

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

***HORMÔNIOS GONADAIS INFLUENCIAM NAS RESPOSTAS  
VENTILATÓRIAS À HIPERCAPNIA EM RATOS MACHOS E  
FÊMEAS WISTAR ADULTOS***

---

**Orientadora: Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão**

**Danuzia Ambrozio Marques**

**Outubro de 2014**

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

***HORMÔNIOS GONADAIS INFLUENCIAM NAS RESPOSTAS***  
***VENTILATÓRIAS À HIPERCAPNIA EM RATOS MACHOS E***  
***FÊMEAS WISTAR ADULTOS***

Trabalho apresentado à Universidade Federal De São Carlos Centro de Ciências Biológicas e da Saúde Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - PIPGCF - UFSCar/UNESP como critério para a obtenção do título de mestrado da aluna: Danuzia Ambrozio Marques sob orientação da docente: Prof<sup>a</sup>. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão.

**Outubro / 2014**

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

M357hg

Marques, Danuzia Ambrozio.

Hormônios gonadais influenciam nas respostas ventilatórias à hipercapnia em ratos machos e fêmeas wistar adultos / Danuzia Ambrozio Marques. -- São Carlos : UFSCar, 2014.  
73 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Respiração. 2. Ciclo estral. 3. Hormônios sexuais. 4. Temperatura. 5. Metabolismo. I. Título.

CDD: 612.2 (20ª)



---

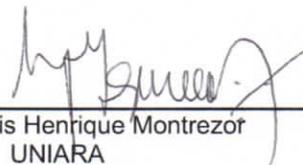
**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de dissertação de Mestra em Ciências Fisiológicas da candidata Danuzia Ambrozio Marques, realizada em 11/11/2014:

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhao  
UNESP

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Mirela Barros Dias  
UNESP

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Luis Henrique Montezor  
UNIARA

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

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

“O que você faz com amor e cuidado tem uma chance de fazer diferença, tanto para você como para a vida de outras pessoas. Tudo o que se faz sem amor e sem convicção é fadado

ao fracasso e à perda de tempo, para você e para os outros” (Wim Wenders).

## DEDICATÓRIA

A Deus, que me deu oportunidade e coragem para questionar realidades e propor sempre um novo mundo de possibilidades.

A professora Luciane, orientadora e amiga pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão desta etapa tão importante na minha vida.

Aos técnicos e todos os funcionários pelo convívio, pelo apoio e ajuda.

Agradeço também a todos os professores que me acompanharam durante a graduação e pós-graduação.

A minha mãe, tão companheira, ao meu pai tão preocupado, ao meu irmão e melhor amigo, aos meus padrinhos e primos, a tia Rô e toda a sua família, todos que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até aqui, por acreditarem em mim e por me darem em alguns momentos, a esperança para seguir. Obrigada, sem vocês nada seria possível, vocês são a força e o alicerce, vocês me mostram a cada dia que vale a pena acreditar nos sonhos e em um mundo melhor.

Aos grandes 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. Nas palavras de Vinícius de Moraes, meus amigos “não tem noção de como me são necessários /de como são indispensáveis ao meu equilíbrio vital / porque eles fazem parte do mundo que eu, tremulamente, construí,/ e se tornaram alicerces do meu encanto pela vida./ A gente não faz amigos, reconhece-os.” (Soneto do Amigo)

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.

## LISTA DE FIGURAS

---

- Figura 1: Perfil de secreção de hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH), prolactina, estradiol e progesterona durante o ciclo estral de ratas. O traço mais largo no eixo horizontal representa o período escuro do ciclo claro-escuro (12h/12h) (ANSELMO-FRANCI e SZAWKA, 2005). .....7
- Figura 2: A seta aponta para o ovário em meio a massa gordurosa durante a cirurgia de ovariectomia. ....16
- Figura 3: Fotografias do processo de orquidectomia bilateral, em que através de uma incisão no escroto os testículos são retirados. ....17
- Figura 4: Câmara de pletismografia de corpo inteiro e câmara de referência.....19
- Figura 5: (A) O esfregaço vaginal colhido a fresco diluído em salina (9%) e colocado em lâmina (B) para observação em microscópio óptico (C).....21
- Figura 6: Caracterização das células de esfregaço vaginal a fresco de ratas wistar que determinam a fase do ciclo estral. A) proestro- células epiteliais predominantemente nucleadas. B) estro- células epiteliais cornificadas predominantemente; C) metaestro – leucócitos com a presença de células nucleadas e cornificadas em menores proporções e D) diestro com a predominância de leucócitos. ....22
- Figura 7: Concentração plasmática de Estradiol e Progesterona durante as diferentes fases do ciclo estral. O símbolo \* indica diferença entre grupos ( $P < 0,05$ ). Observa-se que a concentração plasmática de estradiol foi significativamente mais elevada em proestro comparada as demais fases, já a concentração plasmática de progesterona foi menor no estro em comparação com proestro metaestro e diestro.....29

Figura 8: Ventilação ( $V_E$ ), volume corrente ( $V_T$ ) e frequência respiratória (fR) das ratas em proestro, estro, metaestro e diestro durante normocapnia (0% $CO_2$ ) e hipercapnia (7% $CO_2$ ).....	31
Figura 9: Consumo de $O_2$ ( $VO_2$ ) das ratas em proestro, estro, metaestro e diestro durante normocapnia (0% $CO_2$ ) e hipercapnia (7% $CO_2$ ).....	32
Figura 10: Equivalente respiratório $V_E/VO_2$ das ratas em proestro, estro, metaestro e diestro durante normocapnia (0% $CO_2$ ) e hipercapnia (7% $CO_2$ ).....	33
Figura 11: Temperatura corporal ( $T_c$ ) das ratas em proestro, estro, metaestro e diestro durante normocapnia (0% $CO_2$ ) e hipercapnia (7% $CO_2$ ).....	34
Figura 12: Ventilação ( $V_E$ ), volume corrente ( $V_T$ ) e frequência respiratória (fR) das ratas durante normocapnia (0% $CO_2$ ) e hipercapnia (7% $CO_2$ ) nos animais intactos em estro, ovariectomizadas que receberam óleo (OVX+O), reposição hormonal com cipionato de estradiol (OVX+E2), ou uma combinação de cipionato de estradiol e progesterona(OVX+EP).....	35
Figura 13: Consumo de $O_2$ ( $VO_2$ ) das ratas em estro, ovariectomizadas que receberam óleo (OVX+O), cipionato de estradiol (OVX+E2), ou uma combinação de cipionato de estradiol e progesterona(OVX+EP). durante normocapnia (0% $CO_2$ ) e hipercapnia (7% $CO_2$ ).....	36
Figura 14: Equivalente respiratório $V_E/VO_2$ das ratas em estro, ovariectomizadas que receberam óleo (OVX+O), cipionato de estradiol (OVX+E2), ou uma combinação de cipionato de estradiol e progesterona(OVX+EP). $V_E/VO_2$ em normocapnia (0% $CO_2$ ) e hipercapnia (7% $CO_2$ ) .....	37

Figura 15: Temperatura corporal ( $T_c$ ) das ratas em estro, ovariectomizadas que receberam óleo (OVX+O), cipionato de estradiol (OVX+E2), ou uma combinação de cipionato de estradiol e progesterona(OVX+EP).em normocapnia (0%  $CO_2$ ) e hipercapnia (7%  $CO_2$ )38

Figura 16: Ventilação ( $V_E$ ), volume corrente ( $V_T$ ) e frequência respiratória (fR) de ratos intactos (n=6) e orquidectomizados (n=5) durante normocapnia (0%  $CO_2$ ) e após 30 minutos de hipercapnia (7%  $CO_2$ ).....39

Figura 17: Consumo de  $O_2$  ( $VO_2$ ) de ratos intactos (n=6) e orquidectomizados (n=5) durante normocapnia (0%  $CO_2$ ) e após 30 minutos de hipercapnia (7%  $CO_2$ ) .....40

Figura 18: Equivalente respiratório ( $V_E/VO_2$ ) de ratos intactos (n=6) e orquidectomizados (n=5) durante normocapnia (0%  $CO_2$ ) e após 30 minutos de hipercapnia (7%  $CO_2$ ).....40

Figura 19: Temperatura corporal ( $T_c$ ) de ratos intactos (n=6) e orquidectomizados (n=5) durante normocapnia (0%  $CO_2$ ) e após 30 minutos de hipercapnia (7%  $CO_2$ ).....41

Figura 20: Ventilação ( $V_E$ ), volume corrente ( $V_T$ ) e frequência respiratória (fR) de ratos intactos (n=6), fêmeas ovariectomizadas que receberam óleo (OVX+O, n=6), ratos orquidectomizados (ORX, n=5) e fêmeas intactas em estro (n=6) durante normocapnia (0%  $CO_2$ ) e após 30 minutos de hipercapnia (7%  $CO_2$ ). .....43

Figura 21: Consumo de oxigênio de ratos intactos (n=6), fêmeas ovariectomizadas que receberam óleo (OVX+O, n=6), ratos orquidectomizados (ORX, n=5) e fêmeas intactas em Estro (n=6) durante normocapnia (0%  $CO_2$ ) e após 30 minutos de hipercapnia (7%  $CO_2$ ).....44

Figura 22: Equivalente respiratório  $V_E/VO_2$  de ratos Intactos (n=6), fêmeas ovariectomizadas que receberam óleo (OVX+O, n=6), ratos orquidectomizados (ORX, n=5) e fêmeas intactas em Estro (n=6)durante normocapnia (0%  $CO_2$ ) e após 30 minutos de hipercapnia (7%  $CO_2$ ).....45

Figura 23: Temperatura corporal (Tc) de ratos intactos (n=6), fêmeas ovariectomizadas que receberam óleo (OVX+O, n=6), ratos orquidectomizados (ORX, n=5) e fêmeas intactas em Estro (n=6) durante normocapnia (0% CO<sub>2</sub>) e após 30 minutos de hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>).....46

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1:  $V_E$ , fR,  $V_T$ , Tc,  $VO_2$  e  $V_E/VO_2$  durante normocapnia e hipercapnia de fêmeas em Proestro (n=8), estro (n=6), metaestro (n=4), diestro (n=4).....25

Tabela 2:  $V_E$ , fR,  $V_T$ , Tc,  $VO_2$  e  $V_E/VO_2$  durante normocapnia e hipercapnia de fêmeas ovariectomizadas que tiveram injeção de óleo (OVX+O, n=6), Cipionato de estradiol (OVX+E2, n=6), uma combinação de Cipionato de Estradiol e progesterona (OVX+EP, n=5) .....26

Tabela 3:  $V_E$ , fR,  $V_T$ , Tc,  $VO_2$  e  $V_E/VO_2$  durante normocapnia e hipercapnia de machos intactos (n=6) e orquidectomizados (ORX, n=5). .....27

## ABREVIACOES

---

**CO<sub>2</sub>** – dióxido de carbono

**E2** - estradiol

E2- Estradiol

**EPM** – erro padrão da média

**fR**– frequência respiratória

**i.m.**– intra-muscular

**i.p.**– intra-peritoneal

**LC** – *Locuscoeruleus*

**N<sub>2</sub>**– nitrogênio

**NTS** – núcleo do trato solitário

**O<sub>2</sub>**– oxigênio

**ORX** - ratos orquidectomizados.

**OVX + E2**- Fêmeas ovariectomizadas com injeção de estradiol

**OVX + EP** - Fêmeas ovariectomizadas com injeção de estradiol com combinação de progesterona

**OVX + O**- Fêmeas ovariectomizadas com injeção de óleo

**P4** – Progesterona

**s.c.** - subcutâneo

**SNC** – sistema nervoso central

**T** - Testosterona

**Tc**– temperatura corporal

**V<sub>E</sub>** – ventilação

**V<sub>E</sub>/VO<sub>2</sub>** - equivalente respiratório

**VO<sub>2</sub>** – consumo de oxigênio

**Vs**- versus

**V<sub>T</sub>**– volume corrente

## SUMÁRIO

<b>1.- RESUMO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT .....</b>	<b>2</b>
<b>3. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>3</b>
3.1 – <i>Quimiorreceptores .....</i>	3
3.2 <i>Hormônios gonadais: ventilação .....</i>	5
3.3 <i>Hormônios gonadais: temperatura .....</i>	11
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>15</b>
5.1. <i>Animais.....</i>	15
5.2 <i>Procedimentos cirúrgicos .....</i>	15
5.2.1. <i>Castração e Reposição Hormonal.....</i>	15
5.2.2- <i>Medidas da temperatura corporal: .....</i>	17
5.3. <i>Determinação da Ventilação.....</i>	17
5.4. <i>Consumo de oxigênio (VO<sub>2</sub>).....</i>	19
5.5. <i>Dosagem Hormonal .....</i>	20
5.6. <i>Determinação da fase do ciclo estral.....</i>	20

5.4. Protocolos Experimentais .....	22
5.4.1. Efeito das diferentes fases do ciclo estral de ratas na resposta respiratória e metabólica e na temperatura corporal em normocapnia e hipercapnia .....	22
5.4.2. Efeito da ovariectomia e reposição hormonal com E2 e E2 com P4 na resposta respiratória e metabólica e na temperatura corporal em normocapnia e hipercapnia de ratas .....	23
5.4.3. Efeito da orquidectomia na resposta respiratória e metabólica e na temperatura corporal em normocapnia e hipercapnia de ratos .....	23
5.5. Análise de dados.....	24
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>25</b>
6.1. Efeito das diferentes fases do ciclo estral de ratas na resposta respiratória e metabólica e na temperatura corporal em normocapnia e hipercapnia .....	28
6.1.1 Determinação do ciclo estral .....	28
6.1.2 Ventilação pulmonar .....	30
6.1.3. $VO_2$ e $V_E/VO_2$ .....	32
6.1.4. Temperatura corporal .....	33
6.2. Efeito da ovariectomia e reposição hormonal com E2 e E2 e P4 na resposta respiratória e metabólica e na temperatura corporal em normocapnia e hipercapnia de ratas.....	34
6.2.1 Ventilação pulmonar .....	34
6.2.2. $VO_2$ e $V_E/VO_2$ .....	36

6.2.3. <i>Temperatura corporal</i> .....	37
6.3. <i>Efeito da orquidectomia na resposta respiratória e metabólica e na temperatura corporal em normocapnia e hipercapnia de ratos</i> .....	38
6.3.1 <i>Ventilação pulmonar</i> .....	38
6.3.2. $VO_2$ e $V_E/VO_2$ .....	40
6.3.3. <i>Temperatura corporal</i> .....	41
6.4. <i>Efeito do dimorfismo sexual nas respostas respiratórias, metabólicas e termorreguladoras em normocapnia e hipercapnia.</i> .....	41
6.4.1 <i>Ventilação pulmonar</i> .....	42
6.4.2. $VO_2$ e $V_E/VO_2$ .....	44
6.4.3. <i>Temperatura corporal</i> .....	45
<b>7- DISCUSSÃO</b> .....	<b>46</b>
7.1. <i>Ciclo estral: Ventilação, metabolismo e temperatura corporal</i> .....	46
7.2. <i>Gonadectomia e reposição hormonal e ventilação, metabolismo e temperatura corporal</i>	48
7.3. <i>Comparação entre macho e fêmea</i> .....	50
<b>8. CONCLUSÃO</b> .....	<b>50</b>
<b>9- REFERÊNCIAS</b> .....	<b>51</b>

**ANEXO 1: ..... 70**

*Tabela comparativa entre grupos, com valores significativos para  $p < 0.005$ , em normocapnia e hipercapnia, entre fêmeas em diferentes fases do ciclo estral, considerando  $V_E fR$ ,  $V_T$ ,  $Tc$ ,  $VO_2$  e  $V_E/VO_2$ . .... 70*

**ANEXO 2 ..... 71**

*Tabela comparativa entre grupos, com valores significativos para  $p < 0.005$  em normocapnia e hipercapnia, entre fêmeas ovariectomizadas que receberam injeções de óleo (OVX+O, n=6), reposição hormonal de Cipionato de E2 (OVX+E2, n=6), ou uma combinação de Cipionato de E2 e P4 (OVX+EP, n=5) e fêmeas intactas em estro (n=6), considerando  $V_E fR$ ,  $V_T$ ,  $Tc$ ,  $VO_2$  e  $V_E/VO_2$ . .... 71*

**ANEXO 3 ..... 72**

*Tabela comparativa entre grupos, com valores significativos para  $p < 0.005$  em normocapnia e hipercapnia, entre machos intactos (n=6) e orquidectomizados (n=5), considerando  $V_E fR$ ,  $V_T$ ,  $Tc$ ,  $VO_2$  e  $V_E/VO_2$ . .... 72*

**ANEXO 4 ..... 73**

*Tabela comparativa entre grupos com valores significativos de  $p < 0.005$  em normocapnia e hipercapnia, entre fêmeas ovariectomizadas que receberam óleo (OVX+O, n=6) e fêmeas intactas em Estro (n=6) e entre machos intactos (n=6) e orquidectomizados (n=5), considerando  $V_E fR$ ,  $V_T$ ,  $Tc$ ,  $VO_2$  e  $V_E/VO_2$ . .... 73*

## 1.- RESUMO

Os hormônios sexuais podem influenciar diversos processos fisiológicos. No entanto, ainda não estão claros os efeitos dos hormônios sexuais e também se as variações hormonais durante o ciclo estral podem afetar a respiração. Nosso estudo teve como objetivos avaliar a ventilação ( $V_E$ ), volume corrente ( $V_T$ ), frequência respiratória ( $fR$ ), consumo de oxigênio ( $VO_2$ ) e equivalente respiratório ( $V_E/VO_2$ ) e temperatura corporal ( $T_c$ ) de ratas nas diferentes fases do ciclo estral (proestro, estro, metaestro e diestro) e em ratas ovariectomizadas (OVX) e com reposição hormonal com estrógeno (OVX+E2) e estrogênio+progesterona (OVX+EP). Adicionalmente, foi comparada a resposta ventilatória e metabólica durante normocapnia e hipercapnia de ratos intactos e orquidectomizados (ORX) com ratas intactas em estro (fase que as concentrações plasmáticas de estradiol e progesterona estão mais baixas) e ovariectomizadas (OVX) durante a normocapnia e hipercapnia (7%  $CO_2$ ). A  $V_E$ ,  $V_T$ ,  $fR$ ,  $VO_2$  e  $V_E/VO_2$  não foram diferentes entre as ratas nas diferentes fases do ciclo estral em normocapnia e hipercapnia. Contudo, a  $T_c$  foi maior nas ratas em estro comparando com as demais fases do ciclo estral. A reposição hormonal em fêmeas não alterou os parâmetros ventilatórios e metabólicos. Entretanto, fêmeas OVX, OVX+E e OVX + EP apresentaram uma resposta ventilatória à hipercapnia menor quando comparadas com fêmeas intactas em estro. Animais intactos, tanto machos quanto fêmeas em estro, apresentaram a  $V_E$  e  $V_E/VO_2$  significativamente maiores em hipercapnia, do que animais castrados. Observamos também que fêmeas no estro apresentaram uma maior resposta ventilatória que ratos intactos. Desta forma, nossos dados demonstram que as diferentes fases do ciclo estral não alteram a ventilação em normocapnia e hipercapnia e que a gonadectomia reduz a resposta ventilatória ao  $CO_2$ . Adicionalmente, ratas em estro apresentam maior resposta ventilatória à hipercapnia que machos.

