F _(1,27) =0,29	n.s.
DA (ng/mg)	0,03 ± 0,005	0,06[†] ± 0,01	P=0,19 F _(1,27) =1,72	P=0,82 F _(1,27) =0,05	P=0,04 F_(1,27)=4,41
DOPAC (ng/mg)	0,03 ± 0,01	0,07*[†] ± 0,01	P=0,05 F _(1,22) =4,29	P=0,01 F_(1,22)=8,67	P=0,02 F_(1,22)=6,25
DOPAC/DA	0,75* ± 0,07	0,96* ± 0,15	P=0,30 F _(1,22) =1,10	P=0,0001 F_(1,22)=21,08	n.s.
5-HT (ng/mg)	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,01	P=0,15 F _(1,28) =2,13	P=0,58 F _(1,28) =0,31	n.s.
5-HIAA (ng/mg)	0,10 ± 0,03	0,19 ± 0,02	P=0,003 F _(1,26) =10,47	P=0,36 F _(1,26) =0,84	n.s.
5HIAA/5-HT	3,28 ± 0,69	4,29 ± 0,64	P=0,95 F _(1,26) =0,003	P=0,75 F _(1,26) =0,10	n.s.

Os dados são reportados como média ± EPM. * Significa diferença estatisticamente significativa em comparação com a condição normóxia. † significa estatisticamente significativa em comparação entre os grupos. Considerando P < 0,05. Os resultados de ANOVA se referem ao teste de duas vias, comparando a exposição gasosa a hipercapnia ou hipóxia com a condição de normóxia normocápnica.

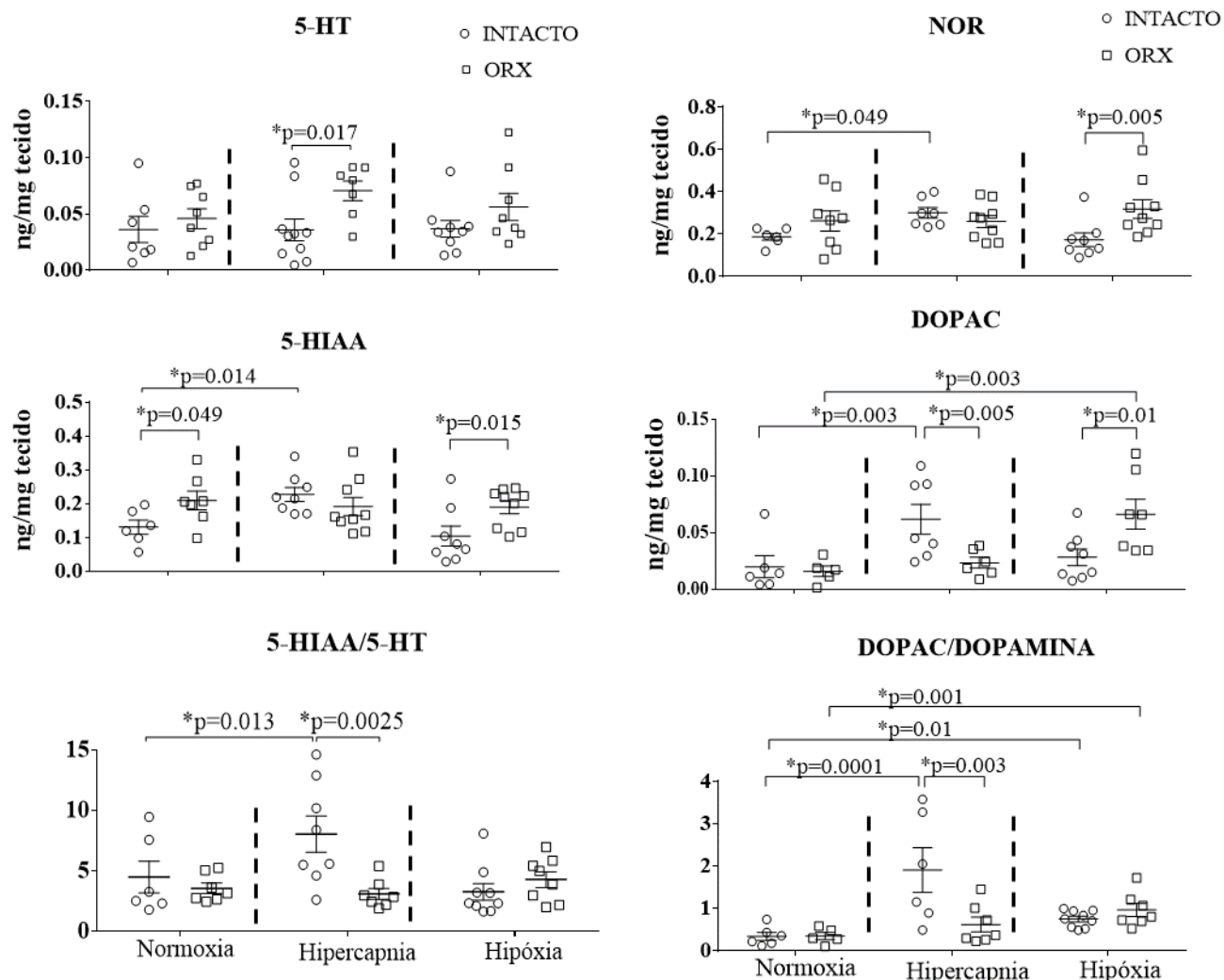


Fig. 9. Comparação das concentrações de NOR, 5-HT, 5-HIAA e Dopac, e a relação 5-HIAA/5-HT e DOPAC/DOPAMINA em machos Intactos e ORX em condições de normóxia normocápnica (0% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço), hipercapnia (7% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço) ou hipóxia (0% CO₂, 7% O₂, N₂ balanço) no LC. Cada ponto no gráfico representa o dado obtido de um animal, no gráfico é possível visualizar a média ± EPM. * Significa diferença estatisticamente significativa com P<0.05, quando houve diferença entre os pares, o valor de “p” foi reportado no gráfico.

3.2.4 *Efeito do sexo nas concentrações de monoaminas no LC*

Em normóxia normocápnica, não foram encontradas diferenças significativas na quantificação das monoaminas analisadas bem como nas concentrações de seus metabólitos ou na relação entre metabólito/neurotransmissor comparando-se machos intactos com fêmeas intactas (durante o Estro). Entretanto, observamos um dimorfismo sexual nas concentrações das monoaminas e seus metabólitos frente ao desafio gasoso de hipercapnia e hipóxia (Fig. 10).

Em hipercapnia, machos apresentam aumento estatisticamente significativo nas concentrações de NOR, 5-HIAA, DOPAC e nas relações 5-HIAA/5-HT e DOPAC/DA, comparados a normóxia normocápnica, o que não é observado nas fêmeas, adicionalmente, machos apresentam uma tendência de maior concentração de DA ($P=0,06$) e uma concentração aumentada na relação DOPAC/DA ($P=0,0007$) quando comparados a fêmeas em hipercapnia.

Curiosamente, em hipóxia são as fêmeas que apresentam diferenças quando comparadas aos machos na mesma condição. Fêmeas intactas (em estro) apresentam aumento nas concentrações de DA e DOPAC comparando-se a situação de hipóxia à normóxia, o que não é observado em machos. Adicionalmente as fêmeas em hipóxia apresentam concentrações estatisticamente maiores de todas as monoaminas e metabólitos analisados (NOR, 5-HT, DA, 5-HIAA, DOPAC) quando comparadas aos machos na mesma condição gasosa, no entanto, não são observadas alterações nas relações 5-HIAA/5-HT e DOPAC/DA.

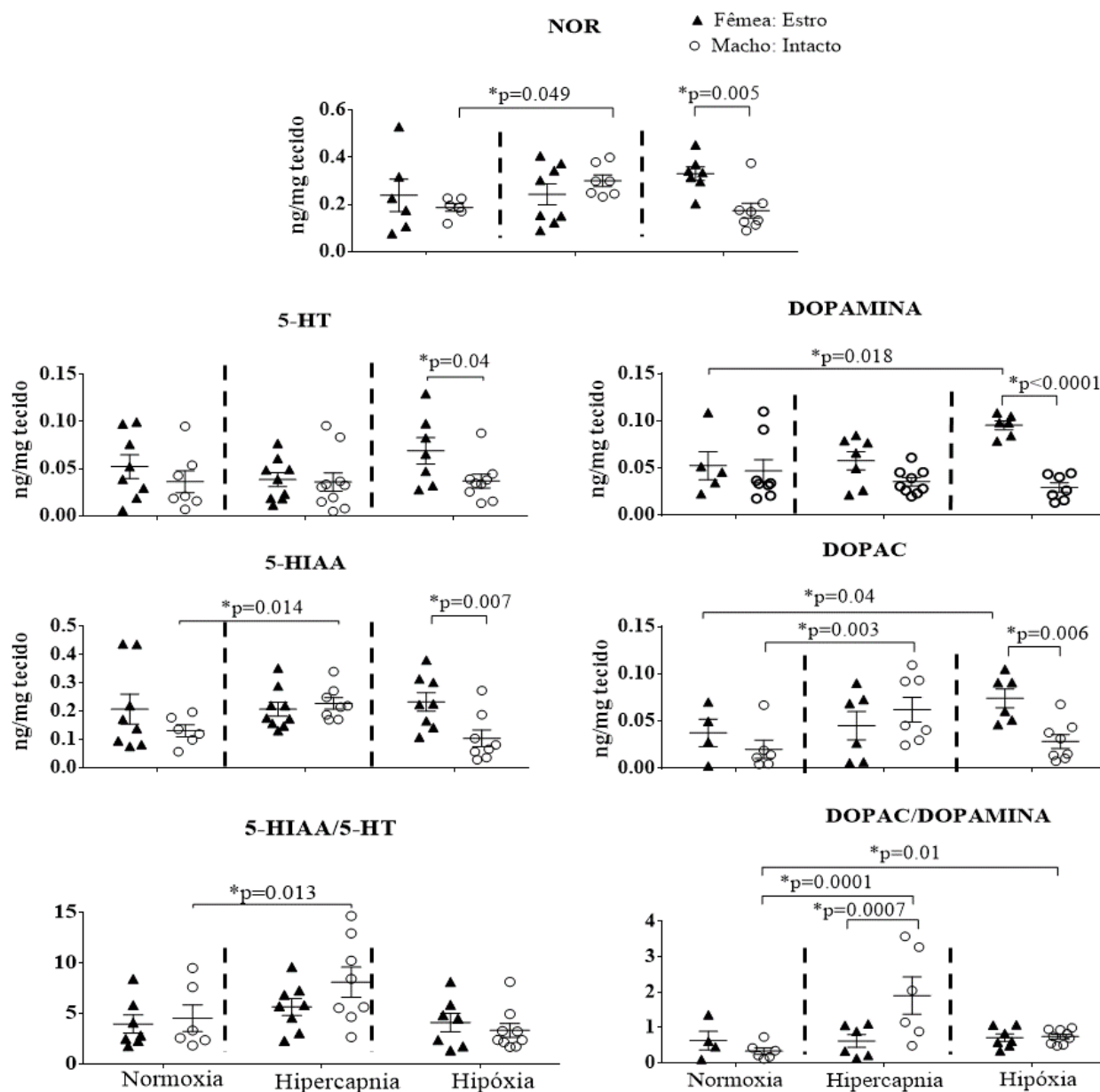


Fig. 10. Comparação das concentrações de NOR, 5-HT e Dopamina e seus metabólitos (5-HIAA e Dopac) e a relação entre eles (5HIAA/5-HT e DOPAC/DOPA) em fêmeas em Estro e machos Intactos em normóxia normocápica (0% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço), hipercapnia (7% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço) ou hipóxia (0% CO₂, 7% O₂, N₂ balanço) no LC. Cada ponto no gráfico representa o dado obtido de um animal, no gráfico é possível visualizar a média ± EPM.

* Significa diferença estatisticamente significativa com P<0.05, quando houve diferença entre os pares, o valor de “p” foi reportado no gráfico.

3.2.5 Sistematização dos principais resultados encontrados nas concentrações de monoaminas no LC

Uma tabela com a sistematização dos principais resultados pode ser observada a seguir. Usamos fêmeas na fase Estro como grupo de comparação para as demais fases do ciclo estral (Estro vs Fases do ciclo), em comparação a fêmeas castradas (Efeito da OVX) e com machos intactos (Estro vs macho intacto), machos intactos também foram comparados com o grupo ORX (Intacto vs ORX).

Tabela 14. Tabela sintetizando os principais resultados referentes as concentrações de monoaminas no LC.

Região	Gás	Estro vs Fases do ciclo	Efeito da OVX	Intacto vs ORX	Estro vs Macho intacto
LC					
	Normocapnia normóxia		↑5-HIAA/5-HT	↑5-HIAA	
	Hipóxia	↓ DA, DOPAC, NOR (diestro)		↑NOR,5-HIAA, DOPAC	↓NOR,5-HIAA, 5-HIAA/5-HT, DA, DOPAC
	Hipercapnia	↑5-HIAA (em diestro)		↑5-HT, ↓5-HIAA/5-HT, DOPAC, DOPAC/DA	↑DOPAC/DA

A seta ↑ indica aumento, a seta ↓ indica diminuição.

Em resumo, as fases Proestro e Diestro possuem concentrações menores de DA e DOPAC em comparação ao grupo Estro durante a exposição a hipóxia. O grupo diestro apresentou maiores concentrações de 5-HIAA que as demais fases do ciclo durante a exposição a hipercapnia. A OVX levou a um aumento de 5-HIAA/5-HT no LC durante a condição de

normóxia normocapnica. Em machos, a ORX causou aumento das concentrações de 5-HIAA em normóxia normocapnica, aumento de NOR, 5-HIAA, e DOPAC durante a exposição a hipóxia, aumento de NOR e diminuição de 5-HIAA/5-HT, DOPAC, DOPAC/DA em hipercapnia. Fêmeas em estro apresentaram maiores concentrações de 5-HT, 5-HIAA, 5-HIAA/5-HT, DA e DOPAC durante a exposição a hipóxia e menor concentração de DOPAC/DA durante hipercapnia em comparação a machos intactos.

3.3 RAFE caudal: *Avaliação das monoaminas nos diferentes grupos experimentais submetidos a exposição gasosa*

Em nossas análises, os níveis de DOPAMINA e DOPAC foram indetectáveis, sugerindo, portanto, a baixa concentração ou a não presença deste. Adicionalmente, por razões metodológicas, não conseguimos quantificar os níveis de MHPG na RAFE. Portanto, apresentamos a quantificação de NOR, 5-HT, seu metabólito 5-HIAA, a relação 5-HIAA/5HT. Os dados são relatados em tabelas para cada estágio do ciclo estral durante a normóxia (tabela 15), hipercapnia ou hipóxia (tabela 16), comparamos fêmeas intactas na fase Estro com animais OVX+O e OVX + E₂ em normóxia normocápica (tabela 17) ou durante desafios gasosos (tabela 18) e machos intactos comparados com ORX em normóxia normocápica (tabela 19) ou durante exposições a hipercapnia ou hipóxia (Tabela 20). Além disso, os dados foram utilizados para avaliar o efeito do dimorfismo sexual nas concentrações de NOR, 5-HT, seu metabólito (5-HIAA) e a relação de 5-HIAA/5-HT comparando Ratos machos intactos com fêmeas intactas na fase Estro. Apenas resultados estatisticamente significativos foram representados nos gráficos. Uma tabela sistematizando os principais resultados encontrados no LC, também foi apresentada (tabela 21).

3.3.1 Efeito do *ciclo estral* nas concentrações de monoaminas na *Rafe Caudal*

Não houve diferenças significativas na quantificação das monoaminas analisadas, bem como seus metabólitos ou na relação entre eles (NOR, 5-HT e 5-HIAA e 5-HIAA/5-HT) entre as fases do ciclo estral durante normóxia normocápnica.

Em hipercapnia houve uma diminuição significativa de 75% quanto a concentração de NOR em animais intactos em estro, o que não foi observado nas demais fases do ciclo estral. No entanto foi observado uma diminuição na quantificação de 5-HT em todas as fases do ciclo estral ($p < 0,0001$) sem alterar as concentrações de HIAA e na relação 5-HIAA/5-HT.

Não houve diferenças significativas na quantificação das monoaminas analisadas, bem como seus metabólitos ou na relação entre eles (NOR, 5-HT e 5-HIAA e 5-HIAA/5-HT) frente a exposição de hipóxia (0% CO₂, 7% O₂, N₂ balanço), como pode ser observado na figura 11.

Tabela 15. Comparação das concentrações de NOR, 5-HT e seu metabólito 5-HIAA e a relação entre eles (5HIAA/5-HT) entre as diferentes fases do ciclo estral depois de 2 horas em normóxia normocápnica (0% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço), na **Rafe Caudal**.

Concentração	Normóxia		
	Estro	Diestro	Proestro
NOR (ng/mg)	0,23 ± 0,03	0,23 ± 0,02	0,20 ± 0,04
5-HT (ng/mg)	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,03
5-HIAA (ng/mg)	0,53 ± 0,03	0,43 ± 0,02	0,37 ± 0,05
5HIAA/5-HT	5,57 ± 0,56	4,46 ± 0,60	5,82 ± 1,91

Os resultados estão expressos em ± EPM. Os dados foram comparados utilizando-se ANOVA de uma via † significa diferença estatisticamente significativa em comparação entre os grupos. Considerando $P < 0,05$.

Tabela 16. Comparação das concentrações de NOR, 5-HT e seu metabólito 5-HIAA e a relação entre eles (5HIAA/5-HT) entre as diferentes fases do ciclo estral depois de 1 hora em normóxia normocápnica (0% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço) seguida por uma segunda hora de exposição ao desafio gasoso de hipercapnia (7% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço) ou hipóxia (0% CO₂, 7% O₂, N₂ balanço), na **Rafe caudal**.

Gás	Monoamina/ concentração	Estro	Diestro	Proestro	Resultados de ANOVA		
					Efeito da castração	Efeito do gás	Interação
Hipercapnia							
	NOR (ng/mg)	0,17* ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,03	P=0,89 F _(2,41) =0,12	P=0,29 F _(1,41) =1,11	n.s.
	5-HT (ng/mg)	0,06* ± 0,01	0,05* ± 0,01	0,04* ± 0,01	P=0,91 F _(2,34) =0,091	P<0,0001 F_(1,34)=25,30	n.s.
	5-HIAA (ng/mg)	0,50 ± 0,08	0,47 ± 0,06	0,46 ± 0,06	P=0,25 F _(1,40) =1,60	P=0,49 F _(1,40) =0,48	n.s.
	5HIAA/5-HT	6,83 ± 0,87	6,31 ± 1,97	6,50 ± 1,20	P=0,76 F _(2,33) =0,27	P=0,22 F _(1,32) =1,57	n.s.

Hipóxia

NOR (ng/mg)	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,23 ± 0,02	P=0,65 F _(2,41) =0,44	P=0,31 F _(1,41) =1,02	n.s.
5-HT (ng/mg)	0,11 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01	P=0,76 F _(2,37) =0,27	P=0,09 F _(1,37) =3,01	n.s.
5-HIAA (ng/mg)	0,46 ± 0,08	0,40 ± 0,08	0,34 ± 0,04	P=0,08 F _(2,41) =2,56	P=0,36 F _(1,41) =0,84	n.s.
5HIAA/5-HT	4,91 ± 0,96	4,59 ± 0,90	6,51 ± 1,59	P=0,42 F _(2,37) =0,88	P=0,96 F _(1,37) =0,002	n.s.

Os dados são reportados como média ± EPM. * Significa diferença estatisticamente significativa em comparação com a condição normóxia.

Considerando P <0,05. Os resultados de ANOVA se referem ao teste de duas vias, comparando a exposição gasosa a hipercapnia ou hipóxia com a condição de normóxia normocápnica.

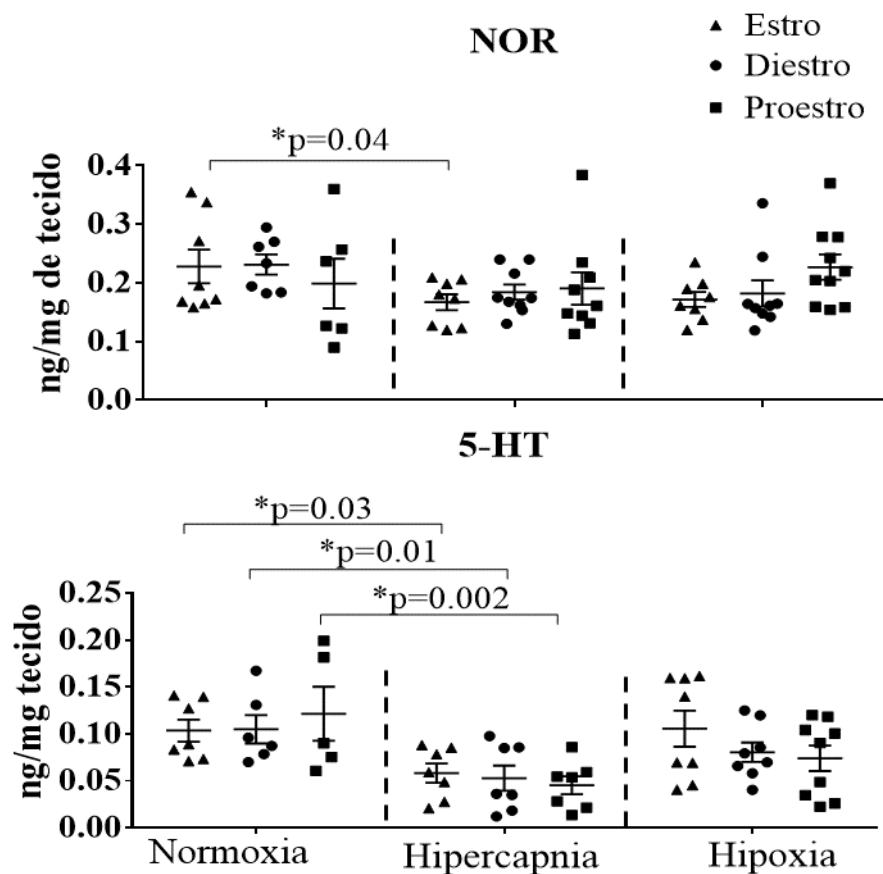


Fig. 11. Comparação das concentrações de NOR, 5-HT e entre as diferentes fases do ciclo estral em condições de normóxia normocápnica (0% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço), hipercapnia (7% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço) ou hipóxia (0% CO₂, 7% O₂, N₂ balanço) na **Rafe caudal**. Cada ponto no gráfico representa o dado obtido de um animal, no gráfico é possível visualizar a média \pm EPM. * Significa diferença estatisticamente significativa com $P < 0.05$, quando houve diferença entre os pares, o valor de “p” foi reportado no gráfico.