Palavras-chave: Ciclo-estral, hormônios sexuais, dimorfismo sexual, respiração, castração, reposição hormonal, metabolismo.

## 2. ABSTRACT

Sex hormones may influence many physiological processes. However, it is still unclear whether sex hormones and hormonal fluctuations that occur during the estrous cycle can affect breathing. Our study aimed to evaluate the ventilation ( $V_E$ ), tidal volume ( $V_T$ ), respiratory frequency ( $fR$ ), oxygen consumption ( $VO_2$ ) ventilatory equivalent ( $V_E/VO_2$ ) and body temperature ( $T_c$ ) of rats at different stages of estrous cycle (proestrus, estrus, metaestrus and diest) responses of intact and orchidectomized (ORX) rats to females in estrous phase (when plasma concentrations of estradiol and progesterone are lower) and ovariectomized (OVX) rats during normocapnia and hypercapnia (7%  $CO_2$ ).  $V_E$ ,  $V_T$ ,  $fR$ ,  $VO_2$  and  $V_E/VO_2$  were not different among animals in different stages of the estrous cycle in normocapnia and hypercapnia. However,  $T_c$  was higher in female rats in estrus. Hormone replacement in females did not change the ventilatory and metabolic parameters. Nevertheless, OVX, OVX+E2 and OVX+EP presented lower ventilatory responses to hypercapnia compared to intact females in estrus phase. Intact animals - both males and females in estrus - showed a higher  $V_E$  and  $V_E/VO_2$  in hypercapnia than castrated animals. We also observed that females in estrus had a higher ventilatory response compared to intact male rats. Thus, our data demonstrated that the different phases of the estrous cycle did not change ventilation in normocapnia and hypercapnia. We also observed that gonadectomy reduces the ventilatory response to  $CO_2$ . Additionally, rats in estrus have higher ventilatory responses to hypercapnia than males.

Keywords: estrous cycle, sex hormones, sexual dimorphism, breathing, castration, hormone replacement, metabolism.

### 3. INTRODUÇÃO

A respiração é um processo que compreende, em última instância, a captação de  $O_2$  e eliminação de  $CO_2$  resultante do metabolismo celular (Presto, 2011). De acordo com literatura atual, existem muitas diferenças entre os gêneros no controle respiratório (Behan *et al.*, 2002; Behan e Wenninger, 2008). Alguns estudos demonstram que existe 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 (Behan e Kinkead, 2011). Adicionalmente, a síndrome da morte súbita em neonatos (SIDS) também é prevalente em indivíduos do sexo masculino, na proporção de 60:40 (Moon *et al.*, 2007). Contudo, as causas destas diferenças não estão totalmente esclarecidas. Uma possível explicação está justamente ligada ao fato das diferenças nos níveis de hormônios sexuais que existem entre machos e fêmeas.

As pesquisas em fisiologia respiratória utilizam ratos em sua grande maioria como modelo experimental. Nos estudos em que ratas são usadas, os autores não levam em consideração as variações nas concentrações plasmáticas hormonais observadas durante o ciclo estral em fêmeas. Esta deve ser uma consideração importante quando se trabalha com fêmeas em cenários clínicos e em diversas áreas de pesquisa (Singletary *et al.*, 2005)

#### 3.1 – Quimiorreceptores

Para manter a homeostase frente a oscilações que ocorrem no ambiente, os sistemas fisiológicos possuem diversos mecanismos reguladores. A variação da demanda de  $O_2$  e a produção de  $CO_2$  fazem com que o sistema respiratório exerça uma das suas principais funções: adequar o processo de trocas gasosas para manter, relativamente constante, as pressões parciais de  $CO_2$  e  $O_2$  no sangue arterial ( $P_aCO_2$  e  $P_aO_2$ ). A hipercapnia (aumento da

$P_aCO_2$ ) pode se tornar uma ameaça à vida por causar alterações no pH sanguíneo, levando a perda da função de diversos sistemas. (Adrogué, e Madias, 1998).

As células intrinsicamente quimiossensíveis a  $O_2$ ,  $CO_2$ , e pH são chamadas de quimiorreceptores e estão localizadas tanto central como periféricamente. Os quimiorreceptores respiratórios periféricos localizados bilateralmente na bifurcação das artérias carótidas e nos corpos aórticos são sensíveis às alterações da  $P_aO_2$ ,  $P_aCO_2$  e pH e os quimiorreceptores centrais são sensíveis às alterações do  $CO_2$  e pH no líquido. Ambos promovem um feedback fundamental para o controle ventilatório e homeostase metabólica em vertebrados (Hempleman, 2011). Os corpos carotídeos são os quimiorreceptores respiratórios que detectam variações da  $P_aO_2$ ,  $P_aCO_2$  e pH. (Mitchell *et al.*, 1963; Schläpke, 1981; Loeschcke, 1982).

Ao contrário do corpo carotídeo, que é muito bem aceito como o local periférico primário para respostas respiratórias a variação de  $P_aO_2$ ,  $P_aCO_2$  e pH, há discordância sobre o principal local (locais) de quimiorreceptores centrais e seus mecanismos celulares de quimiorrecepção. Muitas áreas do tronco encefálico foram identificadas como quimiossensíveis quando estimuladas com ácido ou  $CO_2$ , aumentando a atividade dos motoneurônios respiratórios (Coates *et al.*, 1993; Corcoran *et al.*, 2009).

Atualmente existem duas teorias a respeito de como e quais grupamentos neuronais estariam envolvidos no controle da quimiorrecepção central. Uma primeira teoria, chamada de “teoria da quimiorrecepção especializada”, (Loeschcke, 1982; Mulkey *et al.*, 2004; Guyenet *et al.*, 2008) postula que, em situações *in vivo*, os neurônios responsáveis pelo ritmo respiratório não são sensíveis ao pH, mas recebem projeções de um grupamento especializado de neurônios excitatórios, localizados na superfície ventral do bulbo em um núcleo denominado núcleo retrotrapezóide, que seria considerado o quimiorreceptor central (Mulkey *et al.*, 2004; Takakura *et al.*, 2006).

A outra teoria postula que a quimiorrecepção central está distribuída em todo SNC (Nattie, 2001; Nattie e Li, 2012) em áreas como o núcleo do trato solitário (NTS), neurônios do cerebelo, e neurônios orexinérgicos do hipotálamo e do cerebelo, locus coeruleus e rafe bulbar (Dean *et al.*, 1989, Mulkey *et al.*, 2004; Takakura *et al.*, 2006; Moreira *et al.*, 2007;;; Deng *et al.*, 2007, Biancardi *et al.*, 2008, Johnson *et al.*, 2008;;; Nattie e Li, 2009, Abbott *et al.*, 2009). Nesse caso, a quimiorrecepção central seria resultado de um efeito cumulativo do pH nesses neurônios, resultando em uma resposta final (Kawai *et al.*, 2006; Nattie e Li, 2006).

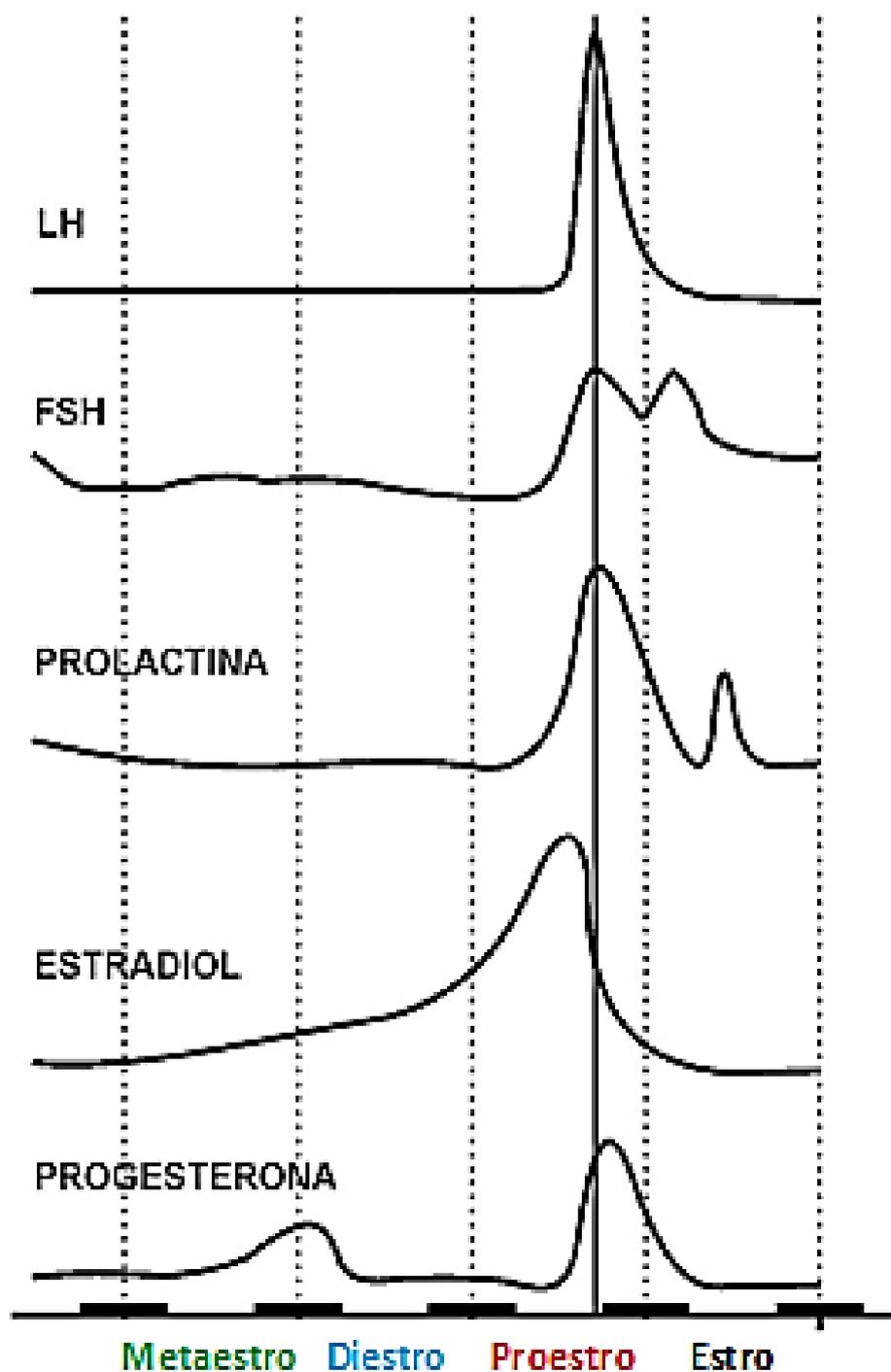
### **3.2 Hormônios gonadais: ventilação**

Hormônios sexuais, incluindo andrógenos (por exemplo, testosterona), estrógenos (por exemplo, 17-estradiol, o estrogênio mais potente em mamíferos) e progesterona, são sintetizados principalmente nas gônadas. . Todos os três hormônios estão presentes em machos e fêmeas, embora em concentrações plasmáticas muito diferentes ao longo da vida e desempenham função importante no controle da respiração (Behan e Kinkead, 2011) sendo moduladores durante normóxia e hipóxia, tendo ação central e periférica (Bayliss *et al.*, 1990; Millhorn e Bayliss, 1992).

No sistema ventilatório, estes hormônios podem causar: 1) efeito direto sobre os motoneurônios respiratórios ou em neurônios próximos, e agir em núcleos motores respiratórios; 2) efeito nos neurônios pré-motores do tronco encefálico; 3) efeito sobre a geração do ritmo respiratório nos neurônios do tronco encefálico, e 4) efeito sobre os sistemas neuromoduladores que por sua vez influenciam a geração do ritmo de neurônios pré-motores ou motores. Esses hormônios também influenciam quimiorreceptores periféricos ou centrais e/ou seus núcleos sensoriais ou cérebro-corticais ou núcleos hipotalâmicos que se projetam para quaisquer das áreas acima (Behan *et al.*, 2003).

Há muitos distúrbios respiratórios, como a apnéia obstrutiva do sono (AOS) e síndrome da morte súbita infantil (SIDS) que ocorrem muito mais em indivíduos do sexo masculino, e síndrome de Rett que ocorre em indivíduos do sexo feminino, demonstrando diferenças claras entre os gêneros em sua prevalência, dando peso à importância dos hormônios sexuais no controle respiratório (Kapsimalis e Kryger, 2002; Chahrour e Zoghbi, 2007).

Em humanos adultos e outros animais, os hormônios esteróides circulam em diferentes concentrações plasmáticas ao longo da vida (Behan e Kinkead, 2011). Em mulheres com ciclos regulares, as concentrações plasmáticas de estradiol estão altas durante a fase folicular e baixas na fase lútea tardia (Hotchkiss e Knobil, 1994). As concentrações plasmáticas de progesterona são mais elevadas na fase lútea e baixas na fase folicular. Em ratas, durante o ciclo estral, no estro as concentrações plasmáticas de estradiol estão baixas e começam a aumentar no metaestro e diestro, tendo um pico no proestro e retornando à linha de base no estro. A concentração plasmática de progesterona que está baixa no estro, aumenta durante o metaestro e diestro até decrescer, e em seguida, aumenta para atingir o pico no fim do proestro (Anselmo-Franci e Szawka, 2005 Figura 1). Em ratos, as concentrações plasmáticas de progesterona são muito menores que as fêmeas em qualquer fase do ciclo estral e as concentrações plasmáticas de estradiol são baixas assim como observados em fêmeas no estro (Gonzalez-Arenas *et al.*, 2004).



**Figura 1:** Perfil de secreção de hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH), prolactina, estradiol e progesterona durante o ciclo estral de ratas. O traço mais largo no eixo horizontal representa o período escuro do ciclo claro-escuro (12h/12h) (Anselmo-Franci e Szawka, 2005).

Estudos têm mostrado que, ao longo da vida, estrógeno e progesterona influenciam as funções respiratórias em animais e humanos (Dempsey *et al.*, 1986; Tatsumi *et al.*, 1995; Behan *et al.*, 2003). Durante a fase lútea em mulheres, por exemplo, a ventilação e o volume corrente estão aumentados (Schoene *et al.*, 1981; Slatkovska *et al.*, 2006; Dempsey e Olson, 1986), a  $P_a\text{CO}_2$  está reduzida, e a quimiossensibilidade central e periférica para hipercapnia e hipóxia estão aumentadas (Schoene *et al.*, 1981; White *et al.*, 1983; Dutton *et al.*, 1989) em relação à fase folicular. A administração de acetato de medroxiprogesterona, também aumenta a ventilação (Skatrud *et al.*, 1978; Zwillich *et al.*, 1978) e a quimiossensibilidade central e periférica (Zwillich *et al.*, 1978), sugerindo que a resposta ventilatória aumentada durante a fase lútea está relacionada com as concentrações plasmáticas mais elevadas de progesterona. Sabe-se que, durante a gravidez, as mulheres apresentam uma hiperventilação que está relacionada às elevadas concentrações plasmáticas de progesterona, que é considerada um potente estimulante para ventilação. Essa hiperventilação é importante para a manutenção adequada da oxigenação do feto (Bayliss *et al.*, 1987). É interessante notar que a ação combinada de estradiol e progesterona reduz a ocorrência de desordens respiratórias como a apnéia obstrutiva do sono (Block *et al.*, 1979; Saaresranta e Polo, 2002) e a desaclimatização a altitudes elevadas em mulheres (Léon-Valende *et al.*, 1997).

Na mulher adulta, as principais fontes de estradiol são, classicamente, as células da granulosa do folículo em desenvolvimento. Os hormônios sexuais, sintetizados nas gônadas, ligam-se a proteínas plasmáticas e alcançam o encéfalo via circulação sanguínea (Melcangi, 2006; Hojo *et al.*, 2008), e as concentrações plasmáticas destes hormônios esteróides no plasma variam ao longo do ciclo menstrual (Birzniece *et al.*, 2006). Devido ao fato dos hormônios esteróides serem lipofílicos e terem um baixo peso molecular, E2, P4 e T cruzam prontamente a barreira hematoencefálica e se tornam disponíveis para suas ações em locais-alvo que possuem os receptores apropriados (Schumacher *et al.*, 2003; Birzniece *et al.*, 2006, Banks *et al.* 2009).

Os mecanismos de ação e os efeitos do E2 ainda não estão completamente elucidados. Entretanto, acredita-se que estes sejam primariamente mediados através da ativação de receptores intracelulares de estrógeno (ERs), ER $\alpha$  e ER $\beta$ , distribuídos em vários órgãos tais como útero, mama, ovário, pulmão e rim, além de serem encontrados nos ossos e no encéfalo. (Birzniece *et al.*, 2006; Österlund, 2009.)