3.3.2 *Efeito da ovariectomia nas concentrações de monoaminas na Rafe Caudal*

Em normóxia normocápnica fêmeas intactas em estro apresentaram diferenças significativas na quantificação de NOR e 5-HT comparadas os grupos OVX+O e OVX+E₂ (NOR: 53% maior, 5-HT: 42% maior) e maior concentração de 5-HIAA comparadas ao grupo OVX+E₂ (89% maior).

Em hipercapnia houve uma diminuição significativa de 75% quanto a concentração de NOR em animais intactos em estro (estro em normóxia normocápnica v.s. estro em hipercapnia) já os grupos OVX+O e OVX+E₂ apresentaram aumento estatisticamente significativo de 33% na concentração de NOR durante hipercapnia comparado ao mesmo grupo em normóxia normocápnica. Adicionalmente, o grupo intacto (em estro) apresentou 40% de diminuição na concentração de 5-HT em comparação com o mesmo grupo em normóxia normocápnica, essa diminuição não foi observada nos demais grupos OVX. Finalmente, o grupo OVX+E₂ apresentou aumento significativo na concentração de 5-HIAA (114%) e na relação 5-HIAA/5-HT (50%) em hipercapnia comparando-se o mesmo grupo em normóxia normocápnica, que não foi observado nos demais grupos.

No desafio gasoso a hipóxia não houve diferenças significativas na quantificação das monoaminas analisadas NOR, 5-HT, nem no metabólito 5-HIAA ou na relação 5-HIAA/5-HT comparando-se os grupos OVX+O, OVX+E₂ com o grupo intacto em estro (figura 12).

Tabela 17. Comparação das concentrações de NOR, 5-HT, o metabólito 5-HIAA e na relação 5HIAA/5-HT, entre o grupo intacto em estro e os grupos ovariectomizados sem ou com tratamento hormonal de estradiol em condições de 2 horas de normóxia normocápica (0% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço) na **Rafe caudal**.

Normóxia			
Concentração	Estro	OVX+O	OVX+E ₂
NOR (ng/mg)	0,23† ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,15 ± 0,01
5-HT (ng/mg)	0,10† ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,02
5-HIAA (ng/mg)	0,53 ± 0,03	0,42 ± 0,07	0,28 ± 0,03
5HIAA/5-HT	5,57 ± 0,56	5,65 ± 0,79	4,63 ± 0,52

Os resultados estão expressos em ± EPM. Os dados foram comparados utilizando-se ANOVA de uma via † significa diferença estatisticamente significativa em comparação entre os grupos. Considerando P <0,05.

Tabela 18. Comparação das concentrações de NOR, 5-HT, o metabólito 5-HIAA e na relação 5HIAA/5-HT, entre o grupo intacto em estro e os grupos ovariectomizados sem ou com tratamento hormonal de estradiol depois de 1 hora em normóxia normocápnica (0% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço) seguida por uma segunda hora de exposição ao desafio gasoso de hipercapnia (7% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço) ou hipóxia (0% CO₂, 7% O₂, N₂ balanço) na **Rafe caudal**.

Gás	Monoamina/ concentração	Estro	OVX+O	OVX+E	Resultados de ANOVA		
					Efeito da castração	Efeito do gás	Interação
Hipercapnia							
	NOR (ng/mg)	0,17* ± 0,01	0,20* ± 0,01	0,20* ± 0,02	P=0,41 F _(2,37) =0,89	P=0,28 F _(1,37) =1,19	P=0,02 F_(2,37)=4,37
	5-HT (ng/mg)	0,06* ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,08 ± 0,01	P=0,65 F _(2,37) =0,43	P=0,89 F _(1,37) =0,02	P=0,004 F_(2,37)=6,30
	5-HIAA (ng/mg)	0,50 ± 0,08	0,60 ± 0,08	0,60* ± 0,08	P=0,76 F _(2,41) =0,47	P=0,005 F_(1,41)=8,52	P=0,04 F_(2,41)=3,41
	5HIAA/5-HT	6,83 ± 0,87	6,36 ± 0,44	6,92* ± 0,79	P=0,83 F _(2,36) =0,18	P=0,018 F_(1,36)=6,14	n.s.

Hipóxia

NOR (ng/mg)	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,17 ± 0,01	P=0,04 F(2,36)=3,32	P=0,94 F(1,36)=0,005	P=0,03 F(2,36)=3,92
5-HT (ng/mg)	0,11 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,10 ± 0,01	P=0,23 F(2,37)=1,53	P=0,18 F(1,37)=1,84	n.s.
5-HIAA (ng/mg)	0,46 ± 0,08	0,37 ± 0,06	0,35 ± 0,05	P=0,01 F(2,39)=4,68	P=0,75 F(1,39)=0,12	n.s.
5HIAA/5-HT	4,91 ± 0,96	4,66 ± 0,59	3,84 ± 0,67	P=0,33 F(1,37)=1,12	P=0,18 F(1,37)=0,33	n.s.

Os dados são reportados como média ± EPM. * Significa diferença estatisticamente significativa em comparação com a condição normóxia.

Considerando P <0,05. Os resultados de Anova se referem ao teste de duas vias, comparando a exposição gasosa a hipercapnia ou hipóxia com a condição de normóxia normocápnica.

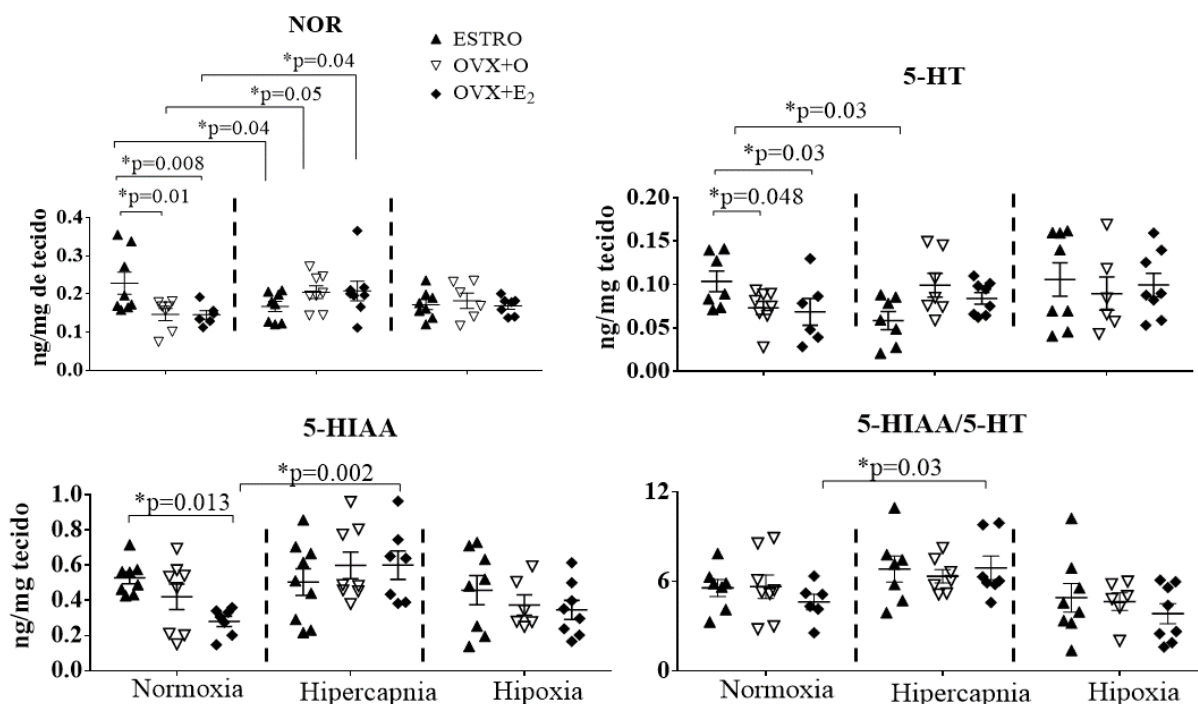


Fig. 12. Comparação das concentrações de NOR, 5-HT e o metabólito 5-HIAA e na relação 5HIAA/5-HT entre a fêmea intacta em Estro e fêmeas OVX+O e OVX+E₂ em condições de normóxia normocápnica (0% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço), hipercapnia (7% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço) ou hipóxia (0% CO₂, 7% O₂, N₂ balanço) na **Rafe caudal**. Cada ponto no gráfico representa o dado obtido de um animal, no gráfico é possível visualizar a média ± EPM. * Significa diferença estatisticamente significativa com P<0.05, quando houve diferença entre os pares, o valor de “p” foi reportado no gráfico.

3.3.3 Efeito da *orquidectomia* nas concentrações de monoaminas na Rafe

Em normóxia normocápnica não houve diferenças significativas na quantificação das monoaminas analisadas NOR, 5-HT, nem no metabólito 5-HIAA ou na relação 5-HIAA/5-HT comparando-se os grupos intacto e ORX.

Em hipercapnia machos intactos tiveram um aumento estatisticamente significativo nas concentrações de 5-HIAA ou na relação 5-HIAA/5-HT comparando-se com o mesmo grupo em normóxia normocápnica. Entretanto este aumento não foi observado em animais ORX, o que fez com que as concentrações de 5-HIAA ou na relação 5-HIAA/5-HT fosse maior no grupo Intacto comparado ao grupo ORX.

No desafio gasoso a hipóxia não houve diferenças significativas na quantificação das monoaminas analisadas NOR, 5-HT, nem no metabólito 5-HIAA ou na relação 5-HIAA/5-HT comparando-se os grupos Intacto com o grupo ORX (figura 13).

Tabela 19. Comparação das concentrações de NOR, 5-HT e seu metabólito 5-HIAA e na relação 5HIAA/5-HT, entre machos gônada intactos e ORX, depois de 2 horas em normóxia normocápnica (0% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço), na **Rafe caudal**.

Normóxia		
Concentração	Intacto	ORX
NOR (ng/mg)	0,19919 ± 0,02639	0,24964 ± 0,0365
5-HT (ng/mg)	0,07737 ± 0,01271	0,09456 ± 0,0216
5-HIAA (ng/mg)	0,4456 ± 0,03663	0,41576 ± 0,0391
5HIAA/5-HT	6,40125 ± 1,1479	4,81777 ± 0,4477

Os resultados estão expressos em ± EPM. Os dados foram comparados utilizando-se ANOVA de uma via e não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 20. Comparação das concentrações de NOR, 5-HT e seu metabólito 5-HIAA e na relação 5HIAA/5-HT, entre machos gônada intactos e ORX depois de 1 hora em normóxia normocápnica (0% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço) seguida por uma segunda hora de exposição ao desafio gasoso de hipercapnia (7% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço) ou hipóxia (0% CO₂, 7% O₂, N₂ balanço) na **Rafe caudal**.

Gás	Monoamina/ concentração	INTACTO	ORX	Resultados de ANOVA		
				Efeito da castração	Efeito do gás	Interação
Hipercapnia						
	NOR (ng/mg)	0,23 ± 0,03	0,20 ± 0,02	P=0,66 F _(1,29) =0,19	P=0,78 F _(1,29) =0,07	n.s.
	5-HT (ng/mg)	0,08 ± 0,02	0,09 ± 0,01	P=0,55 F _(1,28) =0,36	P=0,97 F _(1,28) =0,0001	n.s.
	5-HIAA (ng/mg)	0,63*† ± 0,09	0,37 ± 0,05	P=0,01 F_(1,28)=6,65	P=0,29 F _(1,28) =1,13	P=0,04 F_(1,28)=4,29
	5HIAA/5-HT	7,13† ± 1,37	4,49 ± 0,39	P=0,03 F_(1,25)=4,87	P=0,83 F _(1,25) =0,04	n.s.

Hipóxia

NOR (ng/mg)	0,18 ± 0,01	0,20 ± 0,03	P=0,17 F _(1,28) =1,91	P=0,16 F _(1,28) =2,08	n.s.
5-HT (ng/mg)	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,02	P=0,25 F _(1,28) =1,32	P=0,32 F _(1,28) =0,99	n.s.
5-HIAA (ng/mg)	0,37 ± 0,05	0,39 ± 0,04	P=0,90 F _(1,28) =0,01	P=0,27 F _(1,28) =1,24	n.s.
5HIAA/5-HT	4,69 ± 0,90	4,33 ± 0,33	P=0,22 F _(1,26) =1,59	P=0,16 F _(1,26) =2,04	n.s.

Os dados são reportados como média ± EPM. * Significa diferença estatisticamente significativa em comparação com a condição normóxia. †
significa estatisticamente significativa em comparação entre os grupos. Considerando P <0,05. Os resultados de Anova se referem ao teste de duas
vias, comparando a exposição gasosa a hipercapnia ou hipóxia com a condição de normóxia normocápnica.

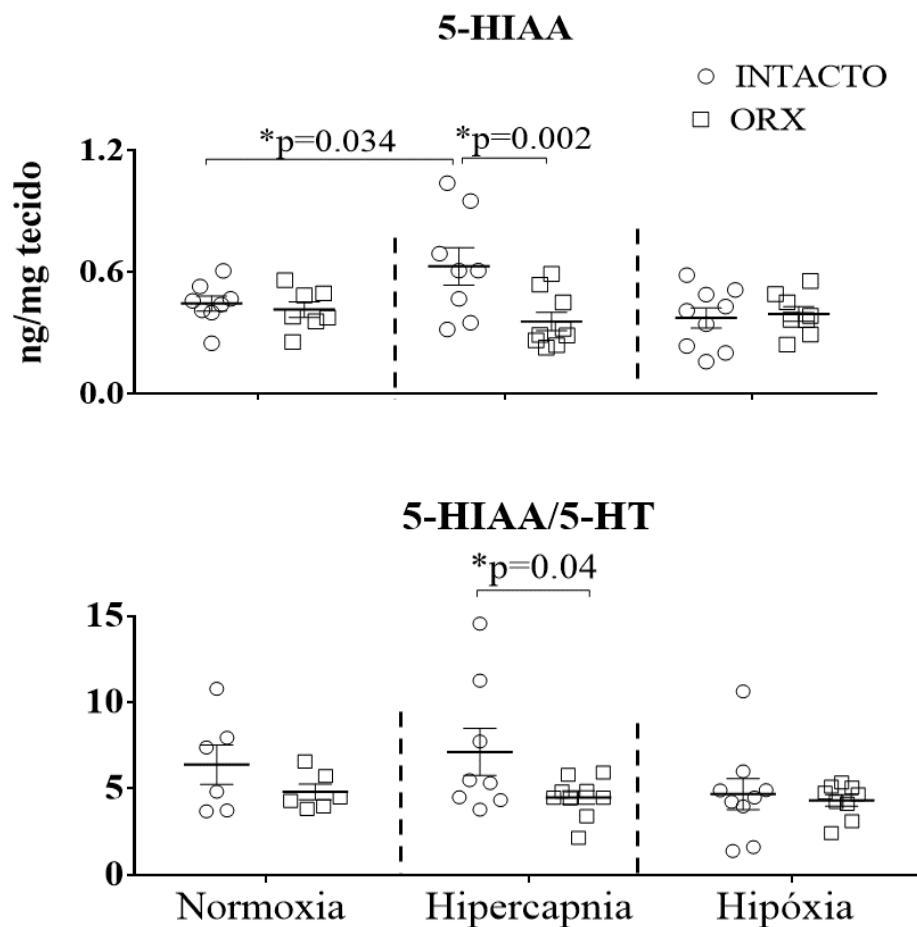


Fig. 13. Comparação nas concentrações 5-HIAA e a relação 5HIAA/5-HT entre a machos Intactos e ORX em condições de normóxia normocápnica (0% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço), hipercapnia (7% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço) ou hipóxia (0% CO₂, 7% O₂, N₂ balanço) na **Rafe caudal**. Cada ponto no gráfico representa o dado obtido de um animal, no gráfico é possível visualizar a média ± EPM. * Significa diferença estatisticamente significativa com P<0.05, quando houve diferença entre os pares, o valor de “p” foi reportado no gráfico.

3.3.3.1 *Efeito do sexo nas concentrações de monoaminas na Rafe caudal*

Em normóxia normocápnica não houve diferenças significativas na quantificação das monoaminas analisadas NOR, 5-HT, nem no metabólito 5-HIAA ou na relação 5-HIAA/5-HT comparando-se os grupos intacto e ORX.

Em hipercapnia fêmeas intactas tiveram uma diminuição estatisticamente significativa nas concentrações de NOR e 5-HT comparadas ao mesmo grupo em normóxia normocápnica. Em machos isto não foi observado, sendo que as concentrações das monoaminas analisadas NOR, 5-HT, metabólito 5-HIAA ou na relação 5-HIAA/5-HT não foram alteradas devido a hipercapnia.

No desafio gasoso a hipóxia não houve diferenças significativas na quantificação das monoaminas analisadas NOR, 5-HT, nem no metabólito 5-HIAA ou na relação 5-HIAA/5-HT comparando-se os grupos Intactos (figura 14).

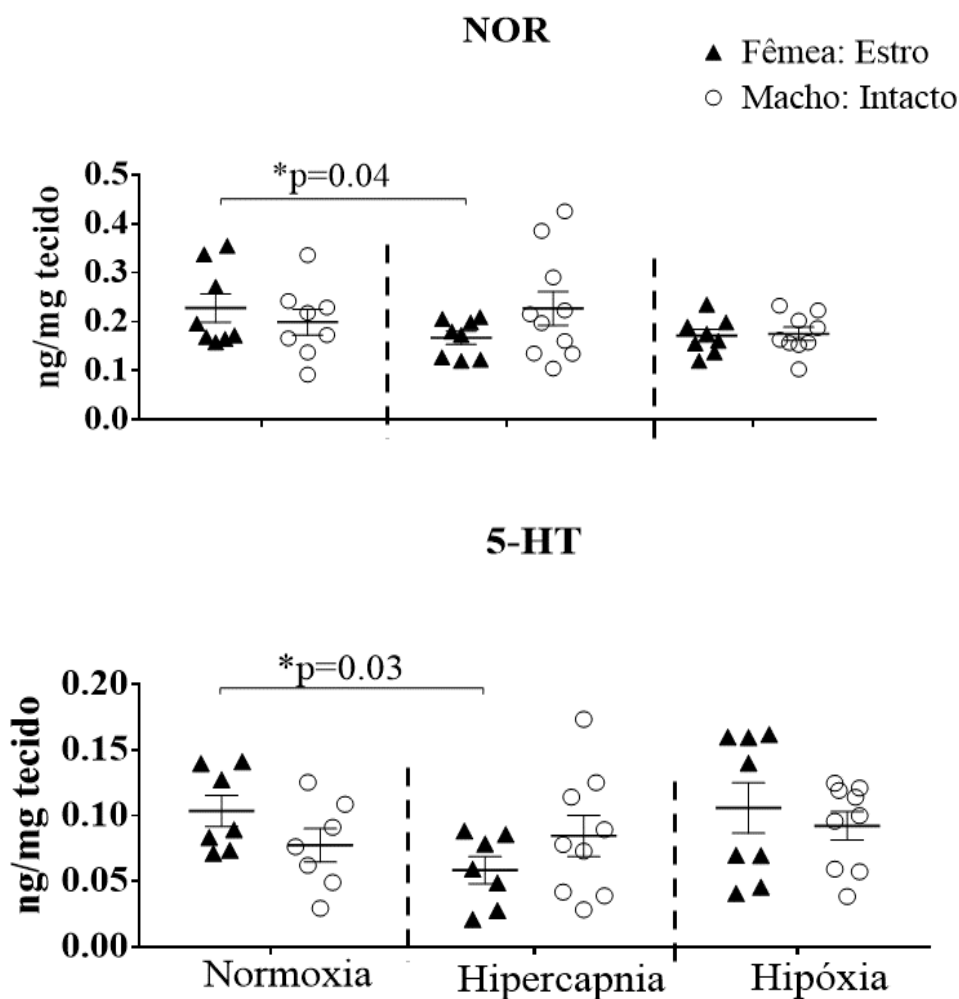


Figura 14. Comparação das concentrações de NOR e 5-HT entre a fêmea intacta em Estro machos do grupo Intacto em condições de normóxia normocápnica (0% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço), hipercapnia (7% CO₂, 21% O₂, N₂ balanço) ou hipóxia (0% CO₂, 7% O₂, N₂ balanço) na **Rafe caudal**. Cada ponto no gráfico representa o dado obtido de um animal, no gráfico é possível visualizar a média ± EPM. * Significa diferença estatisticamente significativa com P<0.05, quando houve diferença entre os pares, o valor de “p” foi reportado no gráfico.