Os receptores de andrógenos (AR), de estrogênio (ER $\alpha$ , ER $\beta$ ), e de P4 (PR-A, PR-B) foram identificados em várias regiões respiratórias do encéfalo, incluindo no núcleo do trato solitário (NTS), no núcleo do hipoglosso, no núcleo motor do nervo frênico e corpo carotídeo. Estudos relatam um efeito inibitório do E2 em algumas áreas importantes para a ventilação (Xue e Hay, 2003; Ueyama *et al.*, 2006; Szawka *et al.*, 2009; Cason *et al.*, 2010). Em ratas anestesiadas castradas, o E2 reduz a atividade espontânea ou induzida por glutamato dos neurônios do NTS (Xue&Hay, 2003). Além disso, estudos *in vivo* que analisaram a expressão de c-fos em resposta a estímulos como estresse por imobilização (Ueyama *et al.*, 2006) e exposição a campo magnético (Cason *et al.*, 2010) relataram um efeito inibitório do E2 no LC em ratas OVX. Adicionalmente, estudo *in vitro*, em *slices* do tronco encefálico de ratas OVX, mostraram o mesmo efeito já que o E2 reduziu a taxa de disparo dos neurônios do LC (Szawka *et al.*, 2009). No que diz respeito ao LC, a P4 apresenta efeito excitatório nesse núcleo. Entretanto, esse efeito apenas é visto após uma ação prévia do E2 (Szawka *et al.*, 2009).

Em relação aos machos, sabe-se que concentrações plasmáticas elevadas de T podem ter um impacto sobre parâmetros respiratórios (Fogel *et al.*, 2001). Em ratos existe um aumento de T no período pré-natal, nos dias 18-19, e no período perinatal dentro de quatro horas após o parto. Este aumento hormonal promove masculinização e desfeminização do encéfalo e ocorre num momento em que o sistema de controle respiratório está passando por mudanças fundamentais de desenvolvimento (Holley *et al.* 2012).

Os estudos em animais fornecem algumas sugestões quanto aos mecanismos pelos quais a T pode alterar os parâmetros respiratórios. A administração de T aguda em gatos adultos castrados promove um aumento da resposta ventilatória hipóxica e hipercápnica, além aumentar a sensibilidade do corpo carotídeo (Tatsumi *et al.*, 1994). Saaresranta e Polo (2002) propuseram que a T estimula a respiração via periférica e/ou por meio da ativação dos quimiorreceptores centrais, contudo, não há nenhuma evidência indicando que os receptores de andrógenos estão presentes em corpos carótídeos. De fato, a T pode agir diretamente sobre os receptores de andrógenos ou ser metabolizada pela 5 $\alpha$ -redutase para um ligante mais potente de receptores de andrógeno, a 5 $\alpha$ -diidroT (DHT), presente em neurônios e células gliais (Celotti *et al.*, 1991). A T também pode ser metabolizada pela aromatase para 17 $\beta$ -E2 (E2) e exercer seus efeitos através dos receptores de estrogênio.

Enquanto alguns estudos relatam que não há diferença gênero-específica na resposta ventilatória a hipercapnia (Rebuck *et al.*, 1973; Schlenker e Goldman, 1985 Aitken *et al.*, 1986;), outros autores sugerem que machos apresentam uma maior resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub> comparado a fêmeas (Patrick e Howard, 1972; Saunders *et al.*, 1972; White *et al.*, 1983). Em contrapartida, Wenninger *et al.* (2009) demonstraram que fêmeas adultas apresentam uma maior resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub> que machos. Desta forma, não existe ainda um consenso sobre as diferenças na quimiossensibilidade respiratória de machos e fêmeas.

Adicionalmente, um estudo recente demonstrou que existem diferenças na marcação de c-fos em ratos machos e fêmeas expostas a 5% de CO<sub>2</sub>. Os ratos apresentaram maior marcação no núcleo retrotrapezóide durante a hipercapnia que as ratas. Já as fêmeas apresentaram maior marcação no bulbo rostral (Niblock *et al.*, 2010). De acordo com os autores, para tarefas fundamentais de detecção e resposta às alterações nos gases sanguíneos, machos e fêmeas podem contar com diferentes populações de células ou possuem sensibilidades distintas em quimiorreceptores diferentes.

Diferenças sexo-específicas do controle respiratório também têm sido observadas em estudos envolvendo o sistema serotoninérgico (Zabka *et al.*, 2001 a,b; Hodges *et al.*, 2011) cujos mecanismos de resposta a hipercapnia envolvem também o LC (de Souza Moreno *et al.*, 2010). Especificamente, a resposta ventilatória à hipercapnia de camundongos transgênicos machos que não possuem neurônios serotoninérgicos no SNC é atenuada, enquanto que a sensibilidade ao CO<sub>2</sub> de fêmeas transgênicas não é alterada, sugerindo um dimorfismo sexual na função do sistema serotoninérgico central em machos e fêmeas (Hodges *et al.*, 2011).

Outra diferença entre os sexos é a densidade de receptores de P4 em suas duas isoformas principais (PR-A e PR-B) que estão localizados em áreas centrais e periféricas que são importantes para o controle respiratório. Nos quimiorreceptores periféricos de adultos, recém-nascidos e fetos de rato, foi relatado uma densidade maior de receptores de P4, aparentemente localizadas em aglomerados de células quimiossensíveis e nos corpos carótídeos de ratos machos adultos comparando com fêmeas ( Joseph *et al*, 2006 ).

### **3.3 Hormônios gonadais: temperatura**

Em relação à regulação da T<sub>c</sub>, nas mulheres há uma variação de temperatura corporal basal ao longo do ciclo menstrual e em fêmeas no ciclo estral (Refinetti e Menaker, 1991). De fato, a temperatura corporal das mulheres pode aumentar cerca de 0,4°C após a ovulação em comparação com a fase luteal e fase folicular e o mesmo é observado em várias espécies. Em roedores, existe uma elevação da temperatura corporal imediatamente antes da ovulação (Refinetti e Menaker, 1991). Também é conhecido o aumento do consumo de oxigênio (VO<sub>2</sub>) na fase luteal do ciclo menstrual. Este aumento de VO<sub>2</sub> é um fenômeno pós-ovulatório, possivelmente mediado por hormônios, principalmente P4 (Das e Jana, 1991).

Diversos estudos relatam uma queda na temperatura retal de ratas durante a noite do proestro, quando a fêmea está sexualmente receptiva (Neiburgs *et al.*, 1946; McLean e

Coleman, 1971). Dentro das próximas 24 horas (durante a noite do estro) a temperatura corporal aumenta e se mantém elevada até o próximo proestro. Alguns autores acreditam que a queda da temperatura que ocorre no proestro é devido à presença de concentrações plasmáticas elevadas de estrogênios, contudo, é bastante claro que a P4 eleva a temperatura corporal dos ratos (Freeman *et al.*, 1970) e pode ser responsável pelo aumento da temperatura corporal observada após proestro nesta espécie.

Nas mulheres antes da menopausa, a administração exógena de contraceptivos orais desencadeia alterações na Tc que são consistentes com efeito hipertérmico da P4 e hipotérmico do estrogênio (Charkoudian e Johnson, 2000). Contudo, após ou durante a menopausa em mulheres, a administração de estrogênio pode diminuir (Brooks *et al.*, 1997; Tankersley *et al.*, 1992) ou não afetar a Tc (Cagnacci *et al.*, 1992; Freedman e Blacker, 2002). As mesmas discrepâncias são relatadas em ratas. A administração exógena de estrogênio em ratas ovariectomizadas pode aumentar (Marrone *et al.*, 1976; Hosono *et al.*, 1997) ou não alterar a Tc (Carlisle *et al.*, 1979; Laudenslager *et al.*, 1980; Katovich e O'Meara, 1989; Hosono *et al.*, 2001; Dacks e Rance, 2010). Já o consumo de oxigênio (VO<sub>2</sub>) não é influenciado pelo estrogênio (Laudenslager *et al.*, 1980, Yanase *et al.*, 1989).

Em camundongos fêmeas jovens, a Tc também é influenciada pelo ciclo estral, contudo, em geral a Tc é maior que nos machos (Sanchez-Alavez *et al.*, 2011). Esta diferença se acentua em fêmeas mais velhas em anestro. Os autores demonstraram que a gonadectomia bilateral aboliu os efeitos do estro e promoveu aumento da Tc nos machos, eliminando todas as diferenças específicas de cada sexo na Tc. Adicionalmente, os efeitos só foram parcialmente mimetizados pela reposição com P4, em menor expressão pelo estrogênio e sem nenhum efeito com a T.

Dentre as regiões sexualmente dimórficas do SNC está a área pré-óptica do hipotálamo (POA), que está envolvida no controle da Tc (Simerly *et al.*, 1990; Boden 2000). Os hormônios sexuais podem influenciar a Tc por ação direta sobre os neurônios da POA (Crews *et al* 1996;. Coomber *et al*, 1997;. Kruijver e Swaab 2001). Os receptores para P4, 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 e Boulant 1986; Tsai *et al* 1988, 1992.). No entanto, apenas os efeitos da P4 na Tc basal parecem ser mediados centralmente, enquanto que o estrogênio e a T parecem estar mais envolvidos em alterações da Tc em resposta à mudanças de temperatura ambiente (Brown *et al*, 1970;. Marrone *et al*, 1976;. Fregly *et al*. 1979). Contudo, de acordo com Sanchez-Alavez *et al.* (2011), a POA parece não estar envolvida nas diferenças gênero-específicas na Tc em animais gonadectomizados.

Portanto, considerando que as diferentes fases do ciclo estral não são consideradas em muitos estudos de fisiologia respiratória e de termorregulação, e devido ao fato dos hormônios sexuais poderem influenciar estas variáveis, nós avaliamos as respostas respiratórias ( $V_E$ ,  $V_T$  e  $fR$ ), metabólicas ( $VO_2$  e  $V_E/VO_2$ ) e termorreguladoras (Tc) de ratos não anestesiados, frente à hipercapnia (7%  $CO_2$ ) e normocapnia, em machos adultos intactos e orquidectomizados, fêmeas ovariectomizadas e tratadas com os principais hormônios ovarianos (E2 e P4) e fêmeas intactas em cada fase de seu ciclo estral.

#### 4. OBJETIVOS

Em vista das evidências expostas, o presente projeto possui os seguintes objetivos:

1) Comparar as respostas respiratórias ( $V_E$ ,  $V_T$  e  $fR$ ), metabólicas ( $VO_2$  e  $V_E/VO_2$ ) e termorreguladoras ( $T_c$ ) de ratas em diestro, proestro, metaestro e estro durante a normocapnia e hipercapnia;

2) Comparar as respostas respiratórias ( $V_E$ ,  $V_T$  e  $fR$ ), metabólicas ( $VO_2$  e  $V_E/VO_2$ ) e termorreguladoras ( $T_c$ ) de ratas intactas (em estro, fase na qual as concentrações plasmáticas de E2 e P4 estão mais baixas), ovariectomizadas controle e tratadas com os principais hormônios ovarianos (E2 e combinação de E2 e P4) durante a normocapnia e a hipercapnia (7%  $CO_2$ ).

3) Comparar as respostas respiratórias ( $V_E$ ,  $V_T$  e  $fR$ ), metabólicas ( $VO_2$  e  $V_E/VO_2$ ) e termorreguladoras ( $T_c$ ) de ratos intactos e orquidectomizados e ratas ovariectomizadas, tratadas com os principais hormônios ovarianos (E2 e combinação de E2 e P4) durante a normocapnia e a hipercapnia (7%  $CO_2$ ).

4) Comparar as respostas respiratórias ( $V_E$ ,  $V_T$  e  $fR$ ), metabólicas ( $VO_2$  e  $V_E/VO_2$ ) e termorreguladoras ( $T_c$ ) frente à normocapnia e hipercapnia (7%  $CO_2$ ) de fêmeas intactas, ovariectomizadas controle e machos intactos e orquidectomizados.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1. Animais**

Os experimentos foram realizados com ratos e ratas Wistar, pesando de 250 a 310g. Os animais foram acondicionados à temperatura controlada de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e submetidos a um ciclo claro/escuro de 12/12h. Os animais tiveram livre acesso à água e ração e os experimentos foram realizados entre as 9:00 e 13:00h. Os animais foram mantidos em caixas plásticas (40x32x17cm) em grupo de 5 animais por caixa. Nas fêmeas, o esfregaço vaginal foi colhido diariamente e analisado a fresco ao microscópio óptico. Somente ratas com pelo menos 5 ciclos estrais regulares e consecutivos foram utilizadas no experimento.

Os protocolos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV-UNESP (Protocolo: 007827-09).

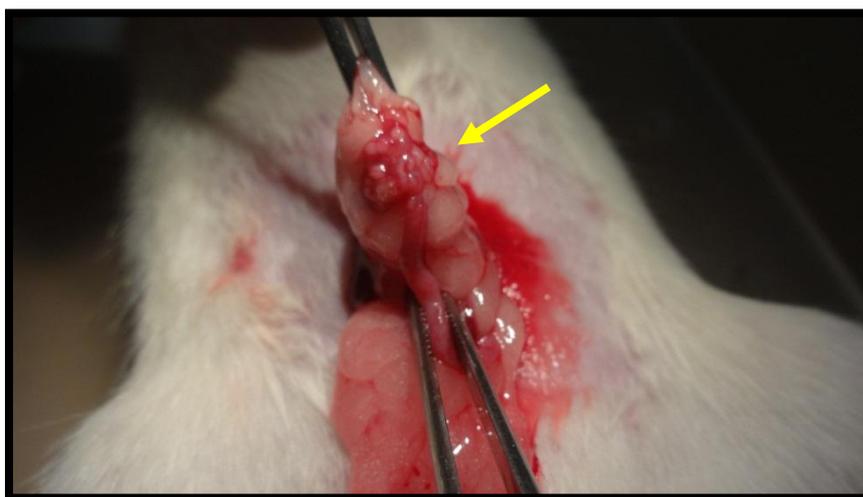
### **5.2 Procedimentos cirúrgicos**

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em animais anestesiados com ketamina (100 mg/Kg, i.p.; Agener, São Paulo, Brasil) e xilazina (10 mg/Kg, i.p.; Coopers, São Paulo, Brasil). Além disso, os animais receberam administração de antibiótico (10mg/kg, s.c.; Enrofloxacin, Flotril; Schering-Plough, São Paulo, Brasil) e analgésico (2,5mg/kg, s.c.; Flunixin meglumina, Banamina; Schering-Plough, São Paulo, Brasil).

#### **5.2.1. Castração e Reposição Hormonal**

Após serem anestesiadas as fêmeas passaram pela remoção dos ovários (ovariectomia). No animal anestesiado, em decúbito ventral, realizou-se uma incisão de aproximadamente três centímetros na pele e tecido celular subcutâneo sob à linha mediana. A

parede muscular foi então divulsionada para o acesso a cavidade abdominal, localizando o ovário em meio a uma massa gordurosa. Após ser localizado, o ovário (Figura 2) foi então retirado após ligadura da extremidade da tuba uterina, seccionando-se entre a ligadura e o ovário. Após a retirada dos ovários suturou-se a parede muscular e, em seguida, a pele.

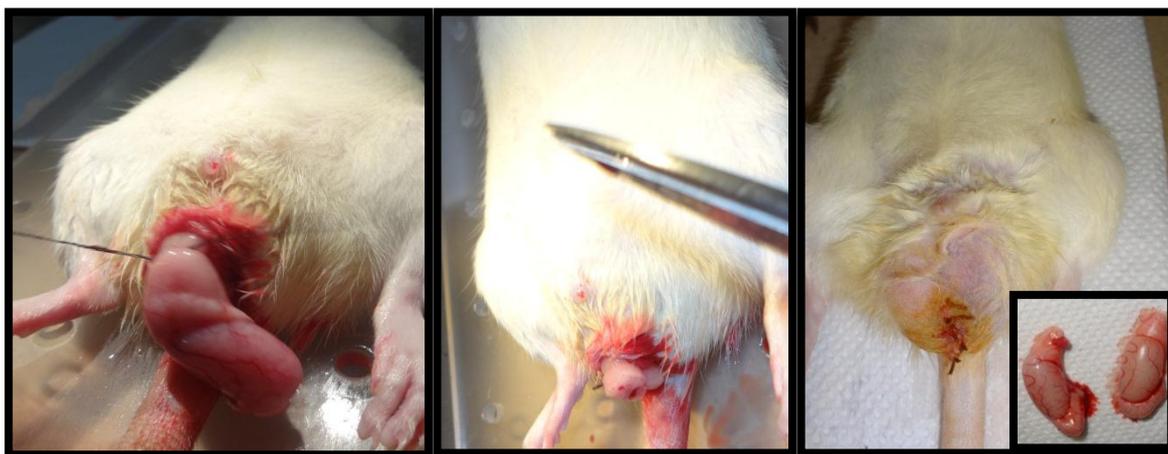


**Figura 2:** A seta aponta para o ovário em meio a massa gordurosa durante a cirurgia de ovariectomia.

Animais ovariectomizados 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 17 $\beta$ -E2 (grupo OVX+E2 - 10  $\mu$ g / 0,2 mL / rata, s.c., OE2Cypionate, 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 17 $\beta$ -E2 (10  $\mu$ g / 0,2 mL / rata, s.c., cipationato de E2, Pfizer, São Paulo, Brasil; Szawka *et al.*, 2009) e P4 no quarto dia (grupo OVX + EP - 2,5 mg / 0,2 ml / rato, sc, Sigma, St Louis, MO, EUA). Todas as injeções foram realizadas de forma subcutânea no dorso às 8:00 horas da manhã. No dia do experimento o esfregaço vaginal foi realizado. Animais cuja reposição hormonal não foi eficiente apresentavam leucócitos na lâmina não sendo utilizados para nossos

experimentos. 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 (Figura3).



**Figura 3:** Fotografias do processo de orquidectomia bilateral, em que através de uma incisão no escroto os testículos são retirados.

### **5.2.2- Medidas da temperatura corporal:**

Nos animais castrados foi implantado um sensor e registrador integrado para registro da temperatura (“data loggers”) (SubCue, Calgary, AT, CA). O sensor foi implantado na cavidade abdominal dos ratos, através de uma incisão na parede abdominal. Animais intactos foram anestesiados com Tribromo (0,1mL/100g) uma semana antes do experimento para a implantação do sensor.

### **5.3. Determinação da Ventilação**

A ventilação foi medida por pletismografia de corpo inteiro em sistema fechado (Bartlett e Tenney, 1970) (Figura 4). Durante a realização de cada medida de ventilação, o fluxo de ar foi interrompido e a câmara do animal permaneceu totalmente vedada por aproximadamente 2 minutos. As oscilações da temperatura do ar da câmara causadas pela

respiração foram medidas como oscilações de pressão, pelo fato do volume de ar corrente inspirado ser aquecido da temperatura da câmara à  $T_C$  e saturado com vapor de água, enquanto que o volume de ar corrente expirado ser novamente esfriado até a temperatura da câmara. Sinais de um transdutor de diferencial de pressão, conectado à câmara do animal e a uma câmara de referência, foram coletados por um pré-amplificador, passando por um conversor analógico-digital, digitalizados em um computador equipado com um programa para aquisição e análise de dados (AcqKnowledge MP 100, BioPac Systems, Inc., Santa Barbara, CA, EUA). A calibração do volume foi obtida durante cada experimento, injetando-se um volume conhecido de ar dentro da câmara do animal (1mL) com o uso de uma seringa graduada. A linearidade da resposta pletismográfica foi testada injetando diferentes volumes de ar (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, e 1mL;  $r^2=0.98$ ) indicando a ordem dos volumes correntes esperados. Duas variáveis respiratórias foram medidas, a frequência respiratória (fR) e o volume corrente ( $V_T$ ), sendo o último calculado por meio da fórmula de Malan (1973):

$$V_T = V_K \times P_T/P_K \times T_A/T_R \times (P_B - P_C)/[(P_B - P_C) - T_A/T_C] \times (P_B - P_R)$$

$V_T$ : Volume de ar corrente.

$V_K$ : Volume de ar injetado na câmara do animal para calibração.

$P_T$ : Deflexão de pressão associada com cada volume de ar corrente.

$P_K$ : Deflexão de pressão associada ao volume injetado para calibração.

$T_C$ : Temperatura corporal (em Kelvin).

$T_R$ : Temperatura do ambiente.

$T_A$ : Temperatura do ar dentro da câmara do animal.

$P_R$ : Pressão de vapor da água a  $T_C$ .

$P_B$ : Pressão barométrica.

$P_C$ : Pressão de vapor do vapor de água na câmara do animal.

A ventilação ( $\dot{V}_E$ ) foi calculada pelo produto da frequência respiratória (fR) pelo volume corrente ( $V_T$ ). A  $\dot{V}_E$  e o  $V_T$  foram apresentados nas condições de pressão barométrica

ambiente, à  $T_C$  e saturados com vapor d'água (BTPS). De acordo com Malan (1973),  $T_R$  pode ser levemente menor que a  $T_A$  devido à produção de calor do animal dentro da câmara. A  $P_C$  foi calculada indiretamente utilizando uma tabela apropriada (Dejours, 1981).



**Figura 4:** Câmara de plethysmografia de corpo inteiro e câmara de referência.

O fluxo de gases no interior das câmaras foi medido por um fluxômetro (Modelo 822-13-OV1-PV2-V4, Sierra Instruments, Monterey, CA) mantido de 0,8 a 1 L/min. A mistura gasosa utilizada para hipercapnia foi de 7% de  $CO_2$ , 21%  $O_2$  e equilibrada com  $N_2$ , adquirida na empresa White Martins (Sertãozinho, Brasil).

Todos os experimentos foram realizados entre as 9:00 e 13:00 h.

#### **5.4. Consumo de oxigênio ( $VO_2$ )**

$VO_2$  foi determinado por meio de respirometria fechada. A técnica consiste em registrar a alteração da porcentagem de  $O_2$  dentro da câmara de plethysmografia do animal ao longo de 5 min. Este registro acontece quando a câmara é vedada e conectada a um analisador de  $O_2$  que está acoplado a um sistema de aquisição de dados (Power Lab 16/30, ADI Instruments, Austrália) que, por sua vez, contém uma bomba de sucção que puxava o ar da câmara para dentro do analisador. Em seguida, o coeficiente angular da relação entre tempo e % de  $O_2$  foi obtido a partir do software LabChart que acompanha o sistema da ADI. Este valor, corrigido pelo volume da câmara e pela massa corporal do animal, resulta no  $VO_2$  que, por sua vez, será corrigido para condições padrão de temperatura, pressão atmosférica e ar

seco (STPD). Antes dos registros, o analisador foi calibrado com duas misturas gasosas contendo frações conhecidas de O<sub>2</sub>. Durante os 5 minutos em que a câmara permanece fechada a redução da porcentagem de O<sub>2</sub> interna é de no máximo 1%, o que não é considerada uma variação significativa para o animal (Almeida *et al.*, 2004)

### **5.5. Dosagem Hormonal**

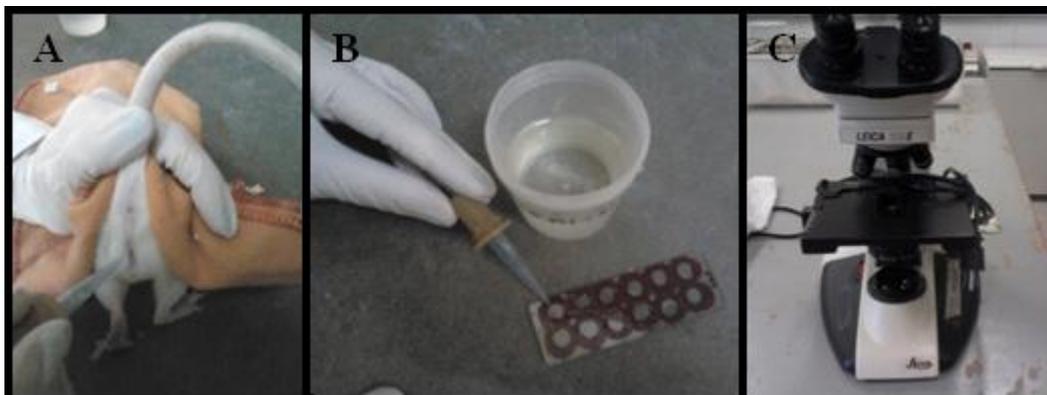
As dosagens hormonais foram realizadas no Laboratório de Neuroendocrinologia da reprodução da Profa. Dra. Janete Aparecida Anselmo Franci (FORP-USP). Em todos os protocolos descritos acima foi realizada punção cardíaca imediatamente após o experimento. Para isso os animais foram anestesiados com solução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

As concentrações plasmáticas de E2 e P4 foram determinadas por radioimunoensaio utilizando kits específicos da MP Biomedicals (Orangeburg, NY, USA) seguindo as instruções do fabricante. Com o objetivo de evitar variações interensaio, todas as amostras foram analisadas no mesmo ensaio. A sensibilidade para o teste de E2 e P4 foi de 5,0 pg/mL e 0,01 ng/mL respectivamente. O coeficiente de variação intra-ensaio foi 6% para E2 e 6,7% para P4.

### **5.6. Determinação da fase do ciclo estral**

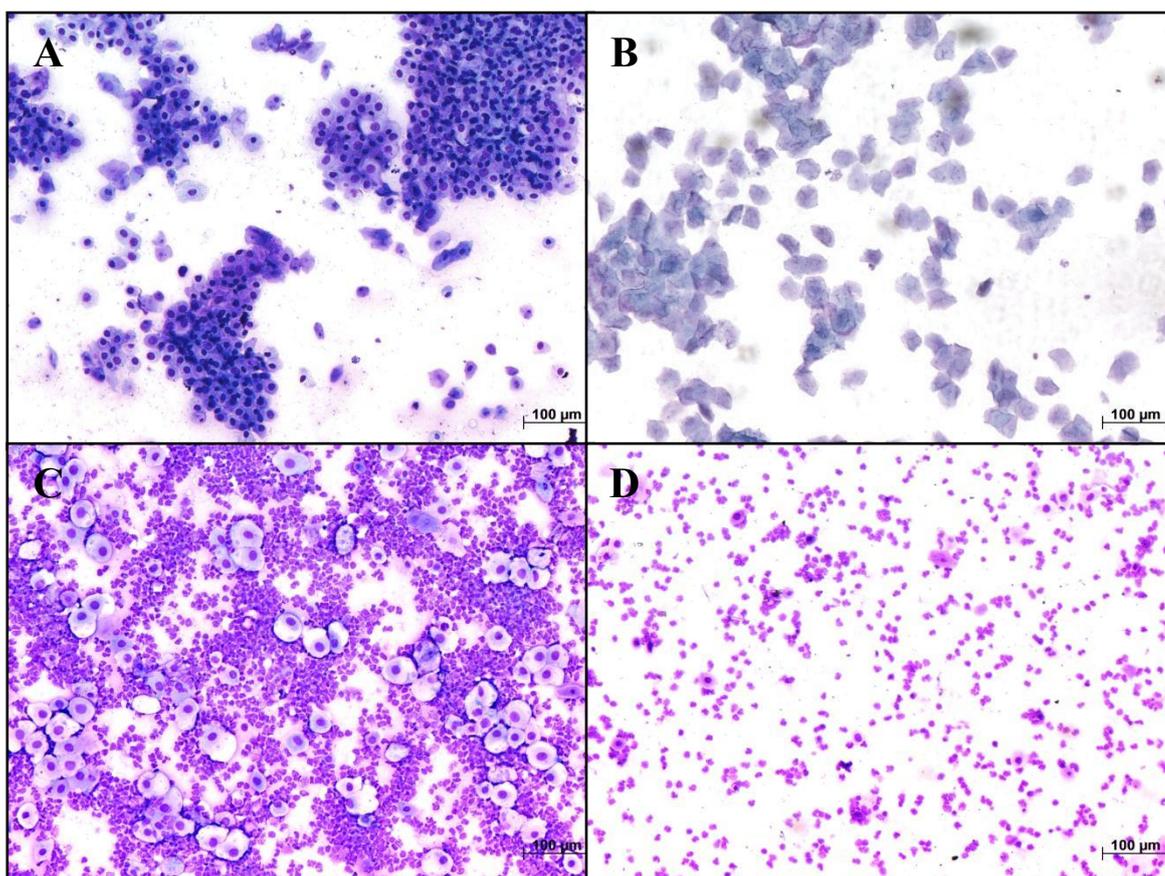
Os esfregaços vaginais foram realizados diariamente para verificar a regularidade do ciclo estral e somente ratas que mostraram pelo menos cinco ciclos 4 ou 5 dias regulares vezes foram incluídas neste estudo. O esfregaço vaginal foi realizado as 9:00 horas, e

imediatamente colocado sobre uma lâmina de vidro e analisado a fresco ao microscópio óptico. Conforme a sequencia a seguir (Figura 5):



**Figura 5:**(A) O esfregaço vaginal colhido a fresco diluído em salina (9%) e colocado em lâmina (B) para observação em microscópio óptico (C).

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- células epiteliais predominantemente nucleadas; 2) estro- células epiteliais cornificadas predominantemente; 3) metaestro – leucócitos com a presença de células nucleadas e cornificadas em menores proporções e 4) diestro- predominância de leucócitos (Goldman, 2007) como observado na figura 1. Um ciclo estral regular consiste na observação sequencial de todas as fases como na figura 6 a seguir:



**Figura 6:** Caracterização das células de esfregaço vaginal a fresco de ratas wistar que determinam a fase do ciclo estral. **A)** proestro- células epiteliais predominantemente nucleadas. **B)** estro- células epiteliais cornificadas predominantemente; **C)** metaestro – leucócitos com a presença de células nucleadas e cornificadas em menores proporções e **D)** diestro com a predominância de leucócitos.

#### 5.4. Protocolos Experimentais

##### 5.4.1. Efeito das diferentes fases do ciclo estral de ratas na resposta respiratória e metabólica e na temperatura corporal em normocapnia e hipercapnia

Após a observação de pelo menos 5 ciclos regulares, ratas no dia de diestro (n=4), proestro (n=8), metaestro (n=4) e estro (n=6) foram previamente colocadas em uma câmara pletismográfica e a Tc foi continuamente medida por meio dos dataloggers. A câmara foi inicialmente ventilada com ar atmosférico umedecido por um período de aclimação decerca de uma hora. Foram então realizadas medidas controle de ventilação e consumo de O<sub>2</sub>. Em seguida, as ratas foram submetidas à hipercapnia, por 30 min, onde a câmara foi ventilada

com uma mistura gasosa umedecida contendo 7% de CO<sub>2</sub>, 21% O<sub>2</sub> e equilibrada com N<sub>2</sub>. A medida respiratória foi realizada aos 30 min da exposição à hipercapnia e seguida da medida de VO<sub>2</sub>.

**5.4.2. Efeito da ovariectomia e reposição hormonal com E2 e E2 com P4 na resposta respiratória e metabólica e na temperatura corporal em normocapnia e hipercapnia de ratas**

O experimento foi conduzido em fêmeas intactas em estro (n=6), ovariectomizadas tratadas com veículo (OVX+O, n=6) ou E2 (OVX+E2, n=6) ou E2 com P4 (OVX+EP, n=5). Sete dias após a castração (dia 8), os animais foram previamente colocados em uma câmara pletismográfica e a Tc foi continuamente medida por dataloggers. A câmara foi inicialmente ventilada com ar atmosférico umedecido por um período de aclimatação de no mínimo 1 hora. Foram então realizadas medidas controle de ventilação e consumo de O<sub>2</sub>. Em seguida, o animal foi submetido à hipercapnia, por 30 min, onde a câmara foi ventilada com uma mistura gasosa umedecida contendo 7% de CO<sub>2</sub>, 21% O<sub>2</sub> e equilibrada com N<sub>2</sub>. A medida respiratória foi realizada aos 30 min da exposição à hipercapnia e seguida da medida de VO<sub>2</sub>.

**5.4.3. Efeito da orquidectomia na resposta respiratória e metabólica e na temperatura corporal em normocapnia e hipercapnia de ratos**

O experimento foi conduzido em machos orquidectomizados (ORX, n=5) e intactos (n=6). Sete dias após a castração, os animais foram previamente colocados em uma câmara pletismográfica e a Tc foi continuamente medida por dataloggers. A câmara foi inicialmente ventilada com ar atmosférico umedecido por um período de aclimatação de no mínimo 1 hora. Foram então realizadas medidas controle de ventilação e consumo de O<sub>2</sub>. Em seguida, o animal foi submetido à hipercapnia, por 30 min, onde a câmara foi ventilada com uma mistura

gasosa umedecida contendo 7% de CO<sub>2</sub>, 21% O<sub>2</sub> e equilibrada com N<sub>2</sub>. A medida respiratória foi realizada aos 30 min da exposição à hipercapnia e seguida da medida de VO<sub>2</sub>.

#### **5.4.4. Efeito do dimorfismo sexual nas respostas respiratórias, metabólicas e termorreguladoras em normocapnia e hipercapnia.**

Verificamos a influência dos hormônios gonadais, principais agentes na diferenciação sexual entre machos e fêmeas, através da comparação das respostas respiratórias (V<sub>E</sub>, V<sub>T</sub> e fR), metabólicas (VO<sub>2</sub> e V<sub>E</sub>/VO<sub>2</sub>) e termorreguladoras (T<sub>c</sub>) frente à normocapnia e hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>) de fêmeas intactas em estro (n=6), ovariectomizadas controle (OVX, n=6), machos intactos (n=6) e orquidectomizados (ORX, n=5).

#### **5.5. Análise de dados**

V<sub>E</sub>,fR, V<sub>T</sub>, T<sub>c</sub>, VO<sub>2</sub> e V<sub>E</sub>/VO<sub>2</sub> foram comparados entre os grupos por Two -Way ANOVA. Para determinar o efeito da hipercapnia, os dados coletados em condições normocápnicos e hipercápnicos foram comparados por meio de One Way-ANOVA. O nível de significância foi fixado em P <0,05. A análise estatística foi realizada utilizando o software de computador (estatísticas sigma; Systat Software, Point Richmond, Califórnia EUA). Os dados são apresentados como médias de grupo ± SEM para cada um dos parâmetros investigados.

## 6. RESULTADOS

Os valores de  $V_E$ , fR,  $V_T$ , Tc,  $VO_2$  e  $V_E/VO_2$  de todos os grupos analisados estão representados nas tabelas 1, 2 e 3.