3.3.4 Sistematização dos principais resultados encontrados nas concentrações de monoaminas na Rafe caudal

Uma tabela com a sistematização dos principais resultados pode ser observada a seguir. Usamos fêmeas na fase Estro como grupo de comparação para as demais fases do ciclo estral (Estro vs Fases do ciclo), em comparação a fêmeas castradas (Efeito da OVX) e com machos intactos (Estro vs macho intacto), machos intactos também foram comparados com o grupo ORX (Intacto vs ORX).

Tabela 21 Tabela sintetizando os principais resultados referentes as concentrações de monoaminas na **Rafe caudal**.

Região	Gás	Estro vs Fases do ciclo	Efeito da OVX	Intacto vs ORX	Estro vs Macho intacto
Rafe caudal					
	Normocapnia normóxica		↓NOR, 5-HT		
	Hipóxia				
	Hipercapnia			↓5-HIAA, 5-HIAA/5-HT	

A seta ↓ indica diminuição.

Em resumo, a OVX levou a uma diminuição de NOR e 5-HT na rafe caudal LC durante a condição de normóxica normocapnica em comparação com fêmeas em estro. Em machos, a ORX causou diminuição de 5-HIAA e na relação 5-HIAA/5-HT durante a exposição a hipercapnia em comparação a machos intactos.

3.4 SISTEMATIZAÇÃO DOS RESULTADOS

Em **normóxia normocápnica** apenas foi observado aumento de NOR na MPA de ratos ORX em comparação com animais intactos. Nesta região, nenhum outro efeito foi observado considerando as diferentes fases do ciclo estral, OVX, ORX ou comparando-se fêmeas e machos, durante o uso de ar corrente. A OVX levou a um aumento na relação 5-HIAA/5HT no **LC** e diminuição das concentrações de NOR e 5-HT na **Rafe caudal** (comparando-se as fêmeas OVX com as intactas em estro). Em machos, a ORX não alterou as concentrações de monoaminas e seus metabólitos ou na relação entre eles no **LC** e **Rafe caudal**. Também não foi observado diferenças entre machos e fêmeas (intactos) nas concentrações de monoaminas e seus metabólitos ou na relação entre eles em nenhuma das regiões analisadas, em normóxia normocápnica.

Em **hipercapnia** o grupo estro apresentou concentrações maiores de 5-HIAA e 5-HIAA/5-HT em comparação com os demais grupos em diferentes fases do ciclo estral, em comparação a fêmeas OVX e machos intactos na **MPA**. No **LC** o grupo diestro apresentou concentrações elevadas de 5-HIAA em comparação com as demais fases do ciclo estral. Em machos, a ORX causou aumento de 5-HT e diminuição de 5-HIAA/5-HT, DOPAC, DOPAC/DA, em hipercapnia. Comparados as fêmeas em estro, os machos intactos apresentaram menor relação de DOPAC/DA no LC. Na Rafe caudal, o único efeito observado durante a hipercapnia, foi uma menor concentração de 5-HT e diminuição da relação 5-HIAA/5-HT em machos ORX comparados a machos intactos.

Em **hipóxia** as concentrações de 5-HIAA/5-HT estavam diminuídas nos grupos diestro e proestro, em comparação com o grupo estro na MPA. No **LC** as concentrações de DA e DOPAC estavam diminuídas nos grupos diestro e proestro, em comparação com o grupo estro, a ORX resultou em um aumento de NOR, 5-HIAA, e DOPAC em comparação ao grupo Intacto. Também observamos dimorfismo sexual no **LC** comparando-se machos intactos e fêmeas em estro, uma vez que fêmeas apresentaram maiores concentrações de NOR, 5-HIAA, 5-HIAA/5-

HT, DA e DOPAC na região. Não houve nenhum efeito da hipóxia sobre as concentrações das monoaminas e seus metabólitos em todos os grupos analisados considerando-se a **rafe caudal**.

4 DISCUSSÃO

Estudos têm demonstrado que, em mamíferos, a MPA é hierarquicamente, a principal região do SNC envolvida no controle da Tc. Curiosamente sabe-se que esta é uma região sexualmente dimórfica (BODEN; HARRIS; PARKES, 2000; SIMERLY et al., 1990). Adicionalmente, a MPA também pode responder à alterações ambientais como temperatura e diferentes concentrações de O₂ e CO₂, uma vez que foi observado que durante a hipercapnia há um aumento da atividade dos neurônios deste núcleo (TAMAKI; NAKAYAMA, 1987).

No presente estudo avaliamos se as diferentes fases do ciclo estral influenciam na liberação de monoaminas e seus metabólitos na MPA. Resultados recentes do nosso laboratório demonstraram um aumento de temperatura corporal de ratas durante o dia do estro em cerca de 0,6°C (MARQUES et al., 2015). Curiosamente, neste estudo demonstramos que, mesmo com a temperatura corporal aumentada no dia do estro, não foi observado alterações nas concentrações das monoaminas na MPA durante a normocapnia normóxia, o que indica que ela pode não estar participando nesta regulação da Tc basal, ou estar sendo regulada por outros fatores.

Nós observamos concentrações aumentadas de 5-HIAA e da relação 5-HIAA/5-HT na MPA de fêmeas durante o dia do estro em comparação com fêmeas nas demais fases do ciclo estral, bem como quando comparadas a fêmeas OVX, submetidas à hipercapnia. Esse resultado reflete a maior atividade do neurotransmissor (BALDESSARINI, 1972; DALLA et al., 2008; KORF; AGHAJANIAN; ROTH, 1973). Fêmeas em estro também apresentam maior concentração de 5-HIAA e da relação 5-HIAA/5-HT quando comparadas aos machos,

na MPA, o que oferece indícios de que a conservação de calor que ocorre em estro (uma vez que a Tc está aumentada) pode estar sendo regulada por uma atuação serotoninérgica.

Um estudo demonstrou que em ratas, a concentração do metabólito de serotonina (5-HIAA) é maior no tronco encefálico, MPA, corpo estriado e córtex cerebral quando comparado a ratos (CARLSSON; CARLSSON, 1988). Estes dados sugerem uma relação entre esteroides sexuais o sistema serotoninérgico, entretanto, este estudo não considerou a fase do ciclo estral das fêmeas.

Estudos recentes do nosso laboratório demonstraram a importância do LC na respostas ventilatórias a hipercapnia em machos e fêmeas (BIANCARDI et al., 2008; DE CARVALHO et al., 2015; MARQUES et al., 2015). Adicionalmente, é bem conhecido que existem diferenças neuroanatômicas do LC de machos e fêmeas, sendo que o LC de ratas apresenta maior volume e campo dendrítico e maior quantidade de neurônios em relação ao LC de ratos (DE CARVALHO et al., 2015). Desta forma, no presente estudo apresentamos os dados referentes às diferentes concentrações de monoaminas nesta região. Em nossos demonstramos que em condições basais, a castração - OVX e ORX- aumentou a relação 5-HIAA/5-HT e 5-HIAA respectivamente. Em fêmeas a OVX não alterou as concentração das monoaminas e seus metabólitos em condições de hipercapnia ou hipóxia, entretanto, considerando machos, a ORX causou um aumento da NOR, 5-HIAA, DOPAC em hipercapnia e um aumento da 5-Ht e diminuição de 5-HIAA, DOPAC e na relação DOPAC/DA em hipóxia. Também foi observado dimorfismo sexual comparando-se fêmeas em estro e machos intactos em hipercapnia e hipóxia. Fêmeas apresentaram maior concentração de NOR, 5-HIAA, 5-HIAA/5-HT, DA e DOPAC durante hipóxia e menor relação DOPAC/DA em hipercapnia.

Curiosamente as diferenças observadas entre machos e fêmeas quando submetidos aos desafios gasosos, podem estar relacionados com o dimorfismo sexual observado na

ocorrência de diversas doenças respiratórias como a apneia obstrutiva do sono, asma, síndrome da morte súbita infantil, dentre outros (AZAGRA-CALERO et al., 2012; CANGUVEN; ALBAYRAK, 2011).

Estudos anteriores demonstraram que o aumento da atividade dos neurônios do LC induzido pela hipercapnia promove a liberação de NOR, que possivelmente irá atuar nos neurônios respiratórios bulbares para promover o aumento da ventilação (KC et al., 2006). É sabido que assim como a NOR, a 5-HT dentro do LC participam na modulação das respostas ventilatórias à elevadas concentrações de CO₂ uma vez que a microinjeção de WAY-100635 (antagonista seletivo de receptor 5-HT_{1A}) no LC resultou na diminuição da resposta ventilatória à hipercapnia (DE SOUZA MORENO et al., 2010), entretanto esses resultados foram obtidos através de experimentos realizados apenas em ratos machos.

Evidências sugerem também uma diferença sexo-específica na via dopaminérgica do SNC. Estudos demonstraram que os níveis de Dopamina encontrados diferem significativamente entre os sexos, sendo mais baixo em ratas do que em ratos (CARLSSON; CARLSSON, 1988). Considerando-se apenas ratos, foi demonstrado que a aplicação iontoforética direta de Dopamina no LC de animais anestesiados, suprime a atividade de disparo dos neurônios noradrenérgicos da região (ELAM et al., 1981), demonstrando o papel desta monoamina no núcleo. Em nossos estudos nós demonstramos diferentes concentrações de Dopamina, DOPAC e na relação DOPAC/Dopamina no LC de fêmeas e machos submetidos a hipercapnia, sendo que apenas em machos em hipercapnia houve alterações nos níveis de concentração do neurotransmissor e seu metabólito.

Em nossos estudos, demonstramos que em machos os hormônios sexuais parecem atuar mais sobre a modulação da Rafe do que em fêmeas, uma vez que a OVX não alterou as concentrações de nenhuma monoamina estudada, nem seus metabólitos ou a relação entre eles frente aos desafios gasosos, mas a ORX foi capaz de diminuir as concentrações de 5-

HIAA e 5HIAA/5-HT em hipercapnia. No estudo de Hodges et al. (2011) foi observado que camundongos transgênicos machos que não possuíam neurônios serotoninérgicos no SNC apresentaram resposta ventilatória à hipercapnia atenuada, ao passo que a sensibilidade ao CO₂ de fêmeas transgênicas não foi alterada, o que corrobora com nossos achados.

Isso também pode estar relacionado a doenças sexualmente dimórficas ligadas ao sistema respiratório, como a Síndrome da Morte Súbita Infantil (SIDS), que é uma das principais causas de morte em crianças até 1 ano de idade em que 60% são meninos (MOON; HORNE; HAUCK, 2007). A SIDS é considerada um fator de “risco triplo”; influenciada por 1) fatores genéticos, 2) fatores ambientais e 3) uma percepção imatura de CO₂ em sítios centrais (HILAIRE, 2006; MOON; HORNE; HAUCK, 2007). Embora estudos sugiram que a suscetibilidade masculina seja influenciada por diferenças sexuais em fatores genéticos e biológicos, ainda não se sabe por que a incidência de SIDS é maior nos machos, e isso pode ser apenas um reflexo do fato de que bebês do sexo masculino são mais vulneráveis a doenças e enfermidades em geral do que as fêmeas, com os machos tendo uma maior taxa de mortalidade global (DUNCAN; BYARD, 2018; PONGOU, 2013).

Alterações dos neurônios serotoninérgicos têm sido associadas à SIDS (HAUCK, 2001; KINNEY et al., 2018; KINNEY; FILIANO; WHITE, 2001). A lesão dos neurônios serotoninérgicos em recém-nascidos causa alterações nas respostas ventilatória a CO₂ leitões e camundongos machos (HODGES et al., 2005; PATERSON et al., 2006). Embora o número de neurônios serotoninérgicos seja semelhante na rafe caudal de ratos machos e fêmeas (BARKER; THOMAS; BEHAN, 2009; PATERSON et al., 2006), as ratas têm maior imunorreatividade ao receptor serotonina-2A nos núcleos motores respiratórios (BEHAN et al., 2003; SEEBART; STOFFEL; BEHAN, 2007). Portanto, essas diferenças podem explicar o viés masculino na ocorrência de SIDS. Em nossos achados demonstramos que em machos os hormônios sexuais modulam a concentração de 5-HIAA e 5-HIAA/5-HT na Rafe e LC de machos em hipercapnia, mas não de fêmeas.

Em suma, demonstramos que em fêmeas a OVX causou alterações serotoninérgicas frente a hipercapnia na MPA, mas não no LC ou Rafe caudal. Em machos os hormônios sexuais parecem atuar mais sobre a modulação da Rafe e LC em hipercapnia principalmente através do sistema serotoninérgico. Também demonstramos dimorfismo sexual frente a hipercapnia com maior concentração de 5-HIAA e 5-HIAA/5-HT na MPA de fêmeas comparado a machos e DOPAC/DA no LC de machos comparados a fêmeas. Também observamos maiores concentrações de NOR, 5-HIAA, 5-HIAA/5-HT, DA e DOPAC no LC de fêmeas em hipóxia comparadas a machos.

5 CONCLUSÃO

Demonstramos a influência dos hormônios sexuais quanto a quantificação de monoaminas (e seus metabólitos) em resposta a hipercapnia e hipóxia no LC, Rafe caudal e MPA, em ratos *Wistar* machos e fêmeas intactos e castrados.

CAPÍTULO 4

Evaluation of microglia morphology in brainstem chemosensitive areas and paraventricular nucleus in ovariectomized rats submitted to hypercapnia

ABSTRACT

The neural network that regulates breathing shows significant sexual dimorphism. Ovarian hormones are important to this distinction since in rats ovariectomy reduces the ventilatory response to CO₂. Microglia are neuroimmune cells that are sensitive to neuroendocrine changes in their environment. When reacting to challenging conditions, these cells show changes in their morphology that reflect an augmented capacity for producing pro- and anti-inflammatory cytokines. There is evidence suggesting that microglia may contribute to sex-based differences in reflexive responses to hypercapnia. We hypothesized that ovariectomy and hypercapnia promote microglial reactivity in selected brainstem and hypothalamic areas regulating breathing. To test this hypothesis, we used ionized calcium-binding-adaptor molecule-1 (Iba1) immunolabeling to compare the density and morphology of microglia in the Locus Coeruleus (LC), the medullary raphe, caudal part of nucleus of tractus solitarius (cNTS), and the paraventricular nucleus of hypothalamus (PVN). Tissue was obtained from SHAM (metaestrus) female rats or following ovariectomy. Rats were exposed to normocapnia or hypercapnia (5% CO₂). Ovariectomy and hypercapnia did not affect microglial density in any of the structures studied. Ovariectomy promoted a reactive change in morphology in the cNTS and LC, as indicated by a larger morphological index. In these structures, hypercapnia had a relatively modest opposing effect. Such changes were not observed in the medullary raphe or the PVN. We conclude that ovarian hormones can prevent microglial reactivity in CO₂/H⁺ sensing structures. These data suggest that microglia can contribute to respiratory diseases, especially those that are influenced by cyclic fluctuations of ovarian hormones or menopause.

Keywords: Adrenergic and noradrenergic neurones, chemosensitivity, development, medulla, pons, catecholamine

1 INTRODUCTION

Microglia are neuroimmune competent cells that are in contact with astrocytes and neurons (NAKAGAWA; CHIBA, 2015). Within the central nervous system (CNS), the density of these “macrophage-like” cells changes over the course of development and varies significantly between structures (HART et al., 2012; LAWSON et al., 1990). In mature mammals under basal conditions, microglia survey their immediate environment by projecting their long processes to neighboring cells. Thus, the morphology of “resting” microglia is characterized by a small soma with a well spread arborization of their processes (BALDY et al., 2018; TREMBLAY et al., 2010; VERDONK et al., 2016; WAKE et al., 2013). Microglia are highly sensitive to changes in their environment, and when facing stressors such as infections or traumas, microglia react rapidly, as indicated by changes in their morphology. Reactive microglia are characterized by a larger soma area with a reduced arborization (small branches). Under that state, microglia have an “ameboid” appearance that indicates an increased capacity for secretion; this morphology may also facilitate proliferation and migration (HABIB; BEYER, 2015; LAWSON et al., 1990; MASGRAU et al., 2017).

Microglial cells are sexually differentiated (VILLA et al., 2018). Interestingly, the same stimulus can elicit different microglial responses depending on the action of sex hormones or age (CRAIN; NIKODEMOVA; WATTERS, 2009, 2013; LUO; CHEN, 2012; NISSEN, 2017; SOHRABJI; WILLIAMS, 2013). Microglia express estrogen receptors and their activation inhibits the secretion of pro-inflammatory cytokines. This response is an important aspect of the anti-inflammatory actions of estrogens in the CNS (HABIB et al., 2013; HABIB; BEYER, 2015; KIPP; BEYER, 2009; SIERRA et al., 2008; VILLA et al., 2018), which may therefore be involved in sex-based differences in the prevalence of respiratory diseases such as obstructive sleep apnea and panic disorders (YANG et al., 2013).

By comparison with other neurological function, our understanding of the role of microglia in respiratory homeostasis is in its infancy; yet, there is growing evidence indicating

that microglia influence the respiratory system. In this context, Lorea-Hernández et al., (2016) showed that in young mice (7-8 postnatal days), intracisternal injection of LPS promotes microglial reactivity and reduces the respiratory frequency and amplitude. This, in turn, caused a 74% decrease in the ventilation, suggesting that microglia can modulate rhythm generation. More recently, Silva et al. (2018) reported that microglia are important for the maintenance of autonomic adjustments during hypoxia or during cardiorespiratory reflex activation elicited by peripheral chemoreceptors. The authors showed that acute hypoxia increases levels of mRNA of proinflammatory cytokines in rostral ventrolateral medulla and the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN), which are important regulators of cardiorespiratory responses. Additionally, microglia of the subfornical organ are highly responsive to fluctuations of CO_2/H^+ . Because excessive hyperventilation in response to CO_2 inhalation is a hallmark of panic disorders, it was proposed that microglia play a role in the pathophysiology of such disease (LARKE VOLLMER et al., 2016). Obstructive sleep apnea results in recurrent drops in arterial O_2 levels and rise in CO_2/H^+ . In their recent review, Yang et al. (2013) summarised evidence indicating that microglia may contribute to neurological disorders resulting from obstructive sleep apnea. Following chronic intermittent hypoxia, microglia become reactive and promote neuro-inflammation mainly by producing neurotoxic cytokines ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$) and reactive oxygen species (ROS) that ultimately lead to neuronal apoptosis. While recurrent hypercapnia is another consequence of obstructive sleep apnea, its impact on brain function has received limited attention by comparison with hypoxia. Regardless, both panic disorder and obstructive sleep apnea show a significant sexual dimorphism; however, the effects of sex hormones on microglial function are still poorly explored (ASAMI et al., 2009; BEN ACHOUR; PASCUAL, 2010; HABIB et al., 2013).

Recently, we demonstrated that in female rats, ovariectomy reduces the ventilatory response to inhalation of CO_2 enriched (hypercapnic) gas by 43% relative to SHAM animals in estrus (MARQUES et al., 2015). In those experiments, hormonal replacement with 17β -

estradiol (E₂) or E₂ and progesterone (P) in physiological doses failed to restore the CO₂ and hypoxic chemosensitivity. Keeping in mind that restoring ovarian hormones and replicating their natural fluctuations is experimentally challenging, these data nonetheless raise the possibility that other mechanisms may be involved in these responses.

The ventilatory response to CO₂ results from a complex interplay between numerous structures that, in addition to having specialized “CO₂-sensing properties”, are also important in the integration of relevant sensory information to produce an adequate motor output. Central chemoreceptors are distributed in many locations in the brainstem, cerebellum, hypothalamus, and midbrain. The relative contribution of each region in CO₂-related respiratory drive depends on numerous factors including sex, age, arousal state, and previous life experiences (MITCHELL, 2004; NATTIE; LI, 2012). The neural structures involved in the CO₂ response cover broad areas within the CNS and amongst those, the retrotrapezoid nucleus (RTN) has received most attention owing to its exquisite ability to detect changes in CO₂/H⁺ (GUYENET; BAYLISS, 2015). However, other structures such as the locus coeruleus (LC), the caudal nucleus of solitary tract (cNTS), and the medullary raphe also have CO₂-sensing properties (BIANCARDI et al., 2008; CORCORAN; MILSOM, 2009; DE CARVALHO et al., 2017; DEAN; PUTNAM, 2010; HODGES; RICHERSON, 2010; NATTIE; LI, 2012; RICHERSON, 2004) and unlike the RTN, they have been associated with the pathophysiology of panic disorder (SCHENBERG, 2016; WEMMIE, 2011). Furthermore, the paraventricular nucleus (PVN) is activated during hypercapnia owing to the numerous interactions between this structure, the LC and the NTS (BERQUIN et al., 2000; CUNNINGHAM; BOHN; SAWCHENKO, 1990; KING et al., 2015; SAWCHENKO; SWANSON, 1982).

With that in mind, we aimed to further our understanding of the sexual dimorphism of the neurocircuitry regulating hypercapnic ventilatory response. Based on the growing evidence linking microglia and sex hormones to this process, we hypothesized that ovariectomy and hypercapnia change the microglia morphology (“surveying” or “reactive”). This quantification

was performed through optical methods after staining the cells with the general microglia markers Ionized calcium Binding Adapter molecule 1 (Iba-1) (KORZHEVSKII; KIRIK, 2016). Quantification was performed in the selected structures discussed previously to evaluate areas where microglial function would be most important.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 *Animals*

Experiments were performed on 32 adult Sprague-Dawley female rats (~80 days of life). Rats were supplied with food and water *ad libitum* and maintained in standard laboratory and animal care conditions (21°C, 12:12 dark:light cycle; lights on at 07:00 h and off at 19:00 h). Females were randomly assigned to one of the four experimental groups: 1) SHAM ovaries exposed to normocapnia; 2) SHAM ovaries exposed to hypercapnia; 3) ovariectomized (OVX) females exposed to normocapnia, and 4) OVX females exposed to hypercapnia. The estrous cycle was determined by vaginal smears performed after euthanasia (see “*Gas exposure protocol*”). Since most females were in metaestrus, this phase of the cycle, which is characterized by low E₂ and rising progesterone levels (Marques et al., 2015), was selected to reduce data variability and optimize the use of animals. Laval University Animal Care Committee approved all the experimental procedures described in this manuscript; the protocols were in accordance with the guidelines detailed by the Canadian Council on Animal Care (Protocol Number: 2012-023).

2.2 Ovariectomy

Rats were anesthetized with isoflurane (3% in air), and ovariectomy or SHAM surgery was performed as previously described (FOURNIER et al., 2015). A 3-cm long midline dorsal skin incision was made approximately halfway between the middle of the back and the base of the tail. After the peritoneal cavity was accessed, the ovary was found surrounded by a variable amount of fat tissue. The connection between the Fallopian tube and the uterine horn was cut and the ovary was removed. Post-op care consisted of subcutaneous injections of an antibiotic (enrofloxacin; 5 mg/kg; Baytril, Montreal, QC, Canada), an analgesic (buprenorphine; 0.02 mg/kg, Reckitt Benckiser Pharmaceuticals Inc., Richmond, VA, USA) and fluids (5 ml lactated Ringer solution); rats were then housed individually for 2 weeks before the experiments.

2.3 Gas exposure protocol

Animals were placed in a 7 L, non-restraining plexiglass chamber where they were exposed to normocapnia (room air; 0% CO₂; 21% O₂) for 1 hour or to moderate hypercapnia (30 min, 5%CO₂, 21%O₂) followed by a 30 min recovery period breathing room air. After the experiments, rats were deeply anesthetized with a mixture of ketamine (Pfizer, Kirkland, QC, Canada; 80 mg/kg) and xylazine (Bimeda, Cambridge, ON, Canada; 10 mg/ kg) and then perfused through the heart with 0.9% saline followed by 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1M sodium tetraborate buffer (PFA/borax; pH 9.5 at 4°C). Brains were collected and post fixed for 24h in 4% PFA/borax and then placed in a 20% sucrose - 4% paraformaldehyde solution for 48h at 4°C and finally frozen and stored to -80°C freezer until the immunohistochemistry were performed.

2.4 Immunohistochemistry

Frozen brains were mounted on a microtome and sliced into 40 μm coronal sections that were placed in a cold cryoprotectant solution (0.05M sodium phosphate buffer, 30% ethylene glycol and 20% glycerol) and stored at -20°C (TENORIO-LOPES et al., 2017b). Iba-1 immunolabeling was performed according to standard procedures (ANSORG et al., 2015; BALDY et al., 2018; TENORIO-LOPES et al., 2017b). Briefly, free-floating tissue sections were washed with Tris-buffered saline (TBS) pH 7.4 for 10 min. Then, the endogenous peroxidase activity was blocked for 30 minutes with 1% H_2O_2 in TBS. Tissue sections were washed 3 times (5 min each) in TBS after non-specific binding was blocked for 2 h in blocking solution (1% BSA / 0.4% Triton X-100 in TBS). Sections were then incubated with the primary antibody (anti-Iba-1 in rabbit, concentration: 1:750) for 12h at 4°C . Section were then washed 3 times (10 min each) in TBS before being incubated with a secondary antibody (goat anti-rabbit IgG, dilution: 1/200 – Vector Laboratories) with blocking solution for 3 h at room temperature. The Vectastain Elite avidin-biotinylated enzyme complex (ABC) method was used and sections were incubated for 2 h. After ABC incubation, the slices were incubated in 0.5% H_2O_2 to decrease the endogenous activity (and background signal) (ANSORG et al., 2015). A final wash was performed in TBS (3 times, 10 each) and the Nickel chloride diaminobenzidine peroxidase method was used to reveal biotinylated secondary antibody (SigmaFast™ DAB with metal enhancer; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

2.5 Microglia Analyses

Preparations were visualized under a microscope (Eclipse E600 - Nikon) equipped with a camera (Infinity 3 – Lumenera Corporation) and stored as digital images. The following parameters were analyzed: *cell density*, *microglia morphology* (mean soma area, mean arborization area, mean width and height of the arborization) and *nearest neighbor distance*

(NND). This analysis was performed according to the procedures described previously (Baldy et al, 2018). We used 20X magnification objective for microglial density analysis and 40X magnification objective for cell body and arborization area measurements.

The selection of anatomical levels was conducted with reference to illustrations from a rat brain stereotaxic atlas (PAXINOS G; WATSON C ., 1998) and using major anatomical landmarks including the ventricles and optic tract (white matter). Each region was analyzed at the following Bregma levels: cNTS Bregma -14.08 mm; medullary raphe Bregma -11.6mm; LC Bregma -10.04mm; PVN Bregma -1.80mm. The specific areas of each structure were: 38.85 μm^2 (cNTS); 8.60 μm^2 (LC); 22.42 μm^2 (medullary raphe); 26.33 μm^2 (PVN). The template was applied onto the image using the ImageJ (NIH software, U.S. National Institutes of Health System) and only cells that were in focus were counted. All analyses were conducted in a randomized order, and the experimenter was blinded to identity of the animal or treatment. Only after all analyzes have been made the treatments and corresponding animals were revealed and plotted in graphs.

Within each structure, microglia morphology was evaluated by delineating manually the arborizations and cell bodies of 10 microglial cells; these values were used to calculate the morphological index (soma area/arborization area) (BALDY et al., 2018; VERDONK et al., 2016). To ensure accuracy and consistency, only cells with uninterrupted branches were analyzed until they were no longer visualized. Owing to the occasional artefacts related to tissue processing (e.g. tear in the tissue), this criteria limited the number of sections available for proper analyses. As a result, tissue availability was reduced, and in the end our analyzes were done in only 14 samples (total of 14 animals). For all parameters, analysis was performed on the right and left sides of each structure. Since ANOVA did not reveal any evidence of lateralization in any structure, a mean value was obtained for the right and left sides. We also measured the length and width of each microglial cell defined as the distance between the apices of the branches, including the soma, the limits of the branches where the processes could no

longer be seen in the tissue (TAYLOR et al., 2014). These data are not reported since they were not affected by any treatment. Finally, we measured the nearest neighbor distance (NND) between microglia as an indicator of cell motility (STOWELL et al., 2017). After analyzing the morphology of 10 cells (as mentioned before), we selected those cells and all microglial cells closely to them and performed a point with 14 pixels in each microglia soma to exclude artefacts for subsequent analyzes using the plugin *NND* in the Image J software (NIH software, U.S. National Institutes of Health System).

2.6 *Statistical Analysis*

For each structure, the effects of ovariectomy and hypercapnia on the cell density and morphological variables were analyzed by performing a two-way ANOVA followed by LSD Fisher *post hoc* test. ANOVA results are reported in Table 1 and results from *post hoc* tests are reported in the figures when significant. The statistical analyses were performed by GraphPad Prism software (version 6.0 for Windows). The significance level was set to $P < 0.05$ and data are presented as group means \pm S.E.M. for each parameter investigated.

3 RESULTS

The structures of interest (LC, PVN, cNTS, and the medullary raphe) were identified using a rat brain atlas (PAXINOS G; WATSON C., 1998). Figure 1 to 4 present schematic representation of each structure (panel a) and representative photomicrographs of Iba-1-immunopositive cells (panels b to e). For each region of interest, cell density was expressed as a function of the size of the structure using standardized templates that were built according to the specific form of the structure (right and left side) (BALDY et al., 2018; LAWSON et al., 1990; VERDONK et al., 2016). A representative tissue used can be seen in the Figures 1 to 4 present (panels a to e). Interestingly, data variability was small such that results showed us a defined response pattern despite low number of replicates.

Neither ovariectomy (OVX) nor hypercapnia affected the cell density in any of the structures investigated (Figures 5a-d, Table 1). In the cNTS, normocapnic morphological index of OVX females was 37.5% higher than SHAM animals, whereas CO₂ exposure attenuated this effect by 25% (Figure 1f). The decreases in morphological index were caused by increases in soma size as observed in Figure 1f. There was no effect of OVX or CO₂ in mean arborization area or NND.

Table 1. Effects of OVX and CO₂ on selected morphological parameters measured on Iba-1 positive cells of chemosensitive brainstem regions: caudal part of nucleus of tractus solitarius (cNTS), medullary raphe, paraventricular nucleus of hypothalamus (PVN) as well as in the Locus Coeruleus (LC).

Morphological parameter	INTACT		OVX		ANOVA RESULTS		
	Normo	Hyper	Normo	Hyper	OVX effect	CO ₂ effect	Factorial interaction
<i>cNTS</i>							
Number	3	2	4	4			
Microglial density	1.64 ±0.12	1.69 ±0.39	2.05 ±0.09	1.77 ±0.10	P=0.13 F _(1,9) =2,70	P=0.45 F _(1,9) =0.63	n.s
Mean body area (µm ²)	24.85 ±2.30	20.88 ±1.23	39.21 ±1.02	30.83 ±0.94	P<0.0001 F_(1,9)=68.69	P=0.0023 F_(1,9)=2.25	n.s
Mean arborization area (µm ²)	1259.08 ±122.69	1182.92 ±170.85	1291.03 ±87.78	1352.82 ±46.02	P=0.34 F _(1,9) =1.03	P=0.94 F _(1,9) =0.005	n.s
Nearest neighbor distance (µm)	38.88 ±5.69	37.60 ±1.09	32.48 ±1.36	32.46 ±1.05	P=0.080 F _(1,9) =3.87	P=0.83 F _(1,9) =0.049	n.s
Morphological index	0.02 ±0.0006	0.16 ±0.013	0.03 ±0.002	0.02 ±0.0006	P<0.0001 F_(1,9)=47.95	P=0.001 F_(1,9)=21.26	n.s

Medullary raphe

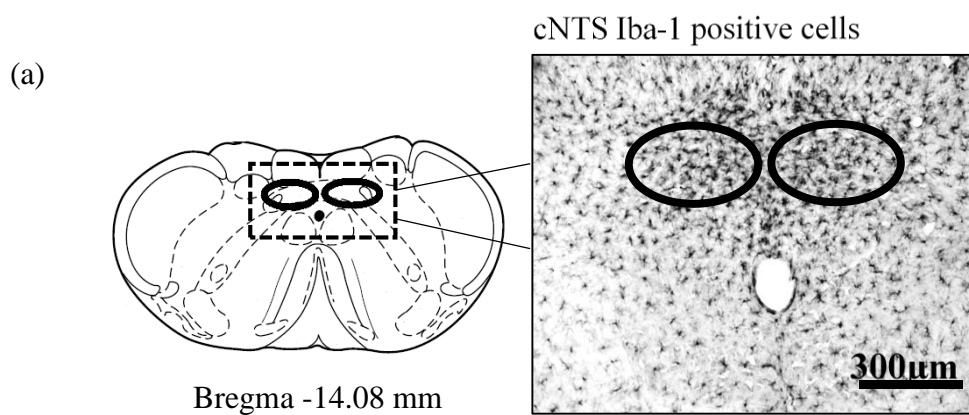
Number	3	3	3	4			
Microglial density	1.24 ±0.03	1.06 ±0.20	1.32 ±0.07	1.19 ±0.12	P=0.42 F _(1,9) =0.71	P=0.23 F _(1,9) =1.66	n.s
Mean body area (µm ²)	21.11 ±1.21	27.01 ±2.16	20.95 ±2.14	28.76 ±3.37	P=0.77 F _(1,9) =0.09	P=0.03 F_(1,9)=6.75	n.s
Mean arborization area (µm ²)	1334.49 ±72.16	1454.01 ±123.71	1363.07 ±195.92	1569.61 ±89.70	P=0.58 F _(1,9) =0.33	P=0.22 F _(1,9) =1.70	n.s
Nearest neighbor distance (µm)	50.83 ±5.17	40.93 ±3.59	42.82 ±2.44	41.73 ±0.52	P=0.27 F _(1,9) =3.14	P=0.11 F _(1,9) =1.35	n.s
Morphological index	0.017 ±0.0008	0.019 ±0.0009	0.016 ±0.001	0.018 ±0.001	P=0.68 F _(1,9) =0.18	P=0.08 F _(1,9) =3.853	n.s

PVN

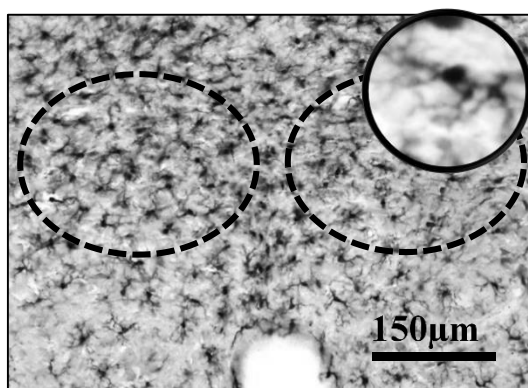
Number	3	3	2	4			
Microglial density	1.91 ±0.15	1.81 ±0.17	1.85±0.18	1.87 ±0.07	P>0.99 F _(1,8) =3.79	P=0.78 F _(1,8) =0.08	n.s
Mean body area (µm ²)	30.63 ±2.33	30.21 ±2.39	37.24 ±2.58	34.8 ±5.17	P=0.05 F _(1,8) =5.39	P=0.57 F _(1,8) =0.35	n.s

Mean arborization area (μm^2)	1427.51 ± 76.34	1407.17 ± 179.28	1744.68 ± 289.79	1669.41 ± 165.38	P=0.14 $F_{(1,8)}=2.62$	P=0.80 $F_{(1,8)}=0.07$	n.s
Nearest neighbor distance (μm)	35.26 ± 2.04	30.21 ± 2.39	35.31 ± 0.67	33.75 ± 0.89	P=0.34 $F_{(1,8)}=1.06$	P=0.10 $F_{(1,8)}=3.53$	n.s
Morphological index	0.02 ± 0.0005	0.02 ± 0.001	0.02 ± 0.0005	0.02 ± 0.0005	P=0.19 $F_{(1,8)}=2.02$	P=0.129 $F_{(1,8)}=2.86$	n.s
LC							
Number	3	3	3	4			
Microglial density	1.59 ± 0.16	1.16 ± 0.10	1.59 ± 0.14	1.50 ± 0.16	P=0.29 $F_{(1,9)}=1.28$	P=0.11 $F_{(1,9)}=3.08$	n.s
Mean body area (μm^2)	25.97 ± 2.99	29.20 ± 2.18	27.55 ± 0.54	32.43 ± 1.46	P=0.25 $F_{(1,9)}=1.53$	P=0.07 $F_{(1,9)}=4.34$	n.s
Mean arborization area (μm^2)	1110.19 ± 36.24	1260.76 ± 160.20	747.41 ± 31.46	899.88 ± 13.52	P=0.001 $F_{(1,9)}=22.18$	P=0.08 $F_{(1,9)}=3.89$	n.s
Nearest neighbor distance (μm)	28.63 ± 1.91	48.54 ± 5.32	29.80 ± 3.45	41.38 ± 3.20	P=0.43 $F_{(1,9)}=0.67$	P=0.002 $F_{(1,9)}=18.49$	n.s
Morphological index	0.02 ± 0.002	0.02 ± 0.001	0.04 ± 0.002	0.04 ± 0.003	P=0.0002 $F_{(1,9)}=38.49$	P=0.86 $F_{(1,9)}=0.03$	n.s

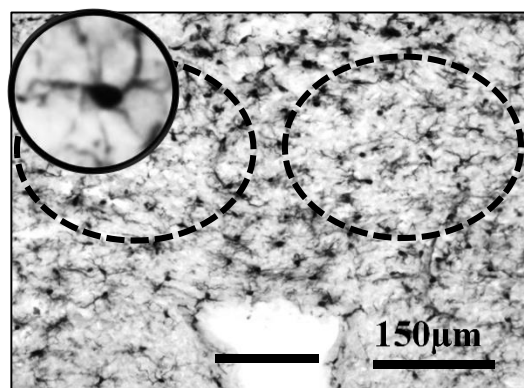
Normo means “Normocapnia”, Hyper means “Hypercapnia”



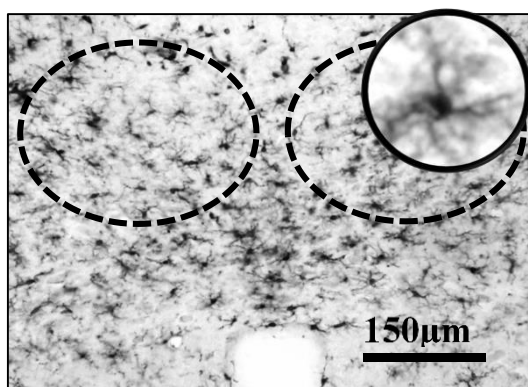
(b) Metaestrus Normocapnia



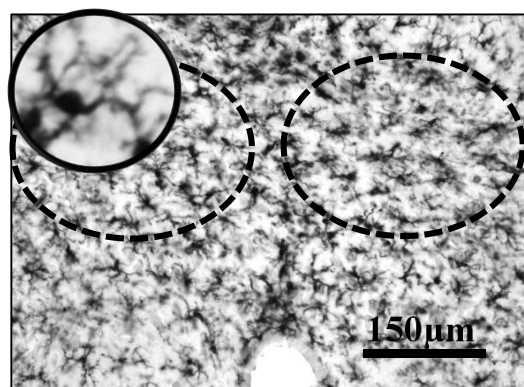
(c) OVX Normocapnia



(d) Metaestrus Hypercapnia



(e) OVX Hypercapnia



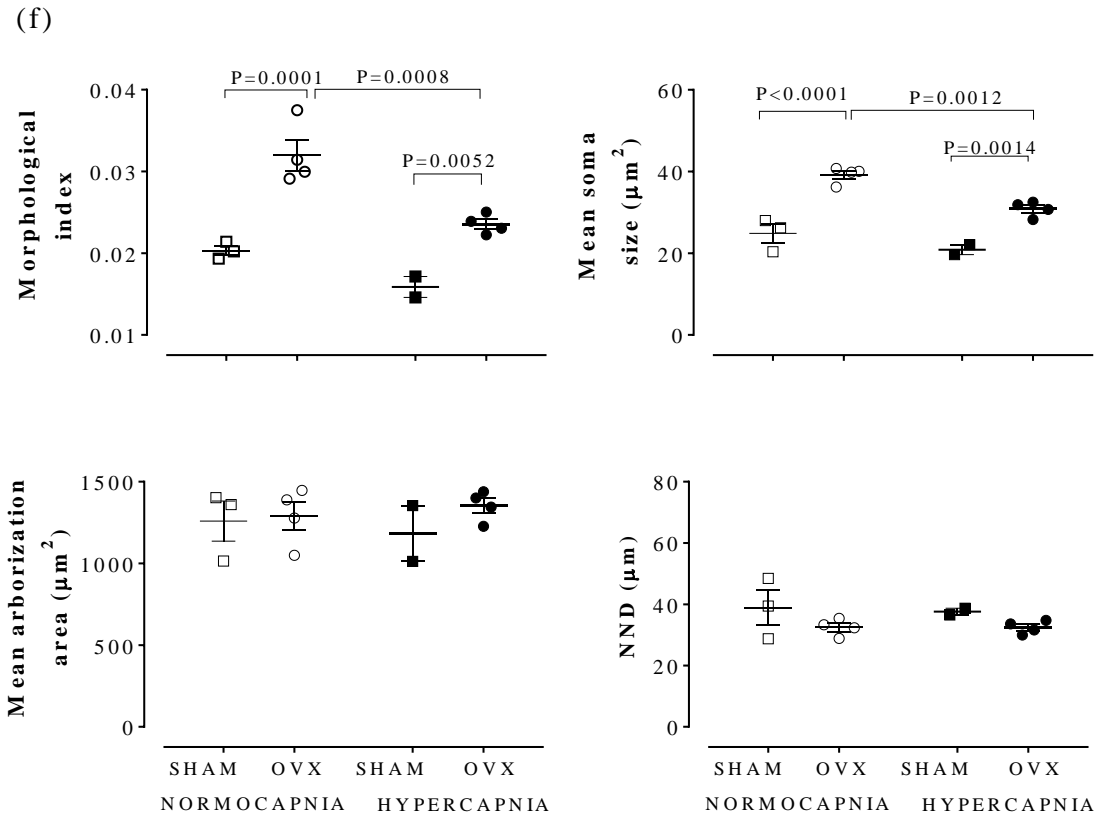
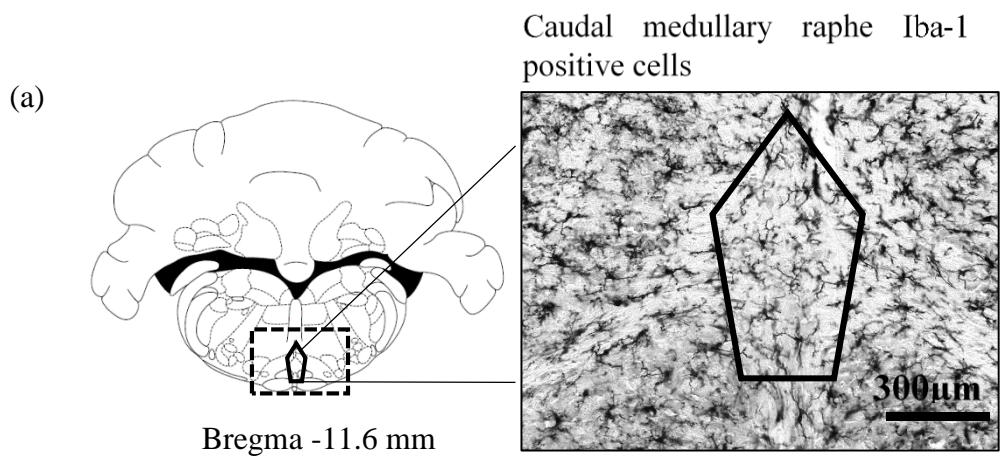
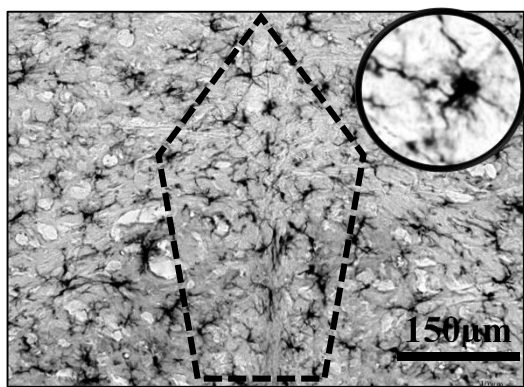


Fig. 1. (a) Schematic representation of the caudal nucleus of the solitary tract (cNTS Bregma - 14.08 mm; Paxinos and Watson, 1998) used to delineate where Iba-1 staining was analyzed. The photomicrographs of Iba-1-immunopositive cells obtained in medullary sections from females are represented. In each panel, the high-magnification inset illustrates representative morphology of microglia by (b) animals in control conditions (SHAM in normocapnia) (c) OVX in normocapnia (d) SHAM females submitted to hypercapnia (e) OVX animals submitted to hypercapnia (f) Microglia morphology of cNTS: Morphological index; Mean body area; Mean arborization area; Nearest neighbor distance (NND).