**Tabela 1:**  $V_E$ , fR,  $V_T$ , Tc,  $VO_2$  e  $V_E/VO_2$  durante normocapnia e hipercapnia de fêmeas em proestro (n=8), estro (n=6), metaestro (n=4), diestro (n=4). O símbolo \* indica diferença entre grupos (P<0,05)

	<b>Proestro</b>	<b>Estro</b>	<b>Metaestro</b>	<b>Diestro</b>
Massa corporal (g)	260±7	277±7	252±7	295±4
P4 (ng/mL)	29,9± 6,4	12,1±1,7*	25,4±4,9	29,6±6,7
Estrógeno (pg/mL)	194,1±13,6*	113,8±9,1	111±27	112±16
<b>Normocapnia</b>				
$\dot{V}_E$ (L.min <sup>-1</sup> )	608,5±65,7	647,3±68,8	576,1±76,2	525,9±96,2
$V_T$ (mL.Kg <sup>-1</sup> )	7,2±0,8	7,6±0,8	7,8±0,6	6,5±0,7
fR (ciclos por min <sup>-1</sup> )	84,4±2,8	86,2±7,3	74,0±7,7	79,5±6,7
$\dot{V}O_2$ (mL.min <sup>-1</sup> .100 g peso corporal <sup>-1</sup> )	16,9±1,1	16,8±1,9	16,5±1,3	15,4±1,9
$\dot{V}_E/\dot{V}O_2$	37,1±4,4	42,6±8,1	32,9±2,1	42,9±12,7
Tc (°C)	37,4±0,1	38,1±0,1*	37,5±0,2	37,2±0,1
<b>Hipercapnia</b>				
$\dot{V}_E$ (L.min <sup>-1</sup> )	2762,0±353,6	2694,0±248,9	2278,0±473,9	2359±112,5
$V_T$ (mL.Kg <sup>-1</sup> )	19,1±2,2	19,5±2,4	15,7±2,6	16,9±1,2
fR (ciclos por min <sup>-1</sup> )	132,9±8,7	142,0±8,0	143,0±9,8	141,0±9,0
$\dot{V}O_2$ (mL.min <sup>-1</sup> .100 g peso corporal <sup>-1</sup> )	15,4±0,8	15,5±1,1	12,6±0,6	13,9±0,4
$\dot{V}_E/\dot{V}O_2$	188,2±30,3	181,5±28,4	170,4±33,9	189,2±17,2
Tc (°C)	37,2±0,1	37,8±0,2*	37,2±0,1	37,0±0,1

**Tabela 2:**  $V_E$ , fR,  $V_T$ , Tc,  $VO_2$  e  $V_E/VO_2$  durante normocapnia e hipercapnia de fêmeas ovariectomizadas que tiveram injeção de óleo (OVX+O, n=6), Cipionato de E2 (OVX+E2, n=6), uma combinação de Cipionato de E2 e P4 (OVX+EP, n=5). O símbolo \* indica diferença entre grupos ( $P<0,05$ )

	<b>OVX+O</b>	<b>OVX+E2</b>	<b>OVX+EP</b>
Massa corporal (g)	298±10	281±11	310±8
<b>Normocapnia</b>			
$\dot{V}_E$ (L.min <sup>-1</sup> )	397,9±17,8	468,9±32,7	417,1±37,0
$V_T$ (mL.Kg <sup>-1</sup> )	5,3±0,6	6,7±0,60	6,6±0,52
fR (ciclos por min <sup>-1</sup> )	78,2±7,1	79,0±4,2	77,5±3,8
$\dot{V}O_2$ (mL.min <sup>-1</sup> .100 g peso corporal <sup>-1</sup> )	14,9±0,9	13,2±0,5	11,0±1,0
$\dot{V}_E/\dot{V}O_2$	27,0±2,1	35,71±2,4	38,3±2,8
Tc (°C)	37,5±0,3	37,3±0,2	37,2±0,3
<b>Hipercapnia</b>			
$\dot{V}_E$ (L.min <sup>-1</sup> )	1171±45,9	1165,1±90,2	1162,8±95,9
$V_T$ (mL.Kg <sup>-1</sup> )	9,9±0,7	12,1±0,9	12,0±0,4
fR (ciclos por min <sup>-1</sup> )	120,8±9,1	109,8±3,2	118,5±6,6
$\dot{V}O_2$ . (mL.min <sup>-1</sup> .100 g peso corporal <sup>-1</sup> )	15,8±1,3	12,1±0,97	12,4±0,7
$\dot{V}_E/\dot{V}O_2$	76,1±6,5	102,9±17,5	94,0±6,7
Tc (°C)	37,5±0,3	37,3±0,2	36,7±0,6

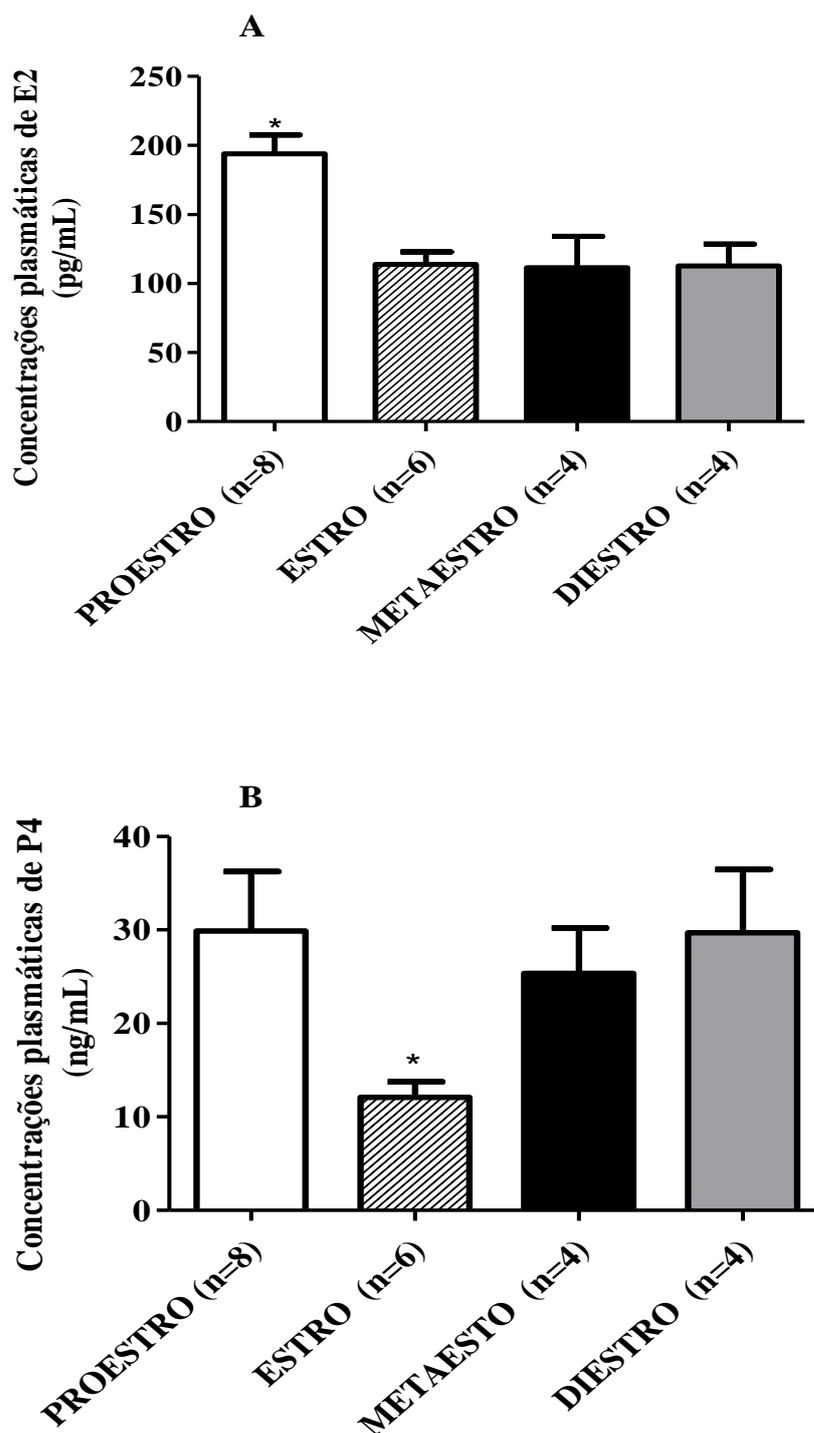
**Tabela 3:**  $V_E$ , fR,  $V_T$ , Tc,  $VO_2$  e  $V_E/VO_2$  durante normocapnia e hipercapnia de machos intactos (n=6) e orquidectomizados (ORX, n=5). O símbolo \* indica diferença entre grupos (P<0,05)

	<b>Macho Intacto</b>	<b>ORX</b>
Massa corporal (g)	342±1	373±1
<b>Normocapnia</b>		
$\dot{V}_E$ (L.min <sup>-1</sup> )	596,7±11,9*	429,9±12,0
$V_T$ (mL.Kg <sup>-1</sup> )	6,8±0,5*	4,8±0,3
fR (ciclos por min <sup>-1</sup> )	82±2,6*	89,8±3,7
$\dot{V}O_2$ . (mL.min <sup>-1</sup> .100 g peso corporal <sup>-1</sup> )	12,9±0,8	12,1±0,9
$\dot{V}_E/\dot{V}O_2$	43,0±0,8*	34,3±1,7
Tc (°C)	37,0±0,1	36,9±0,2
<b>Hipercapnia</b>		
$\dot{V}_E$ (L.min <sup>-1</sup> )	1511±84,9*	1108±68,8
$V_T$ (mL.Kg <sup>-1</sup> )	10±0,9*	8,4±0,6
fR (ciclos por min <sup>-1</sup> )	131,3±7,8	132,2±3,9
$\dot{V}O_2$ . (mL.min <sup>-1</sup> .100 g peso corporal <sup>-1</sup> )	12,8±0,6	15,0±1,0
$\dot{V}_E/\dot{V}O_2$	98,4±12,3*	76,3±8,8
Tc (°C)	37,0±0,1	37,0±0,1

**6.1.Efeito das diferentes fases do ciclo estral de ratas na resposta respiratória e metabólica e na temperatura corporal em normocapnia e hipercapnia**

**6.1.1Determinação do ciclo estral**

Além da observação diária em microscópio óptico, o ciclo estral também foi confirmado pela quantificação hormonal de estrógeno e P4 no plasma sanguíneo. A Figura 7 mostra que a concentração plasmática de E2 foi significativamente mais elevada em proestro ( $194,1 \pm 13,6$  pg/mL  $P < 0,05$ ) em comparação com estro ( $113,8 \pm 9,1$  pg/mL), metaestro ( $111 \pm 27$  pg/mL) e diestro ( $112,2 \pm 12,8$  pg/mL). A concentração plasmática de P4 foi menor no estro ( $12,1 \pm 1,7$  pg/mL,  $P < 0,05$ ) em comparação com proestro ( $29,9 \pm 6,4$  pg/mL) metaestro ( $25,5 \pm 4,5$  pg/mL) e diestro ( $29,6 \pm 6,7$  pg/mL).

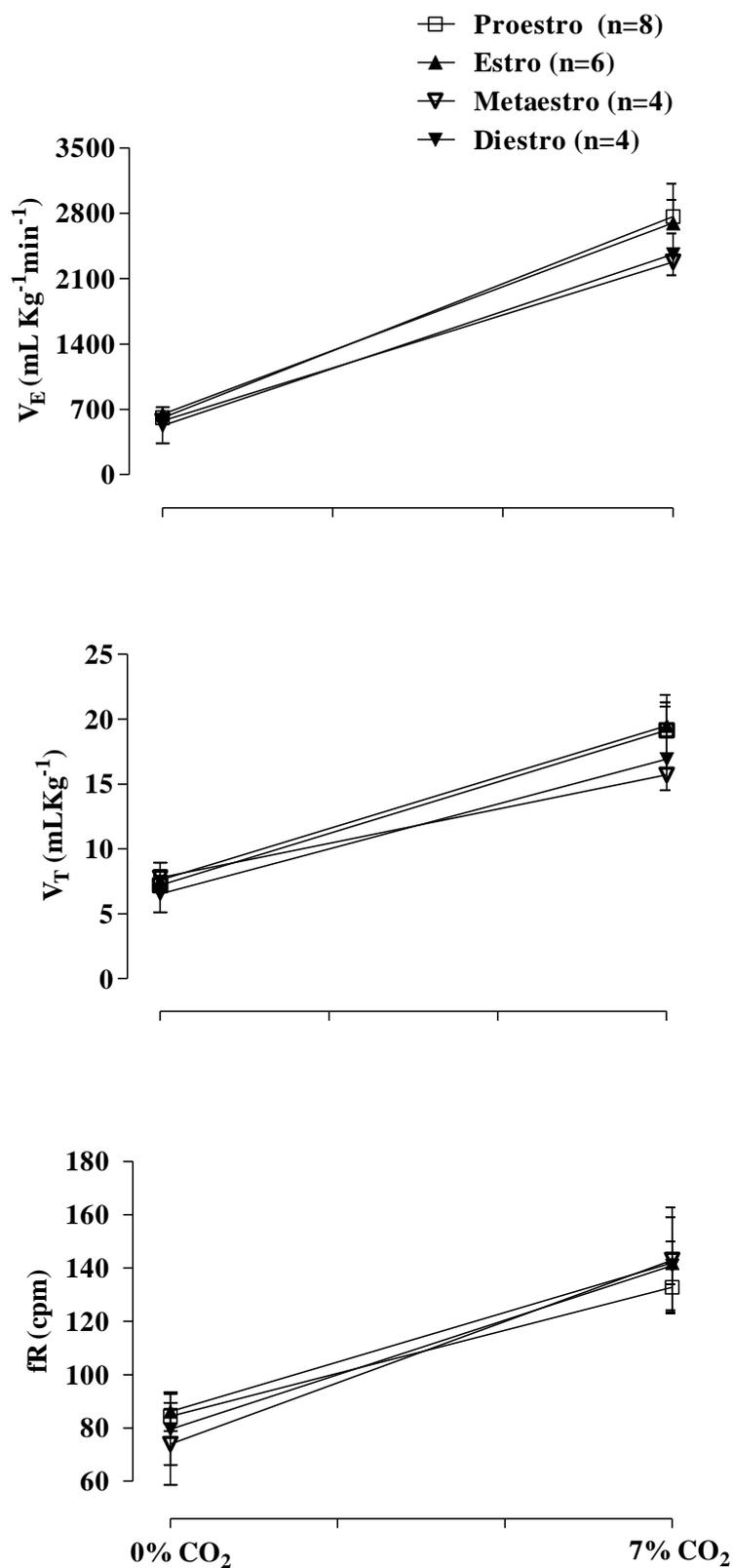


**Figura 7: Variações nas** concentração plasmática de E2 (A) e P4 (B) durante as diferentes fases do ciclo estral. Observa-se que a concentração plasmática de E2 foi significativamente mais elevada em proestro comparada as demais fases, já a concentração plasmática de P4 foi menor no estro em comparação com proestro, metaestro e diestro. O símbolo \* indica diferença entre grupos ( $P < 0,05$ ).

### **6.1.2 Ventilação pulmonar**

Durante os experimentos, a temperatura média interna da câmara de pletismografia foi de  $26,4 \pm 0,2^\circ \text{C}$ , e a temperatura ambiente média foi de  $24,9 \pm 0,2^\circ \text{C}$  (média  $\pm$  SEM) para todos os grupos.

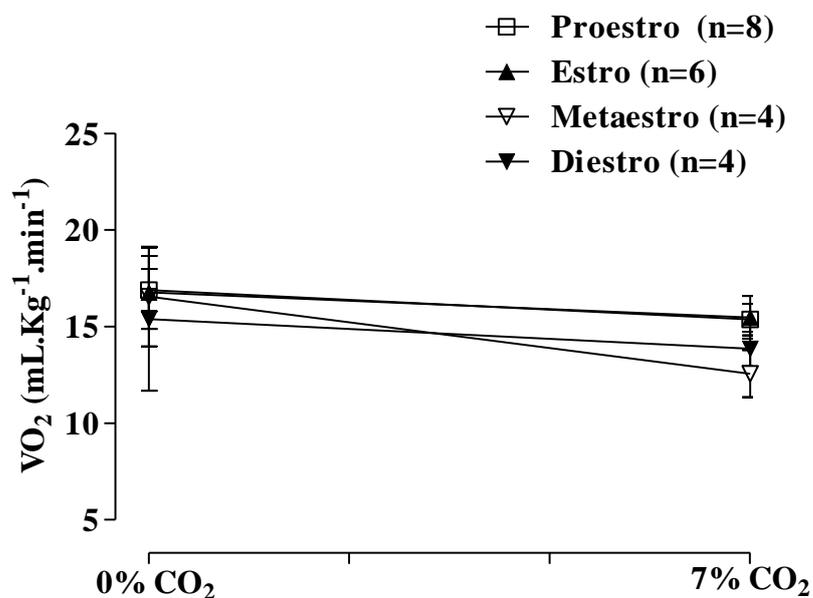
Em condições normocápnicas nenhuma diferença na ventilação foi observada nas ratas em diferentes fases do ciclo estral. A hipercapnia causou um aumento na ventilação pulmonar em todos os grupos (efeito do tempo:  $P < 0,0001$ ;  $F_{(3,22)} = 131,7$ ; sem interação:  $P = 0,76$ ), que foi o resultado de uma combinação do  $V_T$  (efeito do tempo:  $P < 0,0001$ ;  $F_{(3,22)} = 84,6$ ; sem interação:  $P = 0,6015$ ) e da fR (efeito do tempo:  $P < 0,0001$ ;  $F_{(3,22)} = 301,1$ ; sem interação:  $P = 0,1859$ ). Não houve diferença entre os grupos. (Figura 8, Anexo1).



**Figura 8:** Ventilação ( $V_E$ ), volume corrente ( $V_T$ ) e frequência respiratória (fR) das ratas em proestro, estro, metaestro e diestro durante normocapnia (0% CO<sub>2</sub>) e hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>).

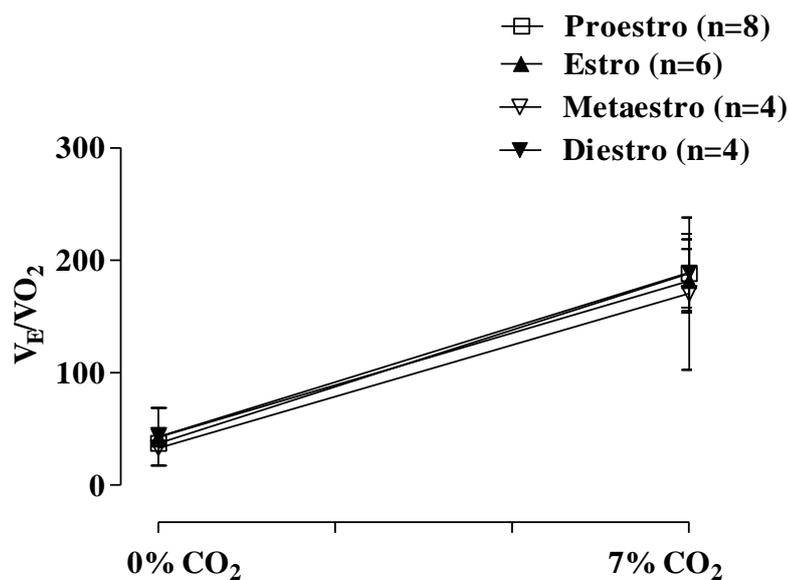
### 6.1.3. $VO_2$ e $V_E/VO_2$

Em relação ao  $VO_2$ , todos os grupos apresentaram uma redução do  $VO_2$  durante a hipercapnia (efeito do tempo:  $p = 0,0275$ ;  $F_{(3,22)} = 5,754$ ; sem interação). Nenhuma diferença foi observada entre os grupos, Figura 9, ANEXO 1.