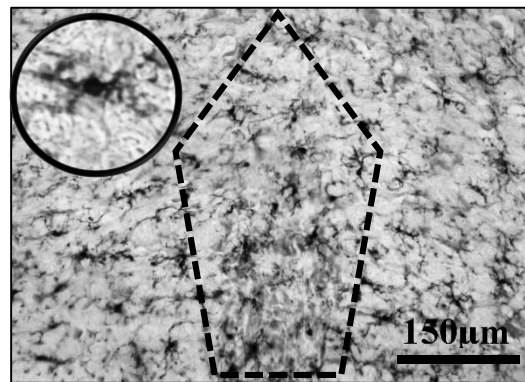
In the medullary raphe and PVN, neither OVX nor hypercapnia altered the morphology of microglial cells (Figures 2f and 3f).



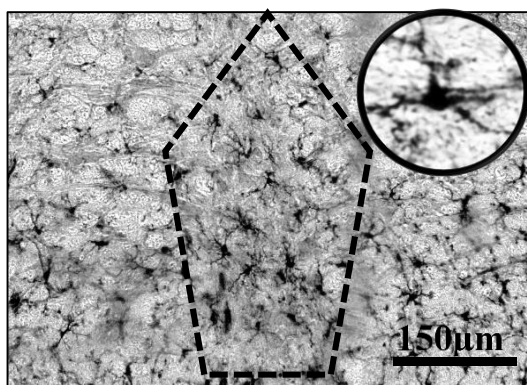
(b) Metaestrus Normocapnia



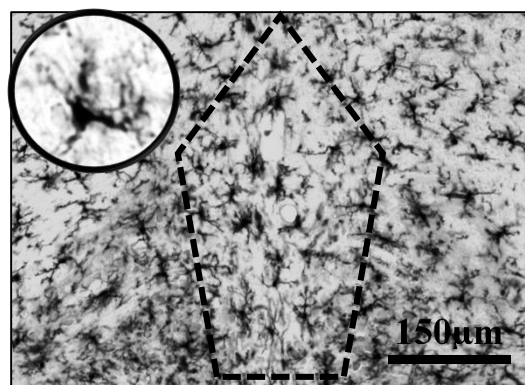
(c) OVX Normocapnia



(d) Metaestrus Hypercapnia



(e) OVX Hypercapnia



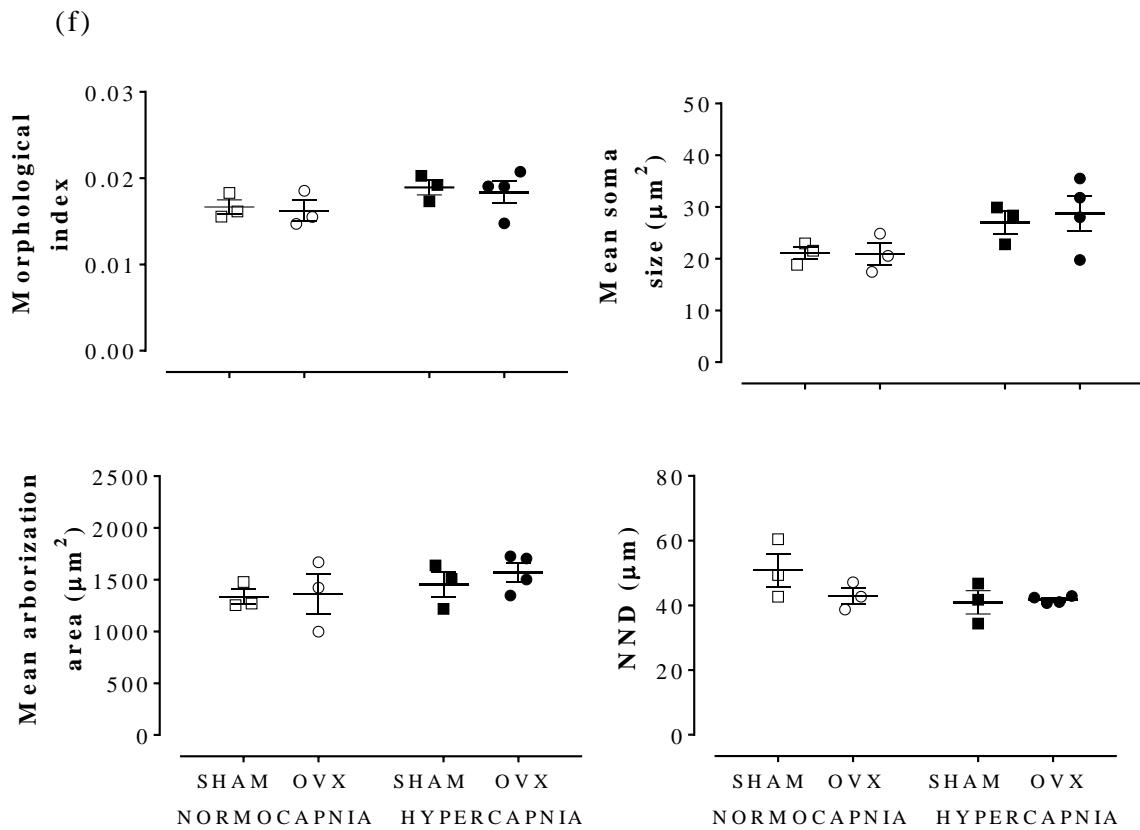
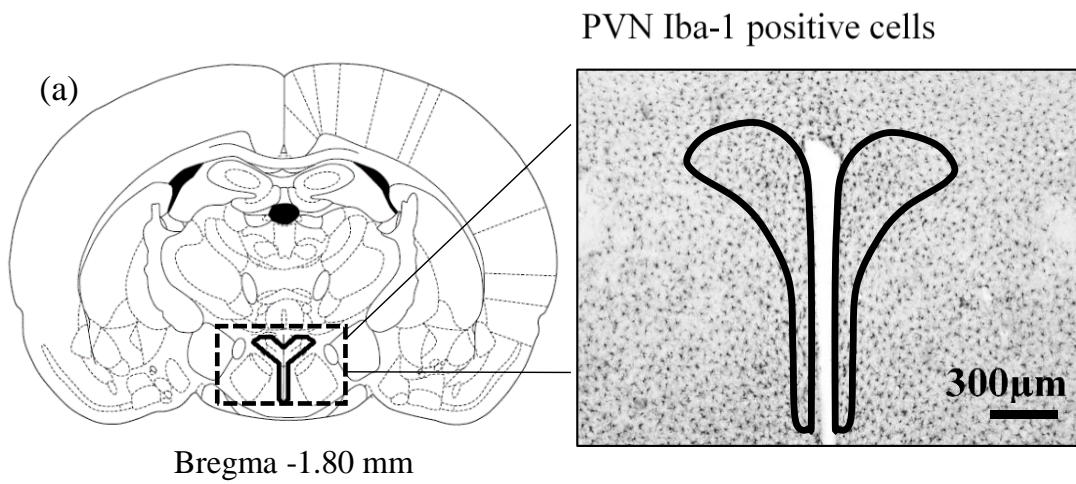
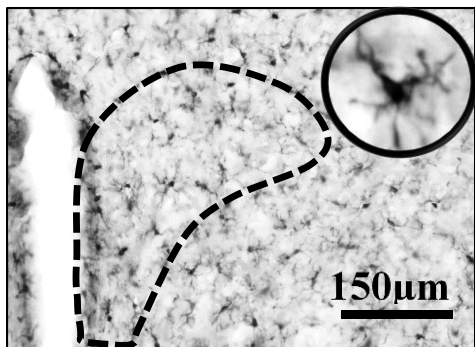


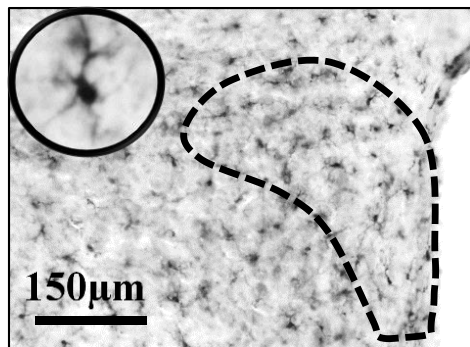
Fig. 2. (a) Schematic representation of the medullary raphe (Bregma -11.6 mm; Paxinos and Watson, 1998) where Iba-1 staining was analyzed. The photomicrographs of Iba-1-immunopositive cells obtained in medullary sections from females are represented. In each panel the high-magnification inset illustrates representative morphology of microglia by (b) animals in control conditions (SHAM in normocapnia) (c) OVX in normocapnia (d) SHAM females submitted to hypercapnia (e) OVX animals submitted to hypercapnia (f) Microglia morphology of medullary raphe: Morphological index; Mean body area; Mean arborization area; Nearest neighbor distance (NND).



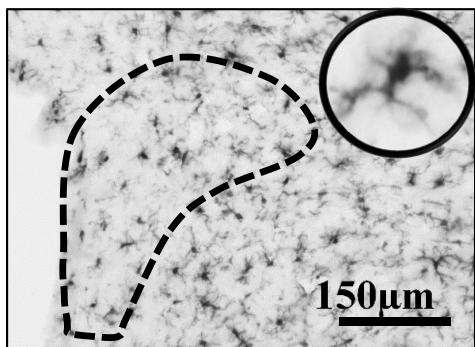
(b) Metaestrus Normocapnia



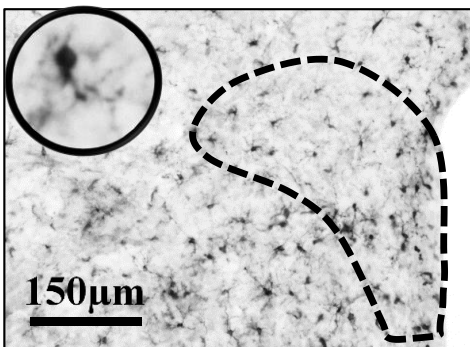
(c) OVX Normocapnia



(d) Metaestrus Hypercapnia



(e) OVX Hypercapnia



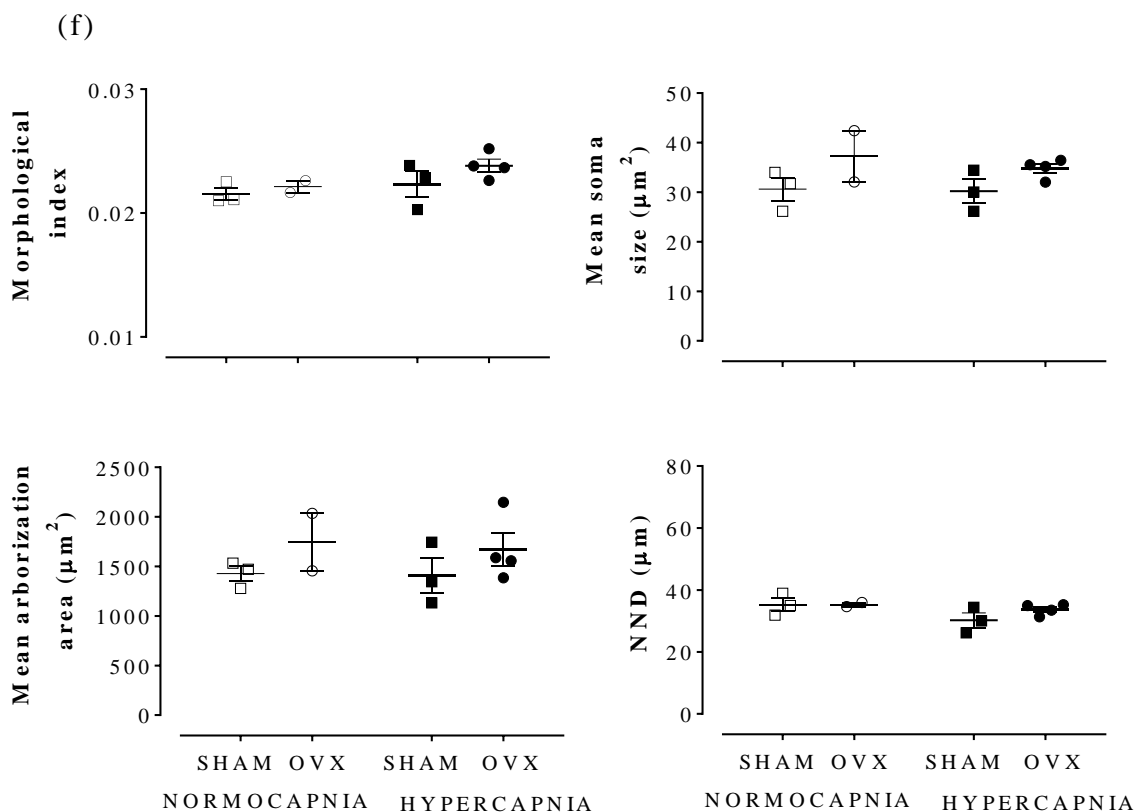
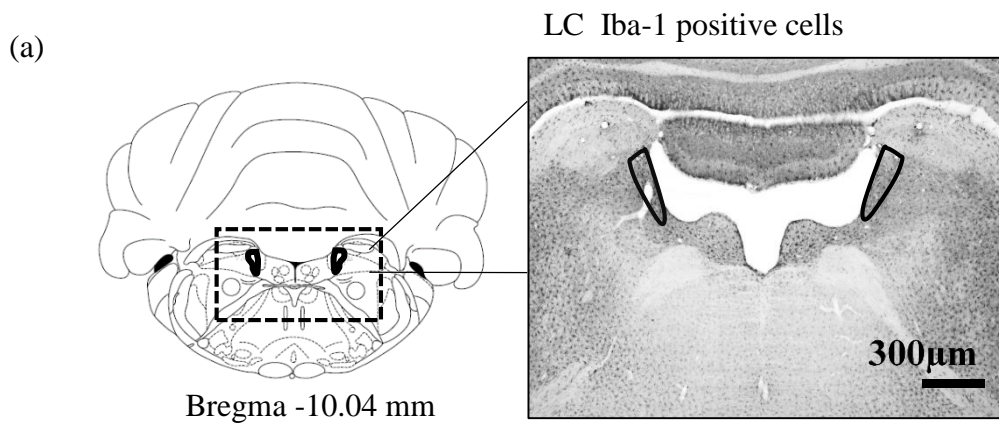
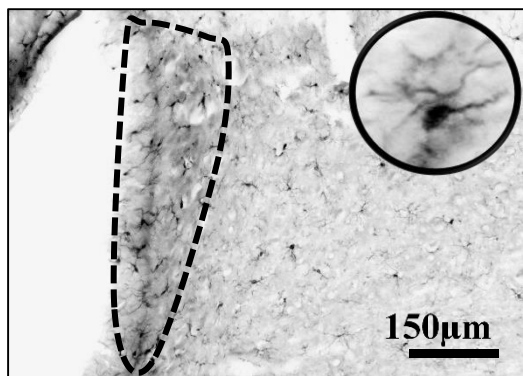


Fig. 3. (a) Schematic representation of the paraventricular nucleus (PVN; Bregma -1.80 mm; Paxinos and Watson, 1988) where Iba-1 staining was analyzed. The photomicrographs of Iba-1-immunopositive cells obtained in diencephalic sections from females are represented. In each panel, the high-magnification inset illustrates representative morphology of microglia by (b) animals in control conditions (SHAM in normocapnia) (c) OVX in normocapnia (d) SHAM females submitted to hypercapnia (e) OVX animals submitted to hypercapnia (f) Microglia morphology OF the paraventricular nucleus: Morphological index; Mean body area; Mean arborization area; Nearest neighbor distance (NND).

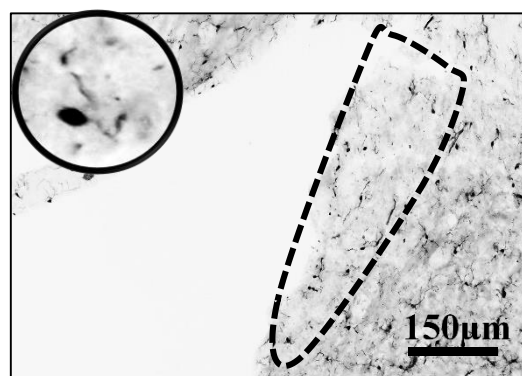
In the LC, OVX resulted in a 38.5% increase in morphological index; however, hypercapnic exposure had no effect (Figure 4f, Table 1). In OVX females, change in morphological index was due to a 32.6% decrease in mean arborization area for normocapnic group and 28.6% of hypercapnic group (Figure 4f). Mean soma size was not affected by ovariectomy nor hypercapnia (Figure 4f). Following hypercapnic exposure, the NND was greater in both SHAM and OVX groups (increases of 41% and 27.1%, respectively; Figure 4f).



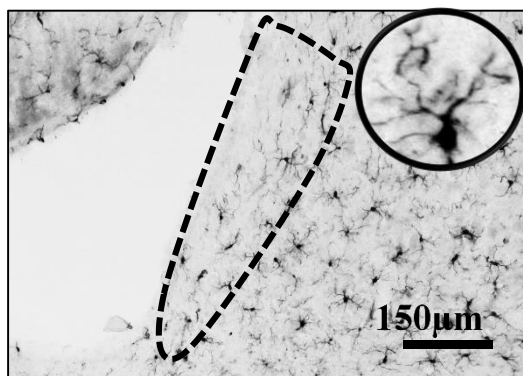
(b) Metaestrus Normocapnia



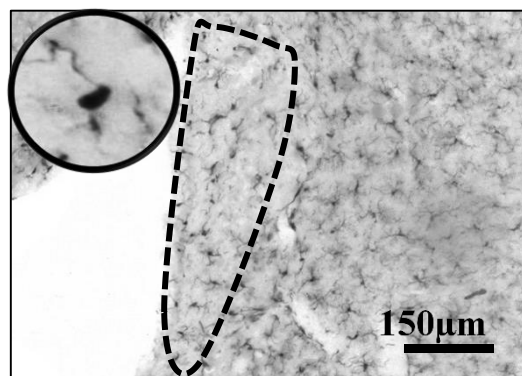
(c) OVX Normocapnia



(d) Metaestrus Hypercapnia



(e) OVX Hypercapnia



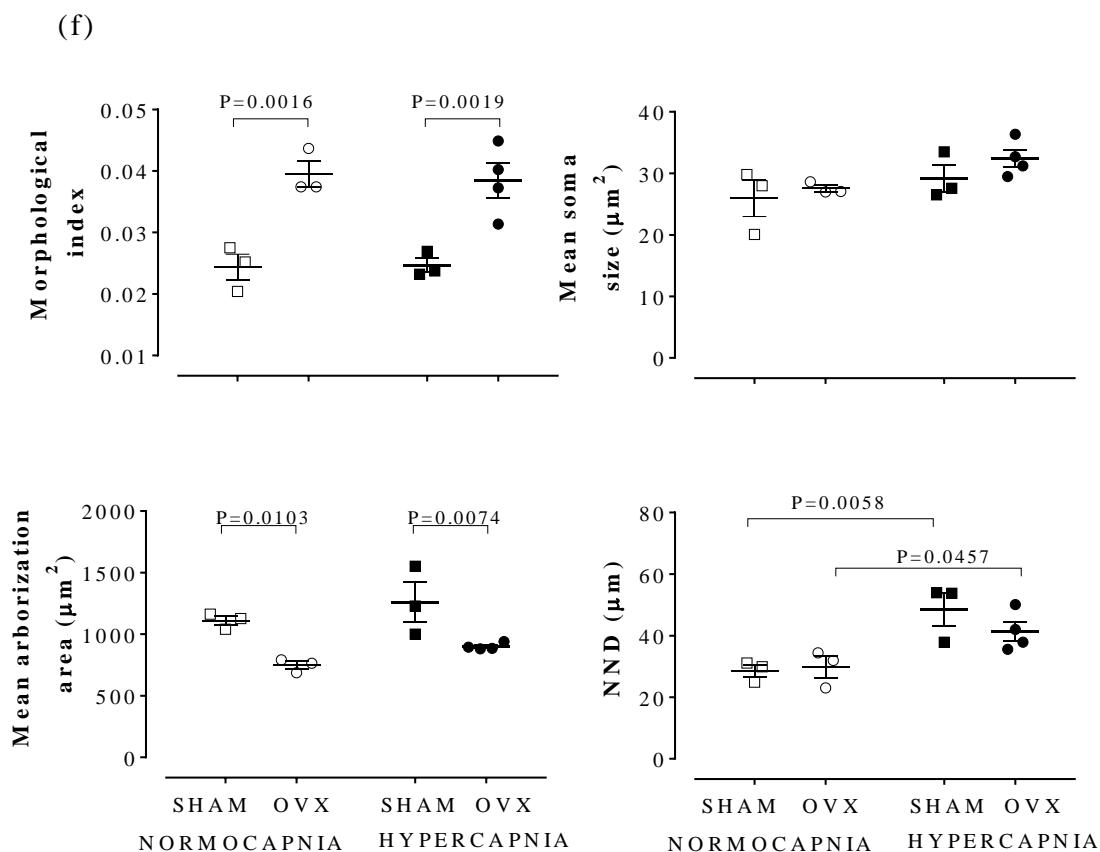


Fig. 4. (a) Schematic representation of the locus coeruleus (LC; Bregma -10.04; Paxinos and Watson, 1998) where Iba-1 staining was analyzed. The photomicrographs of Iba-1-immunopositive cells obtained in sections from females are represented. In each panel, the high-magnification inset illustrates representative morphology of microglia by (b) animals in control conditions (SHAM in normocapnia) (c) OVX in normocapnia (d) SHAM females submitted to hypercapnia (e) OVX animals submitted to hypercapnia (f) Microglia morphology of locus coeruleus: Morphological index; Mean body area; Mean arborization area; Nearest neighbor distance (NND).