**Figura 9:** Consumo de  $O_2$  ( $VO_2$ ) das ratas em proestro, estro, metaestro e diestro durante normocapnia (0%  $\text{CO}_2$ ) e hipercapnia (7%  $\text{CO}_2$ )

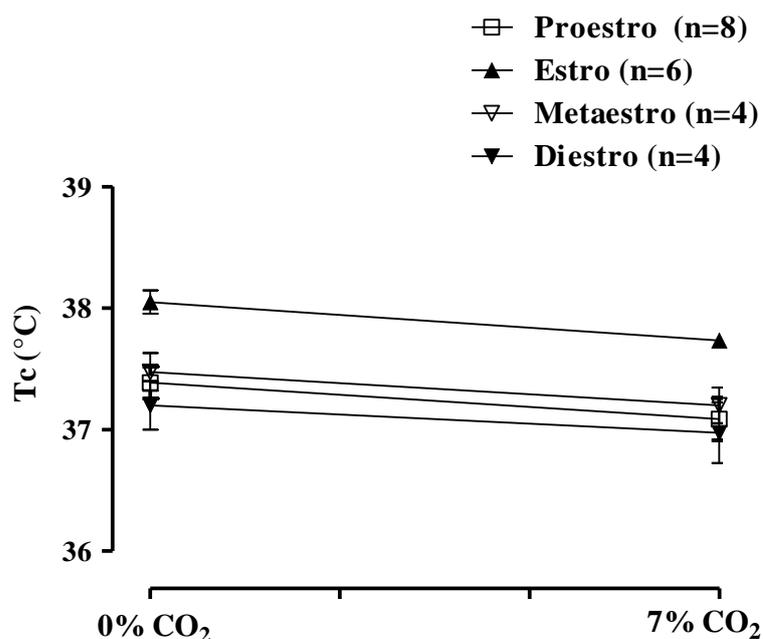
A hipercapnia causou um aumento significativo no equivalente respiratório  $V_E/VO_2$  (efeito do tempo:  $P < 0,001$ ;  $F_{(3,22)} = 85,62$ ; sem interação:  $P = 0,9843$ ), no entanto não houve diferença entre os grupos (Figura 10, Anexo 1).



**Figura 10:** Equivalente respiratório ( $V_E/VO_2$ ) das ratas em proestro, estro, metaestro e diestro durante normocapnia (0%  $CO_2$ ) e hipercapnia (7%  $CO_2$ ).

#### 6.1.4. Temperatura corporal

A  $T_c$  das ratas em estro foi maior que nas demais fases (efeito do ciclo:  $p < 0,0015$ ,  $F_{(3,22)} = 7,8$ ) durante a normocapnia e hipercapnia (efeito do tempo:  $P = 0,0003$ ;  $F_{(3,22)} = 20,20$ ; sem interação:  $P = 0,096$ ), assim como observado na figura 11 e Anexo 1.

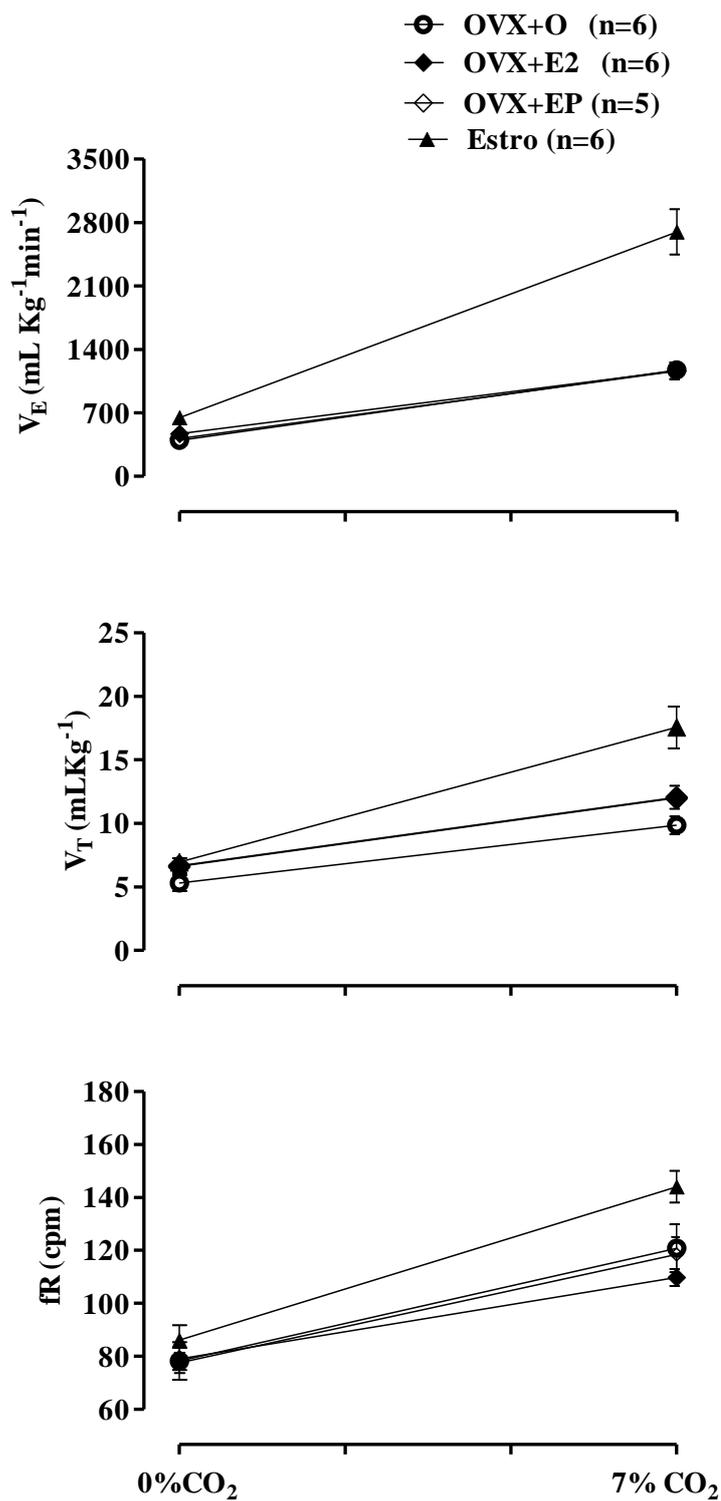


**Figura 11:** Temperatura corporal (Tc) das ratas em proestro, estro, metaestro e diestro durante normocapnia (0% CO<sub>2</sub>) e hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>).

**6.2. Efeito da ovariectomia e reposição hormonal com E2 e E2 e P4 na resposta respiratória e metabólica e na temperatura corporal em normocapnia e hipercapnia de ratas**

**6.2.1 Ventilação pulmonar**

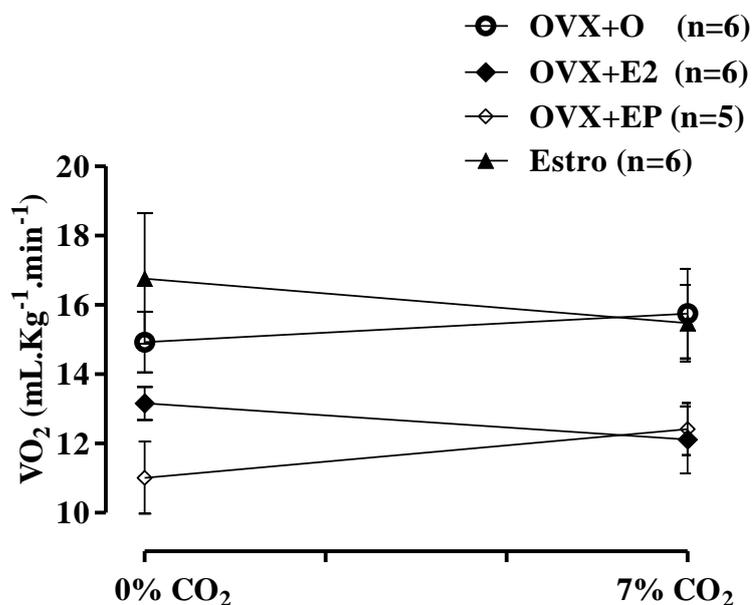
Durante a normocapnia, não observamos diferença significativa nos parâmetros ventilatórios entre os grupos. Observamos na figura 12 que a hipercapnia causou um aumento significativo na ventilação pulmonar em todos os grupos- figura 12, (efeito da hipercapnia:  $P < 0,001$ ,  $F_{(3,19)} = 360,1$ , sem interação), resultado de uma combinação do  $V_T$  (efeito do tempo:  $P < 0,001$ ,  $F_{(3,19)} = 234,9$ , sem interação e sem efeito da reposição hormonal) e fR (efeito do tempo:  $P < 0,001$ ,  $F_{(3,19)} = 137,4$ , sem interação e sem efeito da reposição hormonal). Os animais em estro apresentaram maior  $V_E$  comparado aos demais grupos ( $P < 0,001$ ) devido ao  $V_T$  ( $P < 0,001$ ) e fR ( $P < 0,001$ ).



**Figura 12:** Ventilação ( $V_E$ ), volume corrente ( $V_T$ ) e frequência respiratória ( $fR$ ) das ratas durante normocapnia (0%  $CO_2$ ) e hipercapnia (7%  $CO_2$ ) nos animais intactos em estro, ovariectomizadas que receberam óleo (OVX+O), reposição hormonal com cipionato de E2 (OVX+E2), ou uma combinação de cipionato de E2 e P4 (OVX+EP).

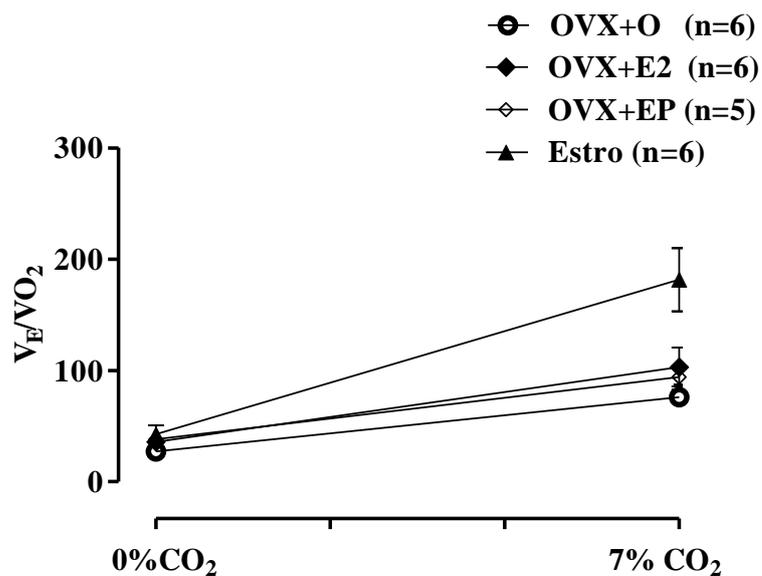
### 6.2.2. $VO_2$ e $V_E/VO_2$

Em normocapnia, o consumo de oxigênio dos animais do grupo estro foi menor que o grupo OVX+EP ( $P < 0,05$ ). Não houve diferenças entre os grupos em condições hipercápnicas (efeito do tempo:  $p=0,97$  e  $F_{(3,22)} = 0,001$ ) (Figura 13, anexo).



**Figura 13:** Consumo de O<sub>2</sub> ( $VO_2$ ) das ratas em estro, ovariectomizadas que receberam óleo (OVX+O), cipionato de E2 (OVX+E2), ou uma combinação de cipionato de E2 e P4 (OVX+EP). durante normocapnia (0% CO<sub>2</sub>) e hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>)

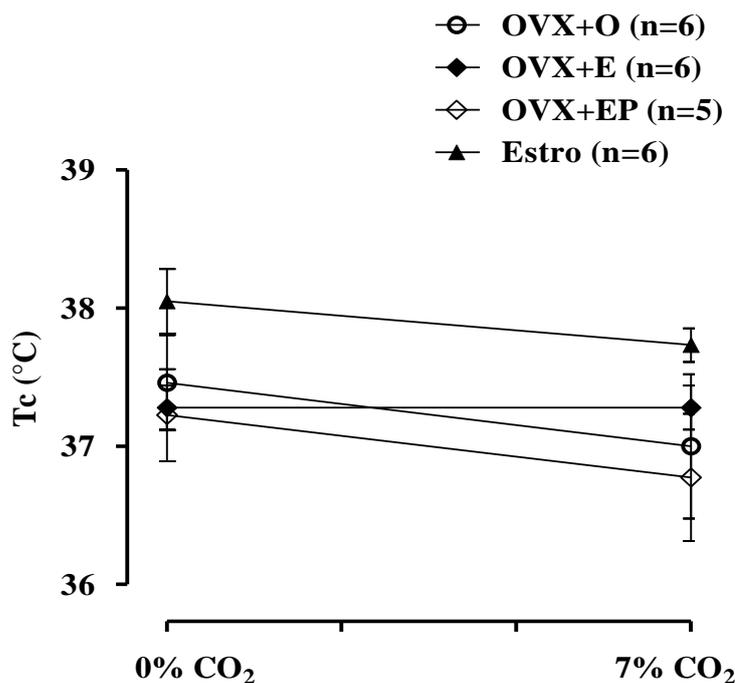
A hipercapnia aumentou o equivalente ventilatório (efeito da hipercapnia  $p < 0,001$ ,  $F_{(3,22)} = 69,45$ ) em todos os grupos (Figura 14). No entanto, em estro o  $V_E/VO_2$  foi significativamente maior do que nos demais grupos (Estro vs OVX+O  $p < 0,01$ , Estro vs OVX+E2  $p < 0,05$ , Estro vs OVX+EP  $p < 0,05$ ). É possível observar que a ovariectomia causou uma diminuição no equivalente respiratório ( $P < 0,006$ ,  $F_{(3,22)} = 0,9$ ; interação entre os grupos  $P < 0,009$  e  $F_{(3,22)} = 5,4$ ; Anexo 2).



**Figura 14:** Equivalente respiratório ( $V_E/VO_2$ ) das ratas em estro, ovariectomizadas que receberam óleo (OVX+O), cipionato de E2 (OVX+E2), ou uma combinação de cipionato de E2 e P4(OVX+EP).  $V_E/VO_2$  em normocapnia (0%  $CO_2$ ) e hipercapnia (7%  $CO_2$ )

### 6.2.3. Temperatura corporal

Não houve diferença significativa na Tc entre os grupos em normocapnia, no entanto é possível observar uma queda de temperatura corporal durante a hipercapnia (efeito do tempo:  $p=0,028$ ,  $F_{(3,22)}=5,81$ ). Em hipercapnia não observamos uma diferença significativa na temperatura corporal entre os grupos (Figura 15, anexo 2).

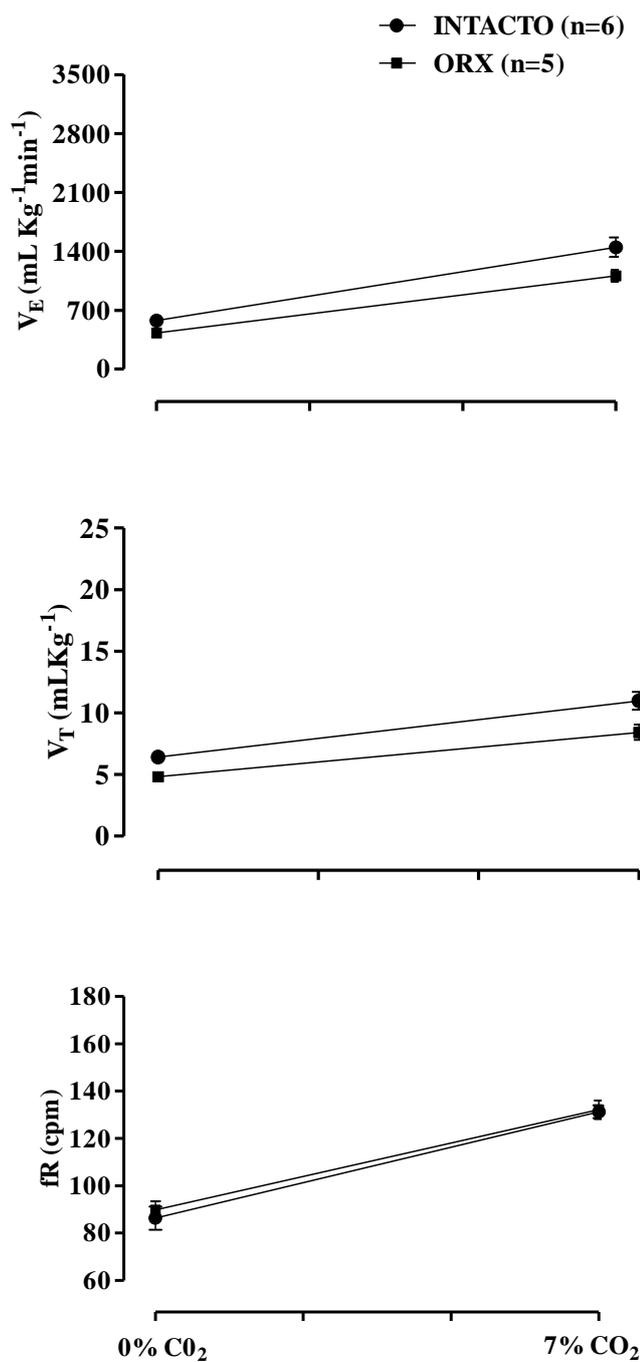


**Figura 15:** Temperatura corporal (Tc) das ratas em estro, ovariectomizadas que receberam óleo (OVX+O), cipionato de E2 (OVX+E2), ou uma combinação de cipionato de E2 e P4(OVX+EP).em normocapnia (0% CO<sub>2</sub>) e hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>)

### 6.3. Efeito da orquidectomia na resposta respiratória e metabólica e na temperatura corporal em normocapnia e hipercapnia de ratos

#### 6.3.1 Ventilação pulmonar

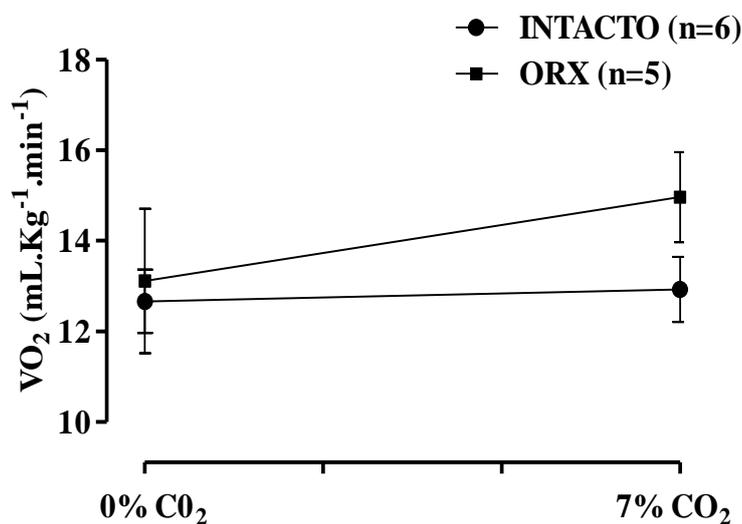
Considerando a normocapnia, tanto em machos intactos quanto ORX não observamos diferença significativa na ventilação. A hipercapnia aumentou a ventilação pulmonar em todos os grupos, somado a isso observamos que a castração causou uma queda significativa na resposta ventilatória a hipercapnia (efeito do tempo:  $p < 0,001$ ,  $F_{(1,10)} = 183,3$ , efeito de castração:  $P < 0,05$ ,  $F_{(1,9)} = 7,47$ ), resultado do  $V_T$  (efeito do tempo:  $P < 0,0001$ ,  $F_{(1,9)} = 95,41$ , efeito da castração:  $P < 0,05$ ,  $F_{(1,9)} = 8,79$ ). A orquidectomia não alterou a fR em hipercapnia (efeito do tempo:  $P < 0,0001$ ,  $F_{(1,9)} = 163,7$ , sem efeito de castração e nenhuma interação) (Figura 16, Anexo 3).