4 DISCUSSION

Our understanding of the role of microglia in the respiratory network is limited and based mainly on research performed in immature rodents (BALDY et al., 2018; LOREA-HERNÁNDEZ et al., 2016; MACFARLANE; MAYER; LITVIN, 2016; TENORIO-LOPES et al., 2017a). Here, we show that neither OVX nor hypercapnia affected the density of microglia

in the cNTS, LC, medullary raphe or PVN of adult female rats. However, we observed that OVX augmented the morphological index of the cNTS and LC. This region-specific effect is in line with the notion that size and density of microglia are heterogeneous within the brain (LAWSON et al., 1990) and with the region-specific activation of brain areas by hypercapnic exposure (Berquin et al. 2000).

The means by which OVX augmented the morphological index differed between regions: in the cNTS, the change was mainly due to a larger soma size, whereas a reduction in mean arborization area was responsible for the increased morphological index in the LC. Given that an enlarged soma generally reflects an increase in transcriptional activity, this observation raises the possibility that the net outcome, in terms of substances produced (if any), differs between structures (HARRY, 2013; KOZLOWSKI; WEIMER, 2012). It is known that ovariectomy induces mitochondrial oxidative stress, apoptosis, and calcium ion influx in the hippocampus and dorsal root ganglion in rats (YAZĞAN; NAZIROĞLU, 2017), and the data reported here suggest that reactive microglia could contribute to this process. Reactive microglia are capable of producing inflammatory and toxic substances, such as ROS, proteases and cytokines, which may lead to neuronal apoptosis. These responses are important for defenses against pathogens and tumor cells, but can be dangerous in uncontrolled situations, as in neurodegenerative diseases (BUTOVSKY et al., 2006; DAVIES et al., 2017; HABIB; BEYER, 2015; LUO; CHEN, 2012). On the one hand, microglia can release anti-inflammatory substances, such as insulin like growth factor-1, and anti-inflammatory mediators, such as arginase-1, which are associated with antigen phagocytosis and tissue repair (MACHADO-PEREIRA et al., 2017). Microglial responses are complex, and without proper quantification, it is not possible to know which substances are released when faced with a given stimulus. While their immediate environment is an important determinant (FRANCO; FERNÁNDEZ-SUÁREZ, 2015; HABIB; BEYER, 2015; NAKAGAWA; CHIBA, 2015), the response to a

given stimulus may change depending on age or influence of sex hormones (CRAIN; NIKODEMOVA; WATTERS, 2009, 2013; LUO; CHEN, 2012; NISSEN, 2017; SOHRABJI; WILLIAMS, 2013) and the nature of the interactions between neurons and microglia in different areas of the brain (CRAIN; NIKODEMOVA; WATTERS, 2009, 2013; HABIB; BEYER, 2015; KIM; SON; MOOK-JUNG, 2013; LUO; CHEN, 2012; NISSEN, 2017; SOHRABJI; WILLIAMS, 2013).

Our data show that CO₂ exposure attenuates the rise in morphological index observed in OVX females, especially in the cNTS. Although not fully supported by a factorial interaction (CO₂ x OVX), this observation is nonetheless consistent with the results of Cummings et al. (2010), which show that CO₂ can suppress NF- κ B signaling and, thus, acts as an anti-inflammatory agent (CUMMINS et al., 2010). CO₂ exposure also increased microglial NND in the LC, thereby suggesting a rise in cell motility in this structure (STOWELL et al., 2017).

In male mice, microglial cells detect and translate hypercapnia to fear-associated CO₂ responsiveness in the subfornical organ (SFO; Larke Vollmer et al., 2016). Because hyperresponsiveness to CO₂ inhalation is a hallmark of panic disorder, these authors proposed that microglia contribute to the pathophysiology of this neurological disorder. It is important to keep in mind that the prevalence of panic disorder is ~2-times greater in women than in men, and here, none of the data obtained in females with SHAM surgery indicate that microglia were affected by CO₂ exposure. This could suggest that either these structures are not involved in panic disorder, or that our rats were not exposed to conditions necessary for the development of excessive chemosensitivity to CO₂ inhalation (e.g., early life stress; Battaglia, 2015).

The prevalence of obstructive sleep apnea rises following menopause. Hypertension and elevated responsiveness to respiratory stimuli are hallmarks of the disease, and in light of our data showing that OVX promotes microglial reactivity in the cNTS and LC (two structures

involved in regulating cardio-respiratory function), we propose that microglia contribute to this cardio-respiratory disorder. These data warrant further investigations of the role of microglia in respiratory disorders and sex-based differences in their manifestations.

5 CONCLUSION

In conclusion, we showed that OVX leads the reactive form of microglia in regions that are involved in the respiratory neurocircuitry such as cNTS and LC. This can open new insights for future studies about microglia changes in respiratory diseases or even their roles after menopause.

CONSIDERAÇÃO FINAL

Nos estudos encontrados na literatura até o presente momento que avaliaram o papel da T na ventilação demonstraram que o uso exógeno do hormônio levou a um aumento na ventilação em humanos ou gatos, quando comparados ao grupo hipogonadal ou castrado. Em nosso estudo usando ratos nós adicionamos a literatura a comparação do grupo castrado com reposição de T com o grupo gônada-intacto e ORX. Nós demonstramos que a reposição com T aumentou a resposta ventilatória à hipóxia e hipercapnia, sem alterar a taxa metabólica e a temperatura corporal, sugerindo que esse hormônio pode atuar diretamente no quimiorreflexo periférico e/ou central apresentando um efeito fisiológico específico.

Outros estudos utilizando homens com hipogonadismo, antes e depois da terapia de reposição de T e mostraram um número aumentado de apneias e hipopneias durante a reposição

de testosterona. Esses resultados sugerem que T participa de distúrbios respiratórios do sono. Assim, O fato de o tratamento com T poder levar a distúrbios respiratórios, é um aspecto muito importante a ser considerado.

Em fêmeas, nossos resultados mostram uma diminuição das respostas ventilatórias à hipóxia em ratas OVX em comparação com ratas intactas na fase de estro e que a reposição com E₂ e E₂P não mimetizou a resposta de um animal intacto. Vale ressaltar que a reposição hormonal foi efetiva, verificada através da citologia de esfregaços vaginais. Assim, sugerimos que, embora o estradiol e a progesterona sejam os principais hormônios gonodais femininos, outros hormônios ovarianos incluem andrógenos e hormônios peptídicos, como ativina, inibina, folistatina (KNIGHT; GLISTER, 2001; MUTTUKRISHNA; LEDGER, 2001) e hormônio anti-mülleriano (VIGIER et al., 1984), que por sua vez podem estar envolvidos nessa resposta. No entanto, ainda não existem estudos relatando o envolvimento desses hormônios na ventilação.

Nosso estudo contribuiu assim, para elucidar a modulação dos hormônios sexuais na ventilação, metabolismo, controle da temperatura corporal e diferenças de modulação monoaminérgica em regiões do SNC ligadas ao controle da V_E e T_C de machos e fêmeas não anestesiadas.

Adicionalmente, o presente estudo foi pioneiro na quantificação das monoaminas em diferentes regiões do SNC de fêmeas em diferentes fases do ciclo estral, ou na avaliação da influência dos hormônios gonodais em machos e fêmeas submetidos aos desafios gasosos de hipóxia ou hipercapnia. Demonstramos diferenças ligadas ao sexo quanto produção/metabolização/recaptação de monoaminas que por sua vez, podem estar ligada a diversas doenças como SIDS, desordem do pânico, dentre outras.

Finalmente fomos pioneiros também em demonstrar a reatividade da microglia em regiões respiratórias do SNC. No cNTS, observamos maior tamanho do corpo celular, enquanto uma

redução na área média de arborização foi responsável pelo aumento do índice morfológico no LC. Dado que um aumento do corpo celular geralmente reflete um aumento na atividade transcricional, esta observação levanta a possibilidade de que o resultado líquido, em termos de substâncias produzidas (se houver), difere entre as estruturas (HARRY, 2013; KOZLOWSKI; WEIMER, 2012). Entretanto nosso estudo neste tópico é inicial abrindo um caminho para novos estudos.

Assim, nossas investigações utilizando ratas e ratos como modelo experimental para avaliar os mecanismos de hormônios sexuais no sistema de controle respiratório, podem contribuir para o entendimento de diversas doenças sexualmente dimórficas, que por sua vez estão ligadas a alterações na quimiossensibilidade e resposta respiratória bem como servir de base para futuros estudos.

REFERÊNCIAS

AHUJA, D. et al. Ventilatory sensitivity to carbon dioxide before and after episodic hypoxia in women treated with testosterone. **Journal of Applied Physiology**, v. 102, n. 5, p. 1832–1838, maio 2007.

AITKEN, M. L. et al. Influence of body size and gender on control of ventilation. **Journal of Applied Physiology**, v. 60, n. 6, p. 1894–1899, 1986.

ALMEIDA, M. C. et al. Thermoeffector neuronal pathways in fever: a study in rats showing a new role of the locus coeruleus. **The Journal of physiology**, v. 558, n. Pt 1, p. 283–94, 2004.

ANDERSON, R. A. et al. Follistatin and activin A production by the male reproductive tract. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 13, n. 12, p. 3319–25, dez. 1998.

ANSORG, A. et al. Immunohistochemistry and Multiple Labeling with Antibodies from the Same Host Species to Study Adult Hippocampal Neurogenesis. **Journal of Visualized Experiments**, n. 98, p. 1–13, 2015.

ANTTALAINEN, U. et al. Impact of menopause on the manifestation and severity of sleep-disordered breathing. **Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica**, v. 85, n. 11, p. 1381–8, 2006.

ASAMI, T. et al. Sexually dimorphic gray matter volume reduction in patients with panic disorder. **Psychiatry Research: Neuroimaging**, v. 173, n. 2, p. 128–134, 30 ago. 2009.

ASTON-JONES, G. et al. Serotonin selectively attenuates glutamate-evoked activation of noradrenergic locus coeruleus neurons. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 11, n. 3, p. 760–9, 1 mar. 1991.

AZAGRA-CALERO, E. et al. Obstructive Sleep Apnea Syndrome (OSAS). Review of the literature. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal. Nov**, v. 117, n. 6, p. 925–9, 2012.

BAIRAM, A. et al. Enhancement of the breathing frequency response to hypoxia by neonatal caffeine treatment in adult male rats: The role of testosterone. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 165, n. 2–3, p. 261–265, 2009.

BALDESSARINI, R. J. Biogenic Amines and Behavior. **Annual Review of Medicine**, v. 23, n. 1, p. 343–354, fev. 1972.

BALDY, C. et al. The influence of sex and neonatal stress on medullary microglia in rat pups.

Experimental Physiology, v. 103, n. 9, p. 1192–1199, set. 2018.

BANGASSER, D. A. et al. Sexual dimorphism in locus coeruleus dendritic morphology: a structural basis for sex differences in emotional arousal. **Physiology & behavior**, v. 103, n. 3–4, p. 342–51, 1 jun. 2011.

BARKER, J. R.; THOMAS, C. F.; BEHAN, M. Serotonergic projections from the caudal raphe nuclei to the hypoglossal nucleus in male and female rats. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 165, n. 2–3, p. 175–184, 28 fev. 2009.

BARTLETT, D.; TENNEY, S. M. Control of breathing in experimental anemia. **Respiration physiology**, v. 10, n. 3, p. 384–95, out. 1970.

BATTAGLIA, M. Separation anxiety: at the neurobiological crossroads of adaptation and illness. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 277–85, set. 2015.

BAYLISS, D. A. et al. Progesterone stimulates respiration through a central nervous system steroid receptor-mediated mechanism in cat (respiratory control/phrenic nerve activity/blood pressure/RU 486). **Physiological Sciences**, v. 84, p. 7788–7792, 1 nov. 1987.

BEHAN, M. et al. Sex steroid hormones and the neural control of breathing. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 136, n. 2, p. 249–263, 2003.

BEHAN, M. et al. Neuronal Control of Breathing: Sex and Stress Hormones. **Comprehensive Physiology**, v. 1, n. 4, p. 2101–39, out. 2011.

BEHAN, M.; WENNINGER, J. M. Sex steroidal hormones and respiratory control. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 164, n. 1–2, p. 213–21, 10 dez. 2008.

BEN ACHOUR, S.; PASCUAL, O. Glia: The many ways to modulate synaptic plasticity. **Neurochemistry International**, v. 57, n. 4, p. 440–445, nov. 2010.

BERENDSEN, H. H. G.; KLOOSTERBOER, H. J. **Oestradiol and mirtazapine restore the disturbed tail-temperature of oestrogen-deficient rats** *European Journal of Pharmacology*. [s.l.: s.n.].

BERQUIN, P. et al. Brainstem and hypothalamic areas involved in respiratory chemoreflexes: A Fos study in adult rats. **Brain Research**, v. 857, n. 1–2, p. 30–40, fev. 2000.

BERTHON-JONES, M.; SULLIVAN, C. E. Ventilation and arousal responses to hypercapnia in normal sleeping humans. **J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol**, v. 57, n. 1, p. 59–

67, jul. 1984.

BIANCARDI, V. et al. Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO₂ drive to breathing. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 455, n. 6, p. 1119–1128, mar. 2008.

BIRZNIECE, V. et al. Neuroactive steroid effects on cognitive functions with a focus on the serotonin and GABA systems. **Brain Research Reviews**, v. 51, n. 2, p. 212–239, 2006.

BIXLER, E. O. et al. Prevalence of sleep-disordered breathing in women: effects of gender. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 163, n. 3 Pt 1, p. 608–613, 2001.

BLOCK, A. J. et al. Sleep apnea, hypopnea and oxygen desaturation in normal subjects. A strong male predominance. **The New England journal of medicine**, v. 300, n. 10, p. 513–7, 8 mar. 1979a.

BLOCK, A. J. et al. Sleep apnea, hypopnea and oxygen desaturation in normal subjects. A strong male predominance. **The New England journal of medicine**, v. 300, n. 10, p. 513–7, 8 mar. 1979b.

BODEN, A. G.; HARRIS, M. C.; PARKES, M. J. The preoptic area in the hypothalamus is the source of the additional respiratory drive at raised body temperature in anaesthetised rats. **Exp Physiol**, v. 85, n. 5, p. 527–37., 2000.

BOUKARI, R. et al. Membrane Progesterone Receptors α And β Contribute To Regulation Of Breathing In Adult Male And Female Mice. **American Thoracic Society**, p. A2558–A2558, 2016a.

BOUKARI, R. et al. Membrane progesterone receptor beta, but not alfa, in dorsal brain stem establishes sex-specific chemoreflex responses and reduces apnea frequency in adult mice. **Climate Change 2013 - The Physical Science Basis**, p. 1–30, 2016b.

BRINTON, R. D. et al. **Progesterone receptors: Form and function in brain** **Frontiers in Neuroendocrinology**, 2008.

BROWN, R. E.; GANDER, G. W.; GOODALE, F. Estrogen and Cortisone: Effects on Thermoregulation in the Female Rabbit. **Experimental Biology and Medicine**, v. 134, n. 1, p. 83–86, 1 maio 1970.

BROWN, R. M. et al. Orexin-1 receptor signalling in the prelimbic cortex and ventral tegmental area regulates cue-induced reinstatement of ethanol-seeking in IP rats. **Addiction Biology**, v.

21, n. 3, p. 603–612, 1 maio 2015.

BUTOVSKY, O. et al. Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. **Molecular and cellular neurosciences**, v. 31, n. 1, p. 149–60, jan. 2006.

CAHILL, L. Why sex matters for neuroscience. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 6, p. 477–484, 2006.

CANGUVEN, O.; ALBAYRAK, S. Do low testosterone levels contribute to the pathogenesis of asthma? **Medical Hypotheses**, v. 76, n. 4, p. 585–588, 2011.

CAPLLONCH-AMER, G. et al. Opposite effects of 17- β estradiol and testosterone on mitochondrial biogenesis and adiponectin synthesis in white adipocytes. **Journal of molecular endocrinology**, v. 52, n. 2, p. 203–14, abr. 2014.

CARAVITA, S. et al. Sex and acetazolamide effects on chemoreflex and periodic breathing during sleep at altitude. **Chest**, v. 147, n. 1, p. 120–131, jan. 2015.

CARLSSON, M.; CARLSSON, A. A regional study of sex differences in rat brain serotonin. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 12, n. 1, p. 53–61, 1 jan. 1988.

CARROLL, J. L.; KIM, I. Carotid chemoreceptor “resetting” revisited. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 185, n. 1, p. 30–43, 1 jan. 2013.

CEPHUS, J.-Y. et al. Testosterone Attenuates Group 2 Innate Lymphoid Cell-Mediated Airway Inflammation. **Cell reports**, v. 21, n. 9, p. 2487–2499, 2017.

CHAHROUR, M.; ZOGHBI, H. Y. The Story of Rett Syndrome: From Clinic to Neurobiology. **Neuron**, v. 56, n. 3, p. 422–437, nov. 2007.

CHOWDHURI, S. et al. Testosterone Conversion Blockade Increases Breathing Stability in Healthy Men during NREM Sleep. **Sleep**, v. 36, n. 12, p. 1793–1798, 2013.

CONNELL, S.; KARIKARI, C.; HOHMANN, C. F. Sex-specific development of cortical monoamine levels in mouse. **Developmental Brain Research**, v. 151, n. 1–2, p. 187–191, 19 jul. 2004.

COOMBER, P.; CREWS, D.; GONZALEZ-LIMA, F. Independent effects of incubation temperature and gonadal sex on the volume and metabolic capacity of brain nuclei in the leopard

gecko (*Eublepharis macularius*), a lizard with temperature-dependent sex determination. **Journal of Comparative Neurology**, v. 380, n. 3, p. 409–421, 14 abr. 1997.

CORCORAN, A. E.; MILSOM, W. K. Maturation changes in pontine and medullary alpha-adrenoceptor influences on respiratory rhythm generation in neonatal rats. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 165, n. 2, p. 195–201, 2009.

CRAIN, J. M.; NIKODEMOVA, M.; WATTERS, J. J. Expression of P2 nucleotide receptors varies with age and sex in murine brain microglia. **Journal of Neuroinflammation**, v. 6, n. 1, p. 24, 25 ago. 2009.

CRAIN, J. M.; NIKODEMOVA, M.; WATTERS, J. J. Microglia express distinct M1 and M2 phenotypic markers in the postnatal and adult central nervous system in male and female mice. **Journal of Neuroscience Research**, v. 91, n. 9, p. 1143–1151, set. 2013.

CREWS, D. et al. Brain organization in a reptile lacking sex chromosomes: effects of gonadectomy and exogenous testosterone. **Hormones and behavior**, v. 30, n. 4, p. 474–86, dez. 1996.

CRUZ, F. C. et al. Stress-induced cross-sensitization to amphetamine is related to changes in the dopaminergic system. **Journal of Neural Transmission**, v. 119, n. 4, p. 415–424, 2012.

CUMMINGS, K. J. et al. Postnatal loss of brainstem serotonin neurones compromises the ability of neonatal rats to survive episodic severe hypoxia. **The Journal of physiology**, v. 589, n. Pt 21, p. 5247–56, nov. 2011.

CUMMINS, E. P. et al. NF- κ B Links CO₂ Sensing to Innate Immunity and Inflammation in Mammalian Cells. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 7, p. 4439–4445, 1 out. 2010.

CUNNINGHAM, E. T.; BOHN, M. C.; SAWCHENKO, P. E. Organization of adrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 292, n. 4, p. 651–667, 22 fev. 1990.

DA SILVEIRA SCARPELLINI, C. et al. Role of preoptic opioid receptors in the body temperature reduction during hypoxia. **Brain Research**, v. 1286, p. 66–74, 2009.

DALLA, C. et al. Sex differences in the effects of two stress paradigms on dopaminergic neurotransmission. **Physiology & Behavior**, v. 93, n. 3, p. 595–605, 27 fev. 2008.

DALMAZ, Y. et al. Plasma Dopamine, Norepinephrine, Epinephrine and DOPAC Levels in Preterm Infants Prior to and Immediately after a Sleep Ventilation Hypercarbia Test. **Acta**

Paediatrica, v. 80, n. 11, p. 1008–1013, 1991.

DAVIES, D. S. et al. Microglia show altered morphology and reduced arborization in human brain during aging and Alzheimer's disease. **Brain Pathology**, v. 27, n. 6, p. 795–808, nov. 2017.

DE CARVALHO, D. et al. Role of neurokinin-1 expressing neurons in the locus coeruleus on ventilatory and cardiovascular responses to hypercapnia. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 172, n. 1–2, p. 24–31, 30 jun. 2010.

DE CARVALHO, D. et al. Role of sex hormones in hypercapnia-induced activation of the locus coeruleus in female and male rats. **Neuroscience**, v. 313, p. 36–45, 2015.

DE CARVALHO, D. et al. Participation of locus coeruleus in breathing control in female rats. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 245, p. 29–36, 4 nov. 2017.

DE MARCO, R. et al. Differences in incidence of reported asthma related to age in men and women: A retrospective analysis of the data of the European Respiratory Health Survey. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 162, n. 1, p. 68–74, 14 jul. 2000.

DE SOUZA MORENO, V. et al. Serotonergic mechanisms on breathing modulation in the rat locus coeruleus. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 459, n. 3, p. 357–368, 21 fev. 2010.

DEAN, J. B.; PUTNAM, R. W. The caudal solitary complex is a site of central CO₂ chemoreception and integration of multiple systems that regulate expired CO₂. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 173, n. 3, p. 274–287, 31 out. 2010.

DEJOURS, P. **Principles of comparative respiratory physiology**. [s.l.] Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1981.

DEMPSEY, J. A.; OLSON, E. B.; SKATRUD, J. B. Hormones and Neurochemicals in the Regulation of Breathing. In: **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011.

DICKINSON, S. L.; CURZON, G. Roles of dopamine and 5-hydroxytryptamine in stereotyped and non-stereotyped behaviour. **Neuropharmacology**, v. 22, n. 7, p. 805–12, jul. 1983.

DICKINSON, S. L.; CURZON, G. 5-Hydroxytryptamine-mediated behaviour in male and female rats. **Neuropharmacology**, v. 25, n. 7, p. 771–6, jul. 1986.

DOBBINS, E. G.; FELDMAN, J. L. Brainstem network controlling descending drive to phrenic motoneurons in rat. **The Journal of comparative neurology**, v. 347, n. 1, p. 64–86, 1 set. 1994.

DOMBOVY, M. L. et al. Exercise performance and ventilatory response in the menstrual cycle. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 19, n. 2, p. 111–7, abr. 1987.

DORRINGTON, J. H.; FRITZ, I. B. Cellular localization of 5 α -reductase and 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase in the seminiferous tubule of the rat testis. **Endocrinology**, v. 96, n. 4, p. 879–889, 1 abr. 1975.

DOUGLAS, N. J. et al. Hypercapnic ventilatory response in sleeping adults. **The American review of respiratory disease**, v. 126, n. 5, p. 758–62, 1982.

DUNCAN, J. R.; BYARD, R. W. **Sudden Infant Death Syndrome: An Overview**. [s.l.] University of Adelaide Press, 2018.

DUTTON, K.; BLANKSBY, B. A.; MORTON, A. R. CO₂ sensitivity changes during the menstrual cycle. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 67, n. 2, p. 517–22, ago. 1989.

ELAM, M. et al. Hypercapnia and hypoxia: chemoreceptor-mediated control of locus coeruleus neurons and splanchnic, sympathetic nerves. **Brain research**, v. 222, n. 2, p. 373–81, 19 out. 1981.

ELAM, M.; CLARK, D.; SVENSSON, T. H. Electrophysiological effects of the enantiomers of 3-PPP on neurons in the locus coeruleus of the rat. **Neuropharmacology**, v. 25, n. 9, p. 1003–8, set. 1986.

EMERY, M. J.; HLASTALA, M. P.; MATSUMOTO, A. M. Depression of hypercapnic ventilatory drive by testosterone in the sleeping infant primate. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 76, n. 4, p. 1786–93, abr. 1994.

ENGLAND, S. J.; FARHI, L. E. Fluctuations in alveolar CO₂ and in base excess during the menstrual cycle. **Respiration Physiology**, v. 26, n. 2, p. 157–161, 1976.

FABRIS, G.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; BRANCO, L. G. Role of nitric oxide in hypoxia-induced hyperventilation and hypothermia: participation of the locus coeruleus. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 32, n. 11, p. 1389–98, nov. 1999.

FOGEL, R. B. et al. Increased prevalence of obstructive sleep apnea syndrome in obese women

with polycystic ovary syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, n. 3, p. 1175–1180, 2001.

FOLMAN, Y.; HALTMEYER, G.; EIK-NES, K. Production and secretion of 5 alpha dihydrotestosterone by the dog testis. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 222, n. 3, p. 653–656, 1972.

FORUM OF INTERNATIONAL RESPIRATORY SOCIETIES. **The Global Impact of Respiratory Disease – Second Edition**. (Sheffield, Ed.)European Respiratory Society, 2017Disponível em:

<https://www.who.int/gard/publications/The_Global_Impact_of_Respiratory_Disease.pdf>.

Acesso em: 7 dez. 2018

FOURNIER, S. et al. Testosterone potentiates the hypoxic ventilatory response of adult male rats subjected to neonatal stress. **Experimental Physiology**, v. 99, n. 5, p. 824–834, 2014.

FOURNIER, S. et al. Neonatal stress affects the aging trajectory of female rats on the endocrine, temperature, and ventilatory responses to hypoxia. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 308, n. 7, p. R659-67, abr. 2015.

FRANCO, R.; FERNÁNDEZ-SUÁREZ, D. Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 131, p. 65–86, 1 ago. 2015.

FUXE, D. Evidence for existence of monoamine-containing neurons in central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. **Acta physiol. scand.**, v. 62, p. 1–55, 1964.

GAO, W.; BOHL, C. E.; DALTON, J. T. Chemistry and structural biology of androgen receptor. **Chemical reviews**, v. 105, n. 9, p. 3352–70, set. 2005.

GARCIA III, A. J. et al. Post-hypoxic recovery of respiratory rhythm generation is gender dependent. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e60695, 2013.

GENEST, S. et al. Neonatal maternal separation induces sex-specific augmentation of the hypercapnic ventilatory response in awake rat. **Journal of Applied Physiology**, v. 102, n. 4, p. 1416–1421, 2007.

GOLDBERG, S. et al. Analysis of Hypoxic and Hypercapnic Ventilatory Response in Healthy Volunteers. **PloS one**, v. 12, n. 1, p. e0168930, 2017.

GOLDMAN, J. M.; MURR, A. S.; COOPER, R. L. The rodent estrous cycle: characterization

of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. **Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology**, v. 80, n. 2, p. 84–97, abr. 2007.

GONZALES, G. F. et al. Serum testosterone levels and score of chronic mountain sickness in Peruvian men natives at 4340m. **Andrologia**, v. 43, n. 3, p. 189–195, 2011.

GORMAN, J. M. et al. Anxiogenic effects of CO₂ and hyperventilation in patients with panic disorder. **American Journal of Psychiatry**, v. 151, n. 4, p. 547–553, 1994a.

GORMAN, J. M. et al. Anxiogenic effects of CO₂ and hyperventilation in patients with panic disorder. **American Journal of Psychiatry**, v. 151, n. 4, p. 547–553, abr. 1994b.

GORSKI, R. A. et al. Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. **Brain Research**, v. 148, n. 2, p. 333–346, 16 jun. 1978.

GORSKI, R. A. et al. Evidence for the existence of a sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 193, n. 2, p. 529–539, 15 set. 1980.

GORTNER, L.; SHEN, J.; TUTDIBI, E. **Sexual dimorphism of neonatal lung development** *Klinische Padiatrie*, 2013.

GRIFFITH JR, F. R. et al. Studies in human physiology: III. Alveolar Air and Blood Gas Capacity. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 89, n. 2, p. 449–470, 1929.

GUYENET, P. G. et al. Central respiratory control of A5 and A6 pontine noradrenergic neurons. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 264, n. 6, p. R1035–R1044, jun. 1993.

GUYENET, P. G.; BAYLISS, D. A. Neural Control of Breathing and CO₂ Homeostasis. **Neuron**, v. 87, n. 5, p. 946–61, 2 set. 2015.

HABIB, P. et al. Sex steroid hormone-mediated functional regulation of microglia-like BV-2 cells during hypoxia. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 138, p. 195–205, nov. 2013.

HABIB, P.; BEYER, C. Regulation of brain microglia by female gonadal steroids. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 146, p. 3–14, 1 fev. 2015.

HANNHART, B.; PICKETT, C. K.; MOORE, L. G. Effects of estrogen and progesterone on carotid body neural output responsiveness to hypoxia. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 68, n. 5, p. 1909–16, maio 1990.

HANSBERG-PASTOR, V. et al. Sex hormones regulate cytoskeletal proteins involved in brain plasticity. **Frontiers in Psychiatry**, v. 6, n. NOV, 2015.

HARRY, G. J. Microglia during development and aging. **Pharmacology & therapeutics**, v. 139, n. 3, p. 313–26, set. 2013.

HART, A. D. et al. Age related changes in microglial phenotype vary between CNS regions: grey versus white matter differences. **Brain, behavior, and immunity**, v. 26, n. 5, p. 754–65, jul. 2012.

HASSELBACH, K. A.; GAMMELTOFT, S. A. Die Neutralitätsregelung des graviden organismus. **Biochemistry Z**, v. 68, p. 206–264, 1915.

HAUCK, F. R. Changing epidemiology. **Sudden infant death syndrome: problems, progress and possibilities**. London: **Arnold**, p. 31–57, 2001.

HAYWOOD, S. A. et al. Fluctuating estrogen and progesterone receptor expression in brainstem norepinephrine neurons through the rat estrous cycle. **Endocrinology**, v. 140, n. 7, p. 3255–3263, jul. 1999.

HELENA, C. et al. Effects of estrogen receptor alpha and beta gene deletion on estrogenic induction of progesterone receptors in the locus coeruleus in female mice. **Endocrine**, v. 36, n. 1, p. 169–77, 24 ago. 2009.

HILAIRE, G. et al. Modulation of the respiratory rhythm generator by the pontine noradrenergic A5 and A6 groups in rodents. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 143, n. 2–3, p. 187–197, 15 nov. 2004.

HILAIRE, G. Endogenous noradrenaline affects the maturation and function of the respiratory network: Possible implication for SIDS. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 126–127, p. 320–331, 2006.

HIRSHMAN, C. A.; MCCULLOUGH, R. E.; WEIL, J. V. Normal values for hypoxic and hypercapnic ventilatory drives in man. **Journal of Applied Physiology**, v. 38, n. 6, p. 1095–1098, jun. 1975.

HODGES, M. R. et al. Ventilatory phenotypes among four strains of adult rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 93, n. 3, 2002.

HODGES, M. R. et al. **Adult Pet-1 knockout mice exhibit an attenuated hypercapnic ventilatory response**. Soc Neurosci Abstr. **Anais...**2005

HODGES, M. R.; BEST, S.; RICHERSON, G. B. Altered ventilatory and thermoregulatory control in male and female adult Pet-1 null mice. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 177, n. 2, p. 133–140, jul. 2011.

HODGES, M. R.; RICHERSON, G. B. The role of medullary serotonin (5-HT) neurons in respiratory control: contributions to eupneic ventilation, CO₂ chemoreception, and thermoregulation. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 108, n. 5, p. 1425–32, maio 2010.

HOLLEY, H. S.; BEHAN, M.; WENNINGER, J. M. Age and sex differences in the ventilatory response to hypoxia and hypercapnia in awake neonatal, pre-pubertal and young adult rats. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 180, n. 1, p. 79–87, 15 jan. 2012.

HUEY, K. A. et al. Ventilatory responses to acute and chronic hypoxia in mice: effects of dopamine D(2) receptors. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 89, n. 3, p. 1142–50, set. 2000.

JAFFE, F.; MARKOV, D.; DOGHRAMJI, K. Sleep-disordered breathing: in depression and schizophrenia. **Psychiatry (Edgmont (Pa. : Township))**, v. 3, n. 7, p. 62–8, jul. 2006.

JENSEN, D. et al. Chemoreflex control of breathing during wakefulness in healthy men and women. **Journal of Applied Physiology**, v. 98, n. 3, p. 822–828, mar. 2005.

JENSEN, D. Effects of human pregnancy on the ventilatory chemoreflex response to carbon dioxide. **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, n. 5, p. R1369–R1375, maio 2005.

JENSEN, D. et al. Physiological mechanisms of hyperventilation during human pregnancy. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 161, n. 1, p. 76–86, 20 mar. 2008.

JIANG, C. et al. Breathing abnormalities in animal models of Rett syndrome a female neurogenetic disorder. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 245, p. 45–52, 2017.

JOSEPH, V. et al. Dopaminergic metabolism in carotid bodies and high-altitude acclimatization in female rats. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 282, n. 3, p. R765-73, mar. 2002.

JOSEPH, V. et al. Expression of sex-steroid receptors and steroidogenic enzymes in the carotid body of adult and newborn male rats. **Brain Research**, v. 1073–1074, n. 1, p. 71–82, 16 fev. 2006.

JOSEPH, V.; NIANE, L. M.; BAIRAM, A. Antagonism of progesterone receptor suppresses carotid body responses to hypoxia and nicotine in rat pups. **Neuroscience**, v. 207, p. 103–109, 2012.

JURASKA, J. M. Sex differences in “cognitive” regions of the rat brain. **Psychoneuroendocrinology**, v. 16, n. 1–3, p. 105–119, 1 jan. 1991.

KAEHLER, S. T.; SINGEWALD, N.; PHILIPPU, A. Dependence of serotonin release in the locus coeruleus on dorsal raphe neuronal activity. **Naunyn-Schmiedeberg’s archives of pharmacology**, v. 359, n. 5, p. 386–93, maio 1999.

KALIL, B. et al. Role of sex steroids in progesterone and corticosterone response to acute restraint stress in rats: sex differences. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, v. 16, n. 4, p. 452–60, 2013.

KAPSIMALIS, F.; KRYGER, M. H. Gender and Obstructive Sleep Apnea Syndrome, Part 1: Clinical Features. **Sleep**, v. 25, 2002.

KC, P. et al. Phenotypic traits of the hypothalamic PVN cells innervating airway-related vagal preganglionic neurons. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 154, n. 3, p. 319–330, 2006.

KELLY, H.; SHANNON, C. Long-Term Congenital Follow-up of Children Central Hypoventilation With Syndrome. v. 12, n. 3, 1987.

KELLY, S. J.; OSTROWSKI, N. L.; WILSON, M. A. Gender Differences in Brain and Behavior: Hormonal and Neural Bases. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 64, n. 4, p. 655–664, 1 dez. 1999.

KENT, S.; HURD, M.; SATINOFF, E. Interactions between body temperature and wheel running over the estrous cycle in rats. **Physiology & behavior**, v. 49, n. 6, p. 1079–84, jun. 1991.

KESSLER, R. C. et al. Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States. Results from the National Comorbidity Survey. **Archives of general psychiatry**, v. 51, n. 1, 1 jan. 1994.

KIM, K. H.; SON, S. M.; MOOK-JUNG, I. Contributions of microglia to structural synaptic plasticity. **Journal of experimental neuroscience**, v. 7, p. 85–91, 2013.

KIM, S. U.; DE VELLIS, J. Microglia in health and disease. **Journal of Neuroscience**

Research, v. 81, n. 3, p. 302–313, 1 ago. 2005.

KING, T. L. et al. Catecholaminergic neurons projecting to the paraventricular nucleus of the hypothalamus are essential for cardiorespiratory adjustments to hypoxia. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 309, n. 7, p. R721-31, out. 2015.

KINNEY, H. C. et al. The brainstem and serotonin in the sudden infant death syndrome. **Annual review of pathology**, v. 4, p. 517–50, 2009.

KINNEY, H. C. et al. **Abnormalities of the Hippocampus in Sudden and Unexpected Death in Early Life**. [s.l.] University of Adelaide Press, 2018.

KINNEY, H. C.; FILIANO, J. J.; WHITE, W. F. Medullary Serotonergic Network Deficiency in the Sudden Infant Death Syndrome: Review of a 15-Year Study of a Single Dataset. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 60, n. 3, p. 228–247, 1 mar. 2001.

KIPP, M.; BEYER, C. Impact of sex steroids on neuroinflammatory processes and experimental multiple sclerosis. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 30, n. 2, p. 188–200, jul. 2009.

KLINGE, C. M. Estrogenic control of mitochondrial function and biogenesis. **Journal of cellular biochemistry**, v. 105, n. 6, p. 1342–51, 15 dez. 2008.

KNIGHT, P. G.; GLISTER, C. **Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary** *Reproduction*, 2001.

KNUTTGEN, H. G.; EMERSON, K. Physiological response to pregnancy at rest and during exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 36, n. 5, p. 549–553, 2017.

KOEPCHEN, H. P. Effect of cortisone and testosterone on respiration. **Pflugers Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere**, v. 257, n. 2, p. 144–54, 1953.

KORF, J.; AGHAJANIAN, G. K.; ROTH, R. H. Stimulation and destruction of the locus coeruleus: opposite effects on 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol sulfate levels in the rat cerebral cortex. **European journal of pharmacology**, v. 21, n. 3, p. 305–10, mar. 1973.

KORZHEVSKII, D. E.; KIRIK, O. V. Brain Microglia and Microglial Markers. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, 2016.

KOZLOWSKI, C.; WEIMER, R. M. An automated method to quantify microglia morphology and application to monitor activation state longitudinally in vivo. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. e31814,

2012.

KRITZER, M. F.; CREUTZ, L. M. Region and sex differences in constituent dopamine neurons and immunoreactivity for intracellular estrogen and androgen receptors in mesocortical projections in rats. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 28, n. 38, p. 9525–35, 17 set. 2008.

KUNITOMO, F. et al. Sex differences in awake ventilatory drive and abnormal breathing during sleep in eucapnic obesity. **Chest**, v. 93, n. 5, p. 968–76, maio 1988.

LARKE VOLLMER, L. et al. Archival Report Microglial Acid Sensing Regulates Carbon Dioxide-Evoked Fear. **Biological Psychiatry**, v. 80, p. 541–551, 2016.

LASOTA, A.; DANOWSKA-KLONOWSKA, D. Experimental osteoporosis--different methods of ovariectomy in female white rats. **Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku (1995)**, v. 49 Suppl 1, p. 129–31, 2004.

LAWSON, L. J. et al. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. **Neuroscience**, v. 39, n. 1, p. 151–170, 1 jan. 1990.

LI, A.; NATTIE, E. Catecholamine neurones in rats modulate sleep, breathing, central chemoreception and breathing variability. **The Journal of Physiology**, v. 570, n. 2, p. 385–396, jan. 2006.

LIN, N. U.; WINER, E. P. Advances in adjuvant endocrine therapy for postmenopausal women. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 26, n. 5, p. 798–805, 10 fev. 2008.

LIU, P. Y. et al. The Short-Term Effects of High-Dose Testosterone on Sleep, Breathing, and Function in Older Men. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 8, p. 3605–3613, 1 ago. 2003.

LIU, P. Y.; VELDHUIS, J. D. Chapter 12 - Hypothalamo-Pituitary Unit, Testis, and Male Accessory Organs. In: **Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management: Eighth Edition**. [s.l.] Content Repository Only!, 2018. p. 285-300.e8.

LOISEAU, C. et al. The progestin etonogestrel enhances the respiratory response to metabolic acidosis in newborn rats. Evidence for a mechanism involving supramedullary structures. **Neuroscience Letters**, v. 567, p. 63–67, 1 maio 2014.

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

LOZO, T. et al. Sex differences in sleep disordered breathing in adults. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 245, p. 65–75, 2017.

LUO, X.-G.; CHEN, S.-D. The changing phenotype of microglia from homeostasis to disease. **Translational neurodegeneration**, v. 1, n. 1, p. 9, 24 abr. 2012.

LUQUE, J. M. et al. Sexual dimorphism of the dopamine-beta-hydroxylase-immunoreactive neurons in the rat locus ceruleus. **Brain research. Developmental brain research**, v. 67, n. 2, p. 211–5, 19 jun. 1992.

MA, Y.-Y. et al. Sexual dimorphisms of dopaminergic neurons in rat substantia nigra. **Acta physiologica Sinica**, v. 59, n. 6, p. 753–8, 25 dez. 2007.

MACFARLANE, P. M.; MAYER, C. A.; LITVIN, D. G. Microglia modulate brainstem serotonergic expression following neonatal sustained hypoxia exposure: implications for sudden infant death syndrome. **The Journal of Physiology**, v. 594, n. 11, p. 3079–3094, 1 jun. 2016.

MACHADO-PEREIRA, M. et al. Anti-Inflammatory Strategy for M2 Microglial Polarization Using Retinoic Acid-Loaded Nanoparticles. **Mediators of inflammation**, v. 2017, p. 6742427, 2017.

MACNUTT, M. J. et al. Resting and exercise ventilatory chemosensitivity across the menstrual cycle. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 112, n. 5, p. 737–47, mar. 2012.

MACRAE, D. J.; PALAVRADJI, D. Maternal acid-base changes in pregnancy. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 74, n. 1, p. 11–16, 1 fev. 1967.

MAGNUS-LEVY, A. Stoffwechsel und Nahrungsbedarf in der Schwangerschaft. **Z. Geburtshilfe Gynekol**, v. 52, p. 116–124, 1904.

MARCUS, C. L. et al. Developmental pattern of hypercapnic and hypoxic ventilatory responses from childhood to adulthood. **Journal of Applied Physiology**, v. 76, n. 1, p. 314–320, jan. 1994.

MARQUES, D. A. et al. Ventilatory, metabolic, and thermal responses to hypercapnia in female rats: effects of estrous cycle, ovariectomy, and hormonal replacement. **Journal of Applied**

Physiology, v. 119, n. 1, p. 61–68, 1 jul. 2015.