**Figura 16:** Ventilação ( $V_E$ ), volume corrente ( $V_T$ ) e frequência respiratória (fR) de ratos intactos e orquidectomizados durante normocapnia (0% CO<sub>2</sub>) e após 30 minutos de hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>).

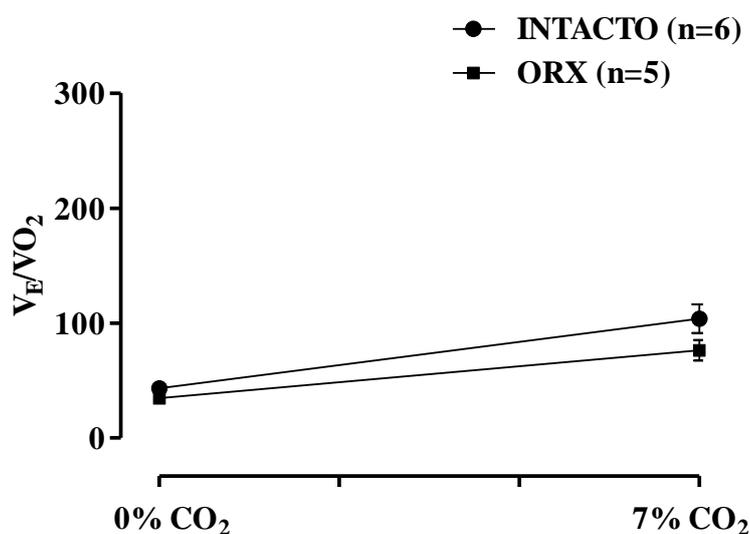
### 6.3.2. $VO_2$ e $V_E/VO_2$

A hipercapnia e a castração não causaram um efeito significativo no consumo de oxigênio (efeito hipercapnia,  $P = 0,2108$ ,  $F_{(1,9)} = 1,85$ , efeito da castração:  $p = 0,33$ ,  $F_{(1,9)} = 1,07$ , não houve interação) (Figura 17, anexo 3).



**Figura 17:** Consumo de  $O_2$  ( $VO_2$ ) de ratos intactos e orquidectomizados durante normocapnia (0%  $CO_2$ ) e após 30 minutos de hipercapnia (7%  $CO_2$ ).

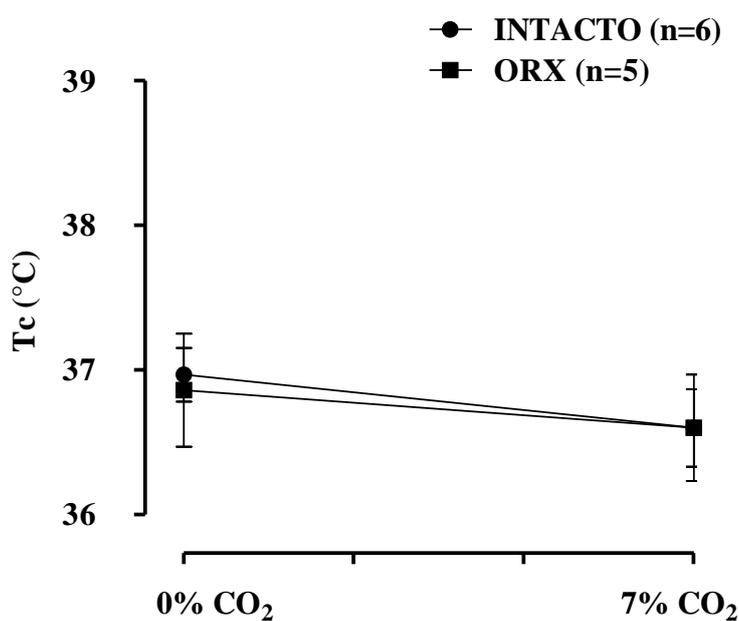
A hipercapnia aumentou o  $V_E/VO_2$ , no entanto não houve diferença significativa entre os grupos intacto e ORX (efeito do tempo:  $P = 0,0001$  e  $F_{(1,9)} = 46,8$ ) (Figura 18).



**Figura 18:** Equivalente respiratório ( $V_E/VO_2$ ) de ratos intactos e orquidectomizados durante normocapnia (0%  $CO_2$ ) e após 30 minutos de hipercapnia (7%  $CO_2$ ).

### 6.3.3. Temperatura corporal

A castração não alterou a Tc durante a normocapnia e hipercapnia. A hipercapnia causou queda da Tc ( $P < 0,003$  e  $F_{(1,9)} = 16,47$  (Figura 19, Anexo 3).



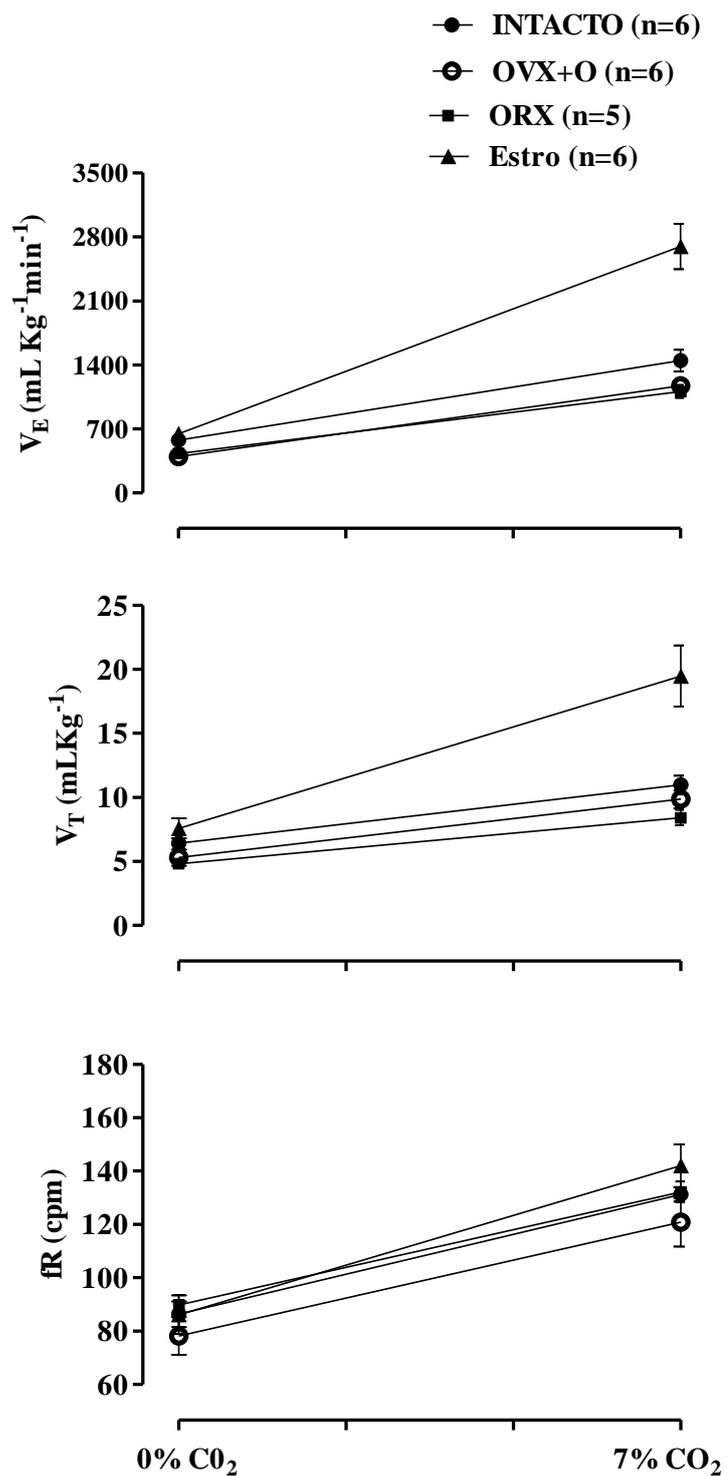
**Figura 19:** Temperatura corporal (Tc) de ratos intactos e orquidectomizados durante normocapnia (0% CO<sub>2</sub>) e após 30 minutos de hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>).

### 6.4. Efeito do dimorfismo sexual nas respostas respiratórias, metabólicas e termorreguladoras em normocapnia e hipercapnia.

Verificamos a influência dos hormônios gonadais, principais agentes na diferenciação sexual entre machos e fêmeas, através da comparação das respostas respiratórias ( $V_E$ ,  $V_T$  e  $fR$ ), metabólicas ( $VO_2$  e  $V_E/VO_2$ ) e termorreguladoras (Tc) frente à normocapnia e hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>) de fêmeas intactas em estro (n=6), ovariectomizadas controle (OVX, n=6), machos intactos (n=6) e orquidectomizados (ORX, n=5). Figura 20, Anexo 3.

### **6.4.1 Ventilação pulmonar**

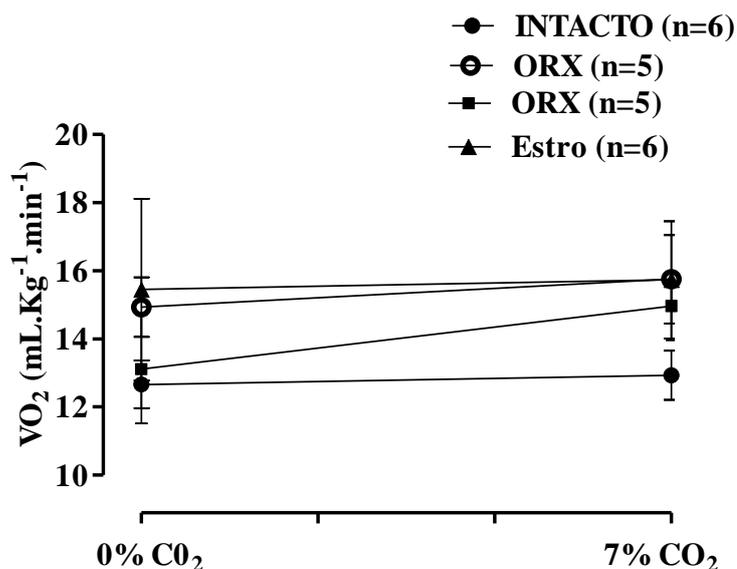
Não observamos diferenças na ventilação em normocapnia, tanto em machos intactos (n=6) quanto ORX (n=5), fêmeas ovariectomizadas com injeção de óleo (OVX+O, n=6) ou fêmeas intactas em estro (n=6). A hipercapnia causou um aumento significativo na ventilação pulmonar em todos os grupos, com a castração a resposta foi diminuída (efeito na hipercapnia:  $p < 0,001$ ,  $F_{(3,19)} = 259,8$ , efeito de castração:  $p < 0,001$ ,  $F_{(3,19)} = 21,55$ , interação:  $p < 0,001$ ,  $F_{(3,19)} = 23,6$ ), resultado da combinação de um aumento de  $V_T$  (efeito da hipercapnia:  $p < 0,001$ ,  $F_{(3,19)} = 121,5$ , efeito da castração:  $p < 0,001$ ,  $F_{(3,19)} = 12,78$ , interação:  $p = 0,003$ ,  $F_{(3,19)} = 10,63$ ) e fR (efeito hipercapnia:  $P < 0,001$ ,  $F_{(3,19)} = 387,1$ , sem efeito de castração e nenhuma interação) (Figura 20). Separadamente comparando os grupos, em hipercapnia, é possível observar que animais castrados tiveram uma resposta ventilatória menor, sendo que não houve diferença entre os grupos OVX+O e ORX, mas ambos foram menores que animais tanto em estro quanto intactos.



**Figura 20:** Ventilação ( $V_E$ ), volume corrente ( $V_T$ ) e frequência respiratória (fR) de ratos intactos, fêmeas ovariectomizadas que receberam óleo (OVX+O), ratos orquidectomizados (ORX) e fêmeas intactas em estro durante normocapnia (0% CO<sub>2</sub>) e após 30 minutos de hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>).

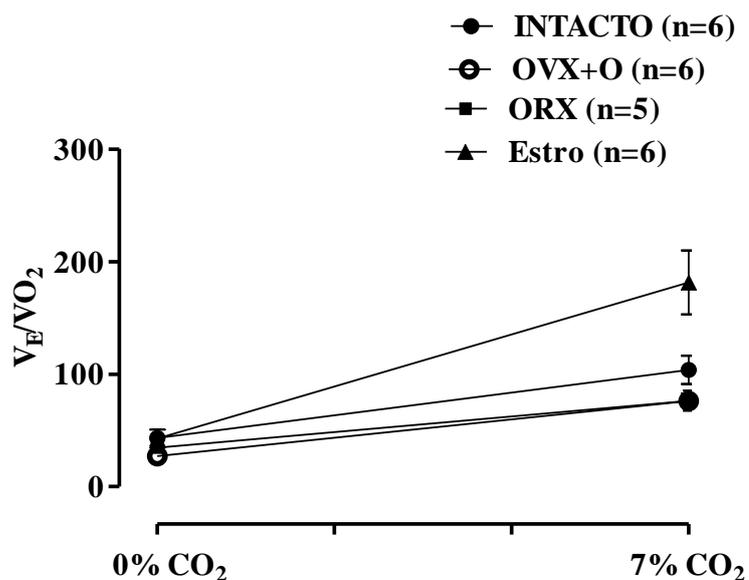
### 6.4.2. $VO_2$ e $V_E/VO_2$

A Hipercapnia e castração não alteraram o consumo de oxigênio entre os grupos (efeito hipercapnia:  $P = 0,71$ ,  $F_{(3,19)} = 0,13$ , efeito da castração:  $P = 0,22$ ,  $F_{(3,19)} = 1,59$ , não houve interação) (Figura 21, Anexo 4).



**Figura 21:** Consumo de oxigênio de ratos intactos, fêmeas ovariectomizadas que receberam óleo (OVX+O), ratos orquidectomizados (ORX) e fêmeas intactas em estro durante normocapnia (0% CO<sub>2</sub>) e após 30 minutos de hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>).

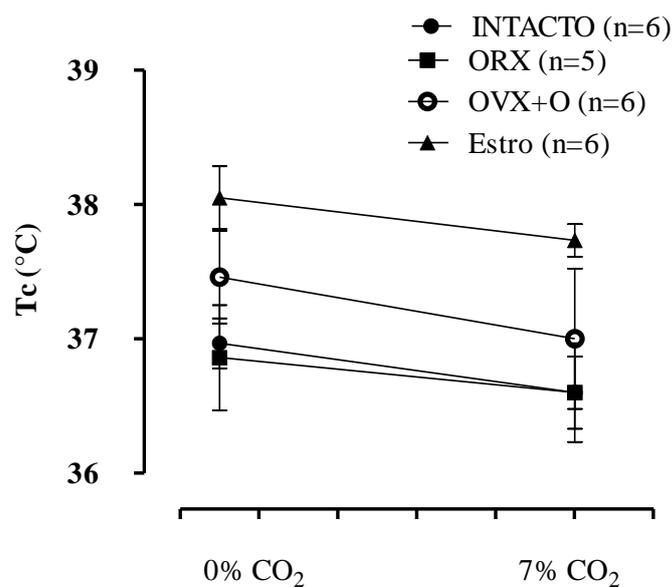
A hipercapnia e a castração causaram um aumento significativo no equivalente respiratório (efeito hipercapnia:  $P < 0,001$ ,  $F_{(3,19)} = 28,55$ , efeito da castração:  $p = 0,009$ ,  $F_{(3,19)} = 3,78$ , sem interação). Em hipercapnia, o grupo intacto apresentou  $V_E/VO_2$  maior que os grupos ORX ( $p < 0,05$ ) e OVX+O ( $p < 0,05$ ), mas menor que o grupo estro ( $p < 0,05$ ). Durante a hipercapnia, a resposta ventilatória foi maior no grupo estro quando comparado a ORX ( $P < 0,05$ ) e OVX + O ( $P < 0,0001$ ). Não houve diferenças entre ORX e OVX+O (Figura 22, Anexo 4).