MARQUES, D. A. et al. Influence of estrous cycle hormonal fluctuations and gonadal hormones on the ventilatory response to hypoxia in female rats. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 469, n. 10, p. 1277–1286, 28 out. 2017.

MARRONE, B. L.; GENTRY, T. R.; WADE, G. N. Gonadal hormones and body temperature in rats: Effects of estrous cycles, castration and steroid replacement. **Physiology and Behavior**, v. 17, n. 3, p. 419–425, 1 set. 1976.

MASGRAU, R. et al. Should We Stop Saying ‘Glia’ and ‘Neuroinflammation’? **Trends in Molecular Medicine**, v. 23, n. 6, p. 486–500, 2017.

MATEIKA, J. H. et al. Peripheral chemoreflex responsiveness is increased at elevated levels of carbon dioxide after episodic hypoxia in awake humans. **Journal of Applied Physiology**, v. 96, n. 3, p. 1197–1205, 2004.

MATSUMOTO, A. M. et al. Testosterone replacement in hypogonadal men: effects on obstructive sleep apnoea, respiratory drives, and sleep. **Clinical Endocrinology**, v. 22, n. 6, p. 713–721, 1 jun. 1985.

MATUSZCZAK, E. et al. Serum AMH in Physiology and Pathology of Male Gonads. **International journal of endocrinology**, v. 2013, p. 128907, 24 out. 2013.

MAYERHOFER, A. et al. Testis of prepubertal rhesus monkeys receives a dual catecholaminergic input provided by the extrinsic innervation and an intragonadal source of catecholamines. **Biology of reproduction**, v. 55, n. 3, p. 509–18, set. 1996.

MILEVA, Z.; MALEEVA, A. The serum testosterone level of patients with bronchial asthma treated with corticosteroids and untreated. **Vutreshni bolesti**, v. 27, n. 4, p. 29–32, 1988.

MITCHELL, G. S. Back to the future: carbon dioxide chemoreceptors in the mammalian brain. **Nature Neuroscience**, v. 7, n. 12, p. 1288–1290, 1 dez. 2004.

MOGIL, J. S. Sex differences in pain and pain inhibition: multiple explanations of a controversial phenomenon. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, n. 12, p. 859–866, 1 dez. 2012.

MOON, R. Y.; HORNE, R. S.; HAUCK, F. R. Sudden infant death syndrome. **The Lancet**, v. 370, n. 9598, p. 1578–1587, 3 nov. 2007.

MORTOLA, J. P.; SAIKI, C. Ventilatory response to hypoxia in rats: gender differences. **Respiration Physiology**, v. 106, n. 1, p. 21–34, 1 out. 1996.

MUTTUKRISHNA, S.; LEDGER, W. Front Matter. In: **Inhibin, Activin and Follistatin in Human Reproductive Physiology**. [s.l.] Published by imperial college press and distributed by world scientific publishing co., 2001. p. i–viii.

NAKAGAWA, Y.; CHIBA, K. Diversity and plasticity of microglial cells in psychiatric and neurological disorders. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 154, p. 21–35, 1 out. 2015.

NAKAMURA, K. et al. Identification of Sympathetic Premotor Neurons in Medullary Raphe Regions Mediating Fever and Other Thermoregulatory Functions. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 23, p. 5370–5380, 9 jun. 2004.

NATTIE, E.; LI, A. Central chemoreceptors: Locations and functions. In: **Comprehensive Physiology**. [s.l.: s.n.]. v. 2p. 221–254.

NELSON, H. D. Menopause. **The Lancet**, v. 371, n. 9614, p. 760–770, 2008.

NISHIZAWA, S. et al. Differences between males and females in rates of serotonin synthesis in human brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 10, p. 5308–5313, 13 maio 1997.

NISSEN, J. C. Microglial Function across the Spectrum of Age and Gender. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 3, 4 mar. 2017.

ÖSTERLUND, M. K. Underlying mechanisms mediating the antidepressant effects of estrogens. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1800, n. 10, p. 1136–1144, 2010.

OYAMADA, Y. et al. Respiration-modulated membrane potential and chemosensitivity of locus coeruleus neurones in the in vitro brainstem-spinal cord of the neonatal rat. **The Journal of physiology**, v. 513 (Pt 2), p. 381–98, 1 dez. 1998.

PALKOVITS, M. Isolated removal of hypothalamic or other brain~ nuclei of the rat. **Brain Research**, v. 59, p. 449–450, 1973.

PAOLICELLI, R. C. et al. TDP-43 Depletion in Microglia Promotes Amyloid Clearance but Also Induces Synapse Loss. **Neuron**, v. 95, n. 2, p. 297–308.e6, 19 jul. 2017.

PASCOTTO, V. M. et al. Effects of a Mixture of Pesticides on the Adult Female Reproductive

System of Sprague-Dawley, Wistar, and Lewis Rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 78, n. 9, p. 602–616, 3 maio 2015.

PASCUAL, O. et al. Progesterone reverses the neuronal responses to hypoxia in rat nucleus tractus solitarius in vitro. **The Journal of physiology**, v. 544, n. 2, p. 511–520, 1 out. 2002.

PATERSON, D. S. et al. Multiple Serotonergic Brainstem Abnormalities in Sudden Infant Death Syndrome. **JAMA**, v. 296, n. 17, p. 2124, 1 nov. 2006.

PATRICK, J. M.; HOWARD, A. The influence of age, sex, body size and lung size on the control and pattern of breathing during CO₂ inhalation in Caucasians. **Respiration Physiology**, v. 16, n. 3, p. 337–350, dez. 1972.

PATRONE, L. G. A. et al. Brainstem catecholaminergic neurones and breathing control during postnatal development in male and female rats. **Journal of Physiology**, v. 596, n. 15, p. 3299–3325, 25 ago. 2018.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. [s.l: s.n.]. v. 3rd

PAXINOS G; WATSON C . **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 3rd edn ed. San Diego: Academic Press, Ltd., 1998. v. 3

PENATTI, E. M. et al. Ventilatory response to hypercapnia and hypoxia after extensive lesion of medullary serotonergic neurons in newborn conscious piglets. **Journal of Applied Physiology**, v. 101, n. 4, p. 1177–1188, out. 2006.

PENDERGAST, J. S.; TUESTA, L. M.; BETHEA, J. R. Oestrogen Receptor β Contributes to the Transient Sex Difference in Tyrosine Hydroxylase Expression in the Mouse Locus Coeruleus. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, n. 10, p. 1155–1164, 1 out. 2008.

PEPPARD, P. E. et al. Increased Prevalence of Sleep-Disordered Breathing in Adults. **American Journal of Epidemiology**, v. 177, n. 9, p. 1006–1014, 1 maio 2013.

POLOTSKY, V. Y. et al. Female gender exacerbates respiratory depression in leptin-deficient obesity. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 164, n. 8 I, p. 1470–1475, 2001.

PONGOU, R. Why is infant mortality higher in boys than in girls? A new hypothesis based on preconception environment and evidence from a large sample of twins. **Demography**, v. 50, n. 2, p. 421–44, 14 abr. 2013.

PORZIONATO, A.; MACCHI, V.; DE CARO, R. Central and peripheral chemoreceptors in sudden infant death syndrome. **The Journal of Physiology**, v. 596, n. 15, p. 3007–3019, ago. 2018.

RAISMAN, G.; FIELD, P. M. Sexual dimorphism in the preoptic area of the rat. **Science (New York, N.Y.)**, v. 173, n. 3998, p. 731–3, 20 ago. 1971.

REFINETTI, R.; MENAKER, M. The circadian rhythm of body temperature. **Physiology & behavior**, v. 51, n. 3, p. 613–37, mar. 1992.

REGENSTEINER, J. G. et al. Possible gender differences in the effect of exercise on hypoxic ventilatory response. **Respiration; international review of thoracic diseases**, v. 53, n. 3, p. 158–65, 1988.

REGENSTEINER, J. G. et al. Combined effects of female hormones and metabolic rate on ventilatory drives in women. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 66, n. 2, p. 808–813, fev. 1989.

RICHERSON, G. B. Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, n. 6, p. 449–461, 1 jun. 2004.

SAARESANTA, T.; POLO, O. Hormones and Breathing. **Chest**, v. 122, n. 6, p. 2165–2182, dez. 2002.

SAJKOV, D. et al. Comparison of effects of sustained isocapnic hypoxia on ventilation in men and women. **Journal of Applied Physiology**, v. 83, n. 2, p. 599–607, ago. 1997.

SAUNDERS, N. A.; HEILPERN, S.; REBUCK, A. S. Relation between personality and ventilatory response to carbon dioxide in normal subjects: a role in asthma? **British medical journal**, v. 1, n. 5802, p. 719–21, 18 mar. 1972.

SAWCHENKO, P. E.; SWANSON, L. W. The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. **Brain research**, v. 257, n. 3, p. 275–325, nov. 1982.

SCHENBERG, L. C. A Neural Systems Approach to the Study of the Respiratory-Type Panic Disorder. In: **Panic Disorder**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 9–77.

SCHLENKER, E. H.; GOLDMAN, M. Ventilatory Responses of Aged Male and Female Rats to Hypercapnia and to Hypoxia. **Gerontology**, v. 31, n. 5, p. 301–308, 1985.

SCHLENKER, E. H.; HANSEN, S. N. Sex-specific densities of estrogen receptors alpha and beta in the subnuclei of the nucleus tractus solitarius, hypoglossal nucleus and dorsal vagal motor nucleus weanling rats. **Brain Research**, v. 1123, n. 1, p. 89–100, 6 dez. 2006.

SCHNEIDER, B. K. et al. Influence of testosterone on breathing during sleep. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 61, n. 2, p. 618–23, ago. 1986.

SCHOENE, R. B. et al. Respiratory drives and exercise in menstrual cycles of athletic and nonathletic women. **Journal of Applied Physiology**, v. 50, n. 6, p. 1300–1305, jun. 1981.

SEEBART, B. R.; STOFFEL, R. T.; BEHAN, M. Age-related changes in the serotonin 2A receptor in the hypoglossal nucleus of male and female rats. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 158, n. 1, p. 14–21, 2007.

SHAHAR, E. et al. Hormone replacement therapy and sleep-disordered breathing. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 167, n. 9, p. 1186–1192, maio 2003.

SHEIKH, J. I.; LESKIN, G. A.; KLEIN, D. F. Gender Differences in Panic Disorder: Findings From the National Comorbidity Survey. **American Journal of Psychiatry**, v. 159, n. 1, p. 55–58, jan. 2002.

SIERRA, A. et al. Steroid hormone receptor expression and function in microglia. **Glia**, v. 56, n. 6, p. 659–674, 15 abr. 2008.

SILVA, N. L.; BOULANT, J. A. Effects of testosterone, estradiol, and temperature on neurons in preoptic tissue slices. **The American journal of physiology**, v. 250, n. 4 Pt 2, p. R625-32, abr. 1986.

SILVA, T. M. et al. Minocycline alters expression of inflammatory markers in autonomic brain areas and ventilatory responses induced by acute hypoxia. **Experimental Physiology**, v. 103, n. 6, p. 884–895, 1 jun. 2018.

SIMERLY, R. B. et al. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: An in situ hybridization study. **Journal of Comparative Neurology**, v. 294, n. 1, p. 76–95, 1990.

SIMPSON, E. R. et al. Aromatase--a brief overview. **Annual review of physiology**, v. 64, n. 1, p. 93–127, mar. 2002.

SINGEWALD, N.; SHARP, T. Neuroanatomical targets of anxiogenic drugs in the hindbrain as revealed by Fos immunocytochemistry. **Neuroscience**, v. 98, n. 4, p. 759–770, jul. 2000.

SINGLETARY, S. J. et al. Lack of correlation of vaginal impedance measurements with hormone levels in the rat. **Contemporary topics in laboratory animal science / American Association for Laboratory Animal Science**, v. 44, n. 6, p. 37–42, nov. 2005.

SKEGG, D. C. G. **Hormone therapy and heart disease after the menopause** *Lancet* Elsevier, , 13 out. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11675050>>. Acesso em: 28 jul. 2016

SLATKOVSKA, L. et al. Phasic menstrual cycle effects on the control of breathing in healthy women. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 154, n. 3, p. 379–388, 2006.

SMITH, J. E. et al. CNS cell groups projecting to sympathetic outflow of tail artery: neural circuits involved in heat loss in the rat. **Brain research**, v. 786, n. 1–2, p. 153–64, mar. 1998.

SMITH, M. S.; FREEMAN, M. E.; NEILL, J. D. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. **Endocrinology**, v. 96, n. 1, p. 219–26, jan. 1975.

SOHRABJI, F.; WILLIAMS, M. Stroke Neuroprotection: Oestrogen and Insulin-Like Growth Factor-1 Interactions and the Role of Microglia. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 25, n. 11, p. 1173–1181, nov. 2013.

STEERS, W. D. 5α -reductase activity in the prostate. **Urology**, v. 58, n. 6, p. 17–24, 1 dez. 2001.

STOWELL, R. D. et al. Cerebellar Microglia Are Dynamically Unique and Survey Purkinje Neurons In Vivo. **Developmental Neurobiology**, v. 78, n. 6, p. 627–644, jun. 2017.

SWAAB, D. F. et al. **Structural and functional sex differences in the human hypothalamus.** Hormones and Behavior. **Anais...** Academic Press, 1 set. 2001 Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0018506X01916824>>. Acesso em: 4 out. 2017

SZAWKA, R. E. et al. Locus coeruleus norepinephrine regulates the surge of prolactin during oestrus. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 17, n. 10, p. 639–648, 2005.

SZAWKA, R. E. et al. Ovarian-steroid modulation of locus coeruleus activity in female rats: involvement in luteinising hormone regulation. **Journal of neuroendocrinology**, v. 21, n. 7, p. 629–39, jul. 2009.

TAKANO, N. [Ventilatory responses to hypercapnia and hypoxia: the sexual difference and changes during the menstrual cycle]. **Kokyu to junkan. Respiration & circulation**, v. 33, n. 1, p. 17–23, jan. 1985.

TAMAKI, Y.; NAKAYAMA, T. Effects of air constituents on thermosensitivities of preoptic neurons: hypoxia versus hypercapnia. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 409, n. 1–2, p. 1–6, jun. 1987.

TATSUMI, K. et al. Respiratory stimulation by female hormones in awake male rats. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 71, n. 1, p. 37–42, jul. 1991a.

TATSUMI, K. et al. Influences of gender and sex hormones on hypoxic ventilatory response in cats. **J Appl Physiol**, v. 71, n. 5, p. 1746–1751, nov. 1991b.

TATSUMI, K. et al. Effects of testosterone on hypoxic ventilatory and carotid body neural responsiveness. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 149, n. 5, p. 1248–1253, maio 1994.

TATSUMI, K. et al. Role of endogenous female hormones in hypoxic chemosensitivity. **Journal of Applied Physiology**, v. 83, n. 5, p. 1706–1710, nov. 1997.

TATSUMI, K.; HANNHART, B.; MOORE, L. G. Influences of sex steroids on ventilation and ventilatory control. In: **Lung biology in health and disease**. [s.l.] Dekker, 1995. v. 79p. 829–864.

TAYLOR, S. E. et al. Rod Microglia: A Morphological Definition. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e97096, 15 maio 2014.

TENORIO-LOPES, L. et al. Consequences of maternal omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on respiratory function in rat pups. **The Journal of Physiology**, v. 595, n. 5, p. 1637–1655, 1 mar. 2017a.

TENORIO-LOPES, L. et al. Neonatal maternal separation opposes the facilitatory effect of castration on the respiratory response to hypercapnia of the adult male rat: Evidence for the involvement of the medial amygdala. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 29, n. 12, p. 3218–3221, 1 dez. 2017b.

THANKY, N. R.; SON, J. H.; HERBISON, A. E. Sex differences in the regulation of tyrosine hydroxylase gene transcription by estrogen in the locus coeruleus of TH9-LacZ transgenic mice. **Molecular Brain Research**, v. 104, n. 2, p. 220–226, 15 ago. 2002.

TORLAKOVIC, E. E. et al. Standardization of negative controls in diagnostic immunohistochemistry: recommendations from the international ad hoc expert panel. **Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM**, v. 22, n. 4, p. 241–52, abr. 2014.

TREMBLAY, M.-É. et al. Microglial Interactions with Synapses Are Modulated by Visual Experience. **PLoS Biology**, v. 8, n. 11, p. e1000527, 2 nov. 2010.

TSAI, C. L.; KANOSUE, K.; MATSUMURA, K. Effects of estradiol treatment on responses of rat preoptic warm sensitive neurons to progesterone in vitro. **Neuroscience letters**, v. 136, n. 1, p. 23–6, 17 fev. 1992.

TSAI, C. L.; MATSUMURA, K.; NAKAYAMA, T. Effects of progesterone on thermosensitive neurons in preoptic slice preparations. **Neuroscience letters**, v. 86, n. 1, p. 56–60, 21 mar. 1988.

UCHIDA, Y. et al. Estrogen modulates central and peripheral responses to cold in female rats. **The Journal of Physiological Sciences**, v. 60, n. 2, p. 151–160, 29 mar. 2010a.

UCHIDA, Y. et al. Estrogen in the medial preoptic nucleus of the hypothalamus modulates cold responses in female rats. **Brain Research**, v. 1339, p. 49–59, 21 jun. 2010b.

UPPARI, N. P.; JOSEPH, V.; BAIRAM, A. Respiratory responses to progesterone and allopregnanolone following chronic caffeine treatment in newborn female rats. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 240, p. 32–40, jun. 2017.

VAN DUINEN, M. A. et al. CO₂ challenge induced HPA axis activation in panic. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 10, n. 6, p. 797–804, 2007.

VERDONK, F. et al. Phenotypic clustering: a novel method for microglial morphology analysis. **Journal of neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 153, 17 jun. 2016.

VIEMARI, J.-C.; TRYBA, A. K. Bioaminergic neuromodulation of respiratory rhythm in vitro. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 168, n. 1–2, p. 69–75, 31 ago. 2009.

VIEMARI, J. C. et al. Phox2a gene, A6 neurons, and noradrenaline are essential for development of normal respiratory rhythm in mice. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 4, p. 928–37, 28 jan. 2004.

VIEMARI, J. C. et al. Ret deficiency in mice impairs the development of A5 and A6 neurons and the functional maturation of the respiratory rhythm. **European Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 10, p. 2403–2412, nov. 2005.

VIGIER, B. et al. Production of anti-Müllerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells. **Endocrinology**, v. 114, n. 4, p. 1315–20, abr. 1984.

VILLA, A. et al. Sex-Specific Features of Microglia from Adult Mice. **Cell reports**, v. 23, n. 12, p. 3501–3511, 19 jun. 2018.

VORNBERGER, W. et al. Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. **Endocrinology**, v. 134, n. 5, p. 2307–2316, maio 1994.

WAKE, H. et al. Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. **Trends in Neurosciences**, v. 36, n. 4, p. 209–217, 1 abr. 2013.

WEMMIE, J. A. Neurobiology of panic and pH chemosensation in the brain. **Dialogues in clinical neuroscience**, v. 13, n. 4, p. 475–83, 2011.

WENNINGER, J. M. et al. Hypoxic and hypercapnic ventilatory responses in aging male vs. aging female rats. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 106, n. 5, p. 1522–8, maio 2009.

WHITE, D. P. et al. Sexual influence on the control of breathing. **Journal of Applied Physiology**, v. 54, n. 4, p. 874–879, abr. 1983a.

WHITE, D. P. et al. Sleep deprivation and the control of ventilation. **The American review of respiratory disease**, v. 128, n. 6, p. 984–6, dez. 1983b.

WHITE, D. P. et al. Influence of testosterone on ventilation and chemosensitivity in male subjects. **Journal of Applied Physiology**, v. 59, n. 5, p. 1452–1457, 1985.

YANASE, M.; TANAKA, H.; NAKAYAMA, T. Effects of estrus cycle on thermoregulatory responses during exercise in rats. **European journal of applied physiology and occupational physiology**, v. 58, n. 4, p. 446–51, 1989.

YANG, Q. et al. Intermittent hypoxia from obstructive sleep apnea may cause neuronal impairment and dysfunction in central nervous system: the potential roles played by microglia. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 9, p. 1077–86, 2013.

YAZĞAN, Y.; NAZIROĞLU, M. Ovariectomy-Induced Mitochondrial Oxidative Stress, Apoptosis, and Calcium Ion Influx Through TRPA1, TRPM2, and TRPV1 Are Prevented by 17 β -Estradiol, Tamoxifen, and Raloxifene in the Hippocampus and Dorsal Root Ganglion of Rats. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 10, p. 7620–7638, 10 dez. 2017.

YING, S.-Y. Inhibins, Activins, and Follistatins: Gonadal Proteins Modulating the Secretion of Follicle-Stimulating Hormone. **Endocrine Reviews**, v. 9, n. 2, p. 267–293, 1 maio 1988.

YONKERS, K. A. et al. Is the Course of Panic Disorder the Same in Women and Men? **American Journal of Psychiatry**, v. 155, n. 5, p. 596–602, 1 maio 1998.

YOUNG, T.; PEPPARD, P. E.; GOTTLIEB, D. J. Epidemiology of obstructive sleep apnea: A population health perspective. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 165, p. 1217–1239, 2002.

ZABKA, A. G.; BEHAN, M.; MITCHELL, G. S. Selected contribution: Time-dependent hypoxic respiratory responses in female rats are influenced by age and by the estrus cycle. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 91, n. 6, p. 2831–8, dez. 2001.

ZABKA, A. G.; MITCHELL, G. S.; BEHAN, M. Conversion from testosterone to oestradiol is required to modulate respiratory long-term facilitation in male rats. **The Journal of physiology**, v. 576, n. Pt 3, p. 903–12, 1 nov. 2006.