**Figura 22:** Equivalente respiratório ( $V_E/VO_2$ ) de ratos intactos, fêmeas ovariectomizadas que receberam óleo (OVX+O), ratos orquidectomizados (ORX) e fêmeas intactas em estro durante normocapnia (0% CO<sub>2</sub>) e após 30 minutos de hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>).

#### 6.4.3. Temperatura corporal

A hipercapnia e a castração atuaram diminuindo a temperatura corporal (Figura 23) (Anexo 4), efeito do tempo:  $p=0,0026$  e  $F_{(3,19)}= 12,25$ , efeito da castração  $p=0,0027$  e  $f 12,25$ . Em estro a Tc foi maior quando comparado em normocapnia e hipercapnia com animais intactos ( $p<0,01$ ), não houve diferença entre os demais grupos.



**Figura 23:** Temperatura corporal (Tc) de ratos intactos, fêmeas ovariectomizadas que receberam óleo (OVX+O), ratos orquidectomizados (ORX) e fêmeas intactas em estro durante normocapnia (0% CO<sub>2</sub>) e após 30 minutos de hipercapnia (7% CO<sub>2</sub>).

## 7- DISCUSSÃO

No presente estudo demonstramos que as flutuações hormonais que ocorrem nas diferentes fases do ciclo estral não promovem alteração da  $V_E$ ,  $VO_2$  e  $V_E/VO_2$ . Contudo, como demonstrado em estudos prévios, a Tc foi maior no estro tanto em normocapnia quanto em hipercapnia. Adicionalmente, nosso trabalho demonstrou que a gonadectomia em machos e fêmeas promovem redução na  $V_E$  e  $V_E/VO_2$  durante a hipercapnia, sugerido que os hormônios sexuais gonadais exercem uma modulação excitatória na resposta ao CO<sub>2</sub>. Em relação às diferenças entre machos e fêmeas, os resultados demonstram que fêmeas em estro apresentam maior  $V_E$  e  $V_E/VO_2$  durante a hipercapnia.

### 7.1. Ciclo estral: Ventilação, metabolismo e temperatura corporal

Em mulheres, muitos estudos têm demonstrado que a ventilação é maior durante a fase luteal em relação à fase folicular (Schoene *et al.*, 1981; Slatkovska *et al.*, 2006;.. Hayashi *et*

*al.*, 2012) e que a administração de P4 promove um aumento na de ventilação (Skatrud *et al.*, 1978; Zwillich *et al.*, 1978), o que sugere que esta hiperventilação está relacionada com um aumento da P4.

Existe uma controvérsia na literatura sobre a influência do ciclo menstrual e as respostas respiratórias a CO<sub>2</sub>. Alguns estudos têm demonstrado que as alterações dos hormônios sexuais durante o ciclo menstrual tem pouco ou nenhum efeito sobre a sensibilidade ao CO<sub>2</sub> (Mac Nutt *et al.*, 2012), enquanto outros relataram que a resposta ventilatória a hipercapnia é maior durante a fase luteal P4 do que a fase folicular (Shoene *et al.*, 1981; Dutton *et al.*, 1989). Durante a fase luteal do ciclo ovulatório, em comparação com a fase pré-ovulatória (folicular), as mulheres mostram tipicamente um aumento da ventilação provavelmente devido à ação de P, potenciada por E2, no corpo carotídeo sistema nervoso central. Concomitante com o aumento da V<sub>E</sub> há um provável aumento na quimiossensibilidade que se manifesta com um aumento na capacidade de resposta ventilatória hipocápnica (Schoene *et al.*, 1981).

Estudos de alterações na ventilação em todo o ciclo menstrual demonstraram que a resposta ventilatória à hipóxia são maiores na fase luteal em mulheres durante o exercício e em repouso (Behan e Kinkead, 2011). Adicionalmente, não foram detectadas diferenças na ventilação durante a aclimação à altitude ao longo do ciclo menstrual (Muza *et al.*, 2001). Nossos dados demonstraram que o ciclo estral de ratas não altera a resposta ventilatória ao CO<sub>2</sub> em animais cujo ciclo é regular. Um estudo de Zabka *et al.*, (2001) que demonstrou que a resposta ventilatória a curto prazo à hipóxia em ratas anestesiadas não difere entre as fases do ciclo estral.

No presente estudo, VO<sub>2</sub> não se alterou nem em normocapnia, nem em hipercapnia nas diferentes fases do ciclo estral, sugerindo que as flutuações hormonais que ocorrem durante o ciclo não foram suficientes para alterar a taxa metabólica. Isso também já foi observado em mulheres durante o ciclo menstrual (Takase *et al.*, 2002; Smekal *et al.*, 2007).

Em relação à hipercapnia, Saiki e Mortola (1996) relataram que a exposição ao CO<sub>2</sub> não tem efeitos consideráveis sobre a taxa metabólica em ratos. Como esperado,  $V_E/VO_2$  aumentou durante a hipercapnia, o que indica que os nossos animais estavam hiperventilando.

Nossos resultados mostram uma elevação da temperatura corporal no dia do estro, como relatado em estudos anteriores (Yanase *et al.*, 1989; Kent *et al.*, 1991). A Tc durante o estro foi aproximadamente 0,6°C maior em comparação com outras fases. Em roedores, existe uma elevação da Tc imediatamente antes da ovulação (Refinetti e Menaker, 1991). Em nosso estudo, apesar do fato da Tc ter sido maior durante o estro, o metabolismo dos animais em diferentes fases não se alterou, baseando-se na  $V_e/VO_2$ . Nas mulheres, a Tc pode aumentar até 0,4°C, após a ovulação.

Apesar de uma diminuição da Tc durante hipercapnia muitas vezes ter sido observada em várias espécies, incluindo ratos (Stupfel, 1974; Gautier *et al.*, 1993), no presente estudo, a exposição a 7% de CO<sub>2</sub> não reduziu a Tc, semelhante a estudos anteriores em ratos machos (Saiki e Mortola., 1996; Biancardi *et al.*, 2008 Carvalho *et al.*, 2010).

## **7.2. Gonadectomia e reposição hormonal e ventilação, metabolismo e temperatura corporal**

No presente estudo, não foi encontrada diferença na ventilação durante a normocapnia e hipercapnia em fêmeas castradas tratadas com óleo, com P4 e/ou E2. Estudos de ventilação em ratas ciclando normalmente são realizados com a detecção precisa de estágios do ciclo estral, ou a dosagem plasmática dos hormônios circulantes. Para minimizar a variabilidade natural nas concentrações plasmáticas de hormônios circulantes, muitos estudos têm empregado gonadectomia e reposição hormonal. No entanto, esta abordagem também tem limitações. Por exemplo, a sensibilidade da P4P4 é altamente dependente da exposição prévia ao estrogênio, em parte porque os estrogênios induzem a expressão do receptor de P4 no encéfalo. Assim, é praticamente impossível recriar experimentalmente a periodicidade natural

e as concentrações plasmáticas de E2 e P4 em um rato gonadectomizado,. Os seres humanos podem facilmente manipular níveis de hormônios sexuais (contraceptivos orais e esteróides), mas as suas ações respiratórias não são bem compreendidas (Behan e Kinkead, 2011).

De forma interessante, em nossos resultados as ratas castradas e também com reposição hormonal, apresentaram menor resposta ventilatória à hipercapnia comparada com as fêmeas em estro. . O estro é a fase do ciclo estral em que os hormônios gonadais estão em suas concentrações plasmáticas mais baixas, e mesmo com a reposição hormonal nos animais castrados a resposta ventilatória não foi recuperada. É provável que, mesmo E2 e P4 sendo os principais hormônios gonadais femininos, outros fatores podem atuar na ventilação. Hormônios gonadais incluem esteróides sexuais e andrógenos, e também hormônios peptídicos, como a prolactina, ativina, inibina e folistatina (Findlay, 1993) que podem estar atuando na respiração. Contudo, ainda não existem estudos desses hormônios no controle da ventilação.

Em machos, existem poucos estudos sobre os efeitos da T na ventilação e controle ventilatório (Tatsumi *et al.*, 1995 ). A administração de T em homens hipogonadais leva, em alguns casos, ao aumento da ventilação e da taxa metabólica, sem mudança na  $P_aCO_2$  arterial ou volume corrente ( White *et al.*, 1985). Aumentos semelhantes da ventilação foram observados em gatos castrados (Tatsumi *et al.*, 1994 ). Nós observamos que ratos intactos tiveram uma resposta ventilatória a hipercapnia significativamente maior do que ratos orquidectomizados.

Como o metabolismo dos animais é baseado na taxa de oxidação de seus substratos energéticos, o cálculo do consumo de oxigênio ( $VO_2$ ) nos permite deduzir o aumento ou não da taxa metabólica do organismo (Suen *et al.*, 1998). De acordo com nossos dados, nem a reposição hormonal, nem a castração foram capazes de atuar sob o metabolismo energético nos animais. Assim sendo, concluímos que os hormônios sexuais gonadais participam das respostas ventilatórias à hipercapnia, já que animais intactos, tanto machos quanto fêmeas,

obtiveram uma  $V_E$  e  $V_E/VO_2$  significativamente maiores em hipercapnia, do que animais castrados, demonstrando assim uma hiperventilação diretamente relacionada aos hormônios gonadais.

De acordo com Nussey e Whitehead (2013) o aumento da P4 depois da ovulação causa um pequeno aumento da temperatura corporal, o que corrobora com nossos dados quanto ao aumento da temperatura corporal de fêmeas em estro. No entanto, quando fazemos a ovariectomia e posterior reposição hormonal, não observamos aumento na temperatura corporal, após a injeção de P4, o que indica que nossa reposição não simulou um ciclo estral regular, pelo menos no que se refere à Tc, uma vez que com a reposição não obtivemos um resultado comparado ao de um animal intacto em estro.

### **7.3. Comparação entre macho e fêmea**

Saiki e Mortola (1996) mostraram que a resposta ventilatória e o equivalente respiratório em hipóxia durante o sono foi 23% maior em ratas do que em ratos. Os autores demonstraram também, que não existe um dimorfismo sexual definido em ratos pré-púberes (1-3 semanas após o nascimento; puberdade ocorre em 35-50 dias), comparado a animais ovariectomizados aos 21 dias de idade. Wenninger *et al.* (2009) mostraram que a  $V_E/VO_2$  de ratos machos adultos é maior do que em fêmeas.

Nossos estudos demonstraram que em fêmeas adultas intactas (em estro) a resposta ventilatória e  $V_E/VO_2$  em hipercapnia foi superior do que em machos intactos, e ambos foram maiores do que em animais castrados demonstrando que existe um dimorfismo sexual nas respostas nestas respostas ventilatórias mediados pelos hormônios gonadais.

## **8. CONCLUSÃO**

Apesar das flutuações hormonais que ocorrem durante o ciclo estral isto não afeta as respostas ventilatórias a hipercapnia em ratas, no entanto ratas ovariectomizadas apresentam resposta ventilatória diminuída. Contudo a reposição hormonal com E2 ou P4 não causou diferença significativa na ventilação o que sugere que, apesar de serem os principais hormônios sexuais existe a influencia de mais fatores gonadais nestas respostas. Machos orquidectomizados tiveram uma resposta ventilatória a hipercapnia menor que ratos intactos, sugerindo que os hormônios ou demais fatores gonadais, participam da resposta ventilatória a hipercapnia tanto em machos quanto em fêmeas. Adicionalmente, as fêmeas apresentam uma resposta ventilatória à hipercapnia maior do que machos.

## 9- REFERÊNCIAS

Abbott, Stephen BG. Stornetta, R. L., Fortuna, M. G., Depuy, S. D., West, G. H., Harris, T. E., & Guyenet, P. G.. Photostimulation of retrotrapezoid nucleus phox2b-expressing neurons in vivo produces long-lasting activation of breathing in rats. *The Journal of Neuroscience*, v. 29, n. 18, p. 5806-5819, 2009.

Adrogué, H. J.; Madias, N. E. Management of life-threatening acid–base disorders. *New England Journal of Medicine*, v. 338, n. 1, p. 26-34, 1998.

Aitken, Moira L. et al. Influence of body size and gender on control of ventilation. *J Appl Physiol*, v. 60, n. 6, p. 1894-1899, 1986.

Almeida, M.C., Steiner, A.A. Coimbra NC, Branco, L.G.S., Thermoeffector neuronal pathways in fever: role of the locus coeruleus. *J Physiol* 558: 283-294. 2004

Bangasser, Debra A.; Valentino, Rita J. Sex differences in stress-related psychiatric disorders: Neurobiological perspectives. *Frontiers in neuroendocrinology*, 2014.

Banks, Emily; Canfell, Karen. Invited commentary: hormone therapy risks and benefits the Women's Health Initiative findings and the postmenopausal estrogen timing hypothesis. *American journal of epidemiology*, v. 170, n. 1, p. 24-28, 2009.

Bartlett D. Jr., Tenney, S.M., Control of breathing in experimental anemia. *RespirPhysiol* 10: 384-395. 1970

Bayliss, D. A., Cidlowski, J. A., Millhorn, D. E.,. The stimulation of respiration by progesterone in ovariectomized cat is mediated by an estrogen-dependent hypothalamic mechanism requiring gene expression. *Endocrinology*, 126(1), 519-527. 1990

Bayliss, D. A., Millhorn, D. E., Central neural mechanisms of progesterone action: application to the respiratory system. *Journal of Applied Physiology*, 73(2), 393-404. 1992

Bayliss, D. A., Millhorn, D. E., Gallman, E. A., & Cidlowski, J. A. Progesterone stimulates respiration through a central nervous system steroid receptor-mediated mechanism in cat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(21), 7788-7792. 1987

Behan, M.; Zabka, A. G.; Mitchell, G. S. Age and gender effects on serotonin-dependent plasticity in respiratory motor control. *Respiratory physiology & neurobiology*, v. 131, n. 1, p. 65-77, 2002.

Behan, Mary; Kinkead, Richard. Neuronal control of breathing: sex and stress hormones. *Comprehensive Physiology*, p. 106, 268, 346, 347, 413, 458, 459, 498, 502. 2011.

Behan, Mary; Wenninger, Julie M. Sex steroidal hormones and respiratory control. *Respiratory physiology & neurobiology*, v. 164, n. 1, p. 213-221, 2008.

Behan, Mary; Zabka, A. G., Thomas, C. F., & Mitchell, G. S. Sex steroid hormones and the neural control of breathing. *Respiratory physiology & neurobiology*, v. 136, n. 2, p. 249-263, 2003.

Biancardi, V., Bicego, K.C., Almeida, M.C., Gargaglioni, L.H. Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO<sub>2</sub> drive to breathing. *Pflügers Arch* 455, 1119–1128. 2008

Birzniece, V., Bäckström, T., Johansson, I. M., Lindblad, C., Lundgren, P., Löfgren, M., Zhu, D.. Neuroactive steroid effects on cognitive functions with a focus on the serotonin and GABA systems. *Brain research reviews*, 51(2), 212-239. 2006

Block, A. J., Boysen, P. G., Wynne, J. W., & Hunt, L. A. Sleep apnea, hypopnea and oxygen desaturation in normal subjects: a strong male predominance. *New England Journal of Medicine*, 300(10), 513-517. 1979

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. *Experimental physiology*, v. 85, n. 5, p. 527-537, 2000.

Brooks, E. M. et al. Chronic hormone replacement therapy alters thermoregulatory and vasomotor function in postmenopausal women. *Journal of Applied Physiology*, v. 83, n. 2, p. 477-484, 1997.

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, 1970.

Cagnacci, Angelo, Soldani, R, Carriero, P. L., Paoletti, A. M., Fioretti, P, Melis, G. B Effects of low doses of transdermal 17 beta-estradiol on carbohydrate metabolism in postmenopausal women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 74, n. 6, p. 1396-1400, 1992.

Campbell, Rebecca E.; Herbison, Allan E. Gonadal steroid neuromodulation of developing and mature hypothalamic neuronal networks. *Current opinion in neurobiology*, v. 29, p. 96-102, 2014.

Carlisle, H. J., Wilkinson, C. W., Laudenslager, M. L., & Keith, L. D. Diurnal variation of heat intake in ovariectomized, steroid-treated rats. *Hormones and behavior*, 12(3), 232-242. 1979

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

Celotti, F., Melcangi, R. C., Negri-Cesi, P., Poletti, A.. Testosterone metabolism in brain cells and membranes. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 40(4), 673-678. 1991

Chahrour, Maria; Zoghbi, Huda Y. The story of Rett syndrome: from clinic to neurobiology. *Neuron*, v. 56, n. 3, p. 422-437, 2007.

Charkoudian, Nisha; Johnson, John M. Female reproductive hormones and thermoregulatory control of skin blood flow. *Exercise and sport sciences reviews*, v. 28, n. 3, p. 108-112, 2000.

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

Coomber, Patricia; Crews, David; Gonzalez-Lima, Francisco. 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, 1997.

Corcoran, Andrea E.; Milsom, William 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.

Crews, David et al. Intrahypothalamic implantation of progesterone in castrated male whiptail lizards (*Cnemidophorus inornatus*) elicits courtship and copulatory behavior and affects androgen receptor-and progesterone receptor-mRNA expression in the brain. *The Journal of neuroscience*, v. 16, n. 22, p. 7347-7352, 1996.

Dacks, Penny A.; Rance, Naomi E. Effects of E2 on the thermoneutral zone and core temperature in ovariectomized rats. *Endocrinology*, v. 151, n. 3, p. 1187-1193, 2010.

Das, T. K..Jana, H. Basal oxygen consumption during different phases of menstrual cycle. *The Indianjournalof medical research* 94: 16.1991

de Carvalho, D., Bicego, K.C., de Castro, O.W., da Silva, G.S., Garcia-Cairasco, N., Gargaglioni, L.H. Role of neurokinin-1 expressing neurons in the locus coeruleus on ventilatory and cardiovascular responses to hypercapnia. *RespirPhysiolNeurobiol* 172, 24–31. 2010

De Souza Moreno, V., Bicego, K. C., Szawka, R. E., Anselmo-Franci, J. A., & Gargaglioni, L. H.. Serotonergic mechanisms on breathing modulation in the rat locus coeruleus. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, v. 459, n. 3, p. 357-368, 2010.

Dean, J. B., Lawing, W. L., & Millhorn, D. E. CO<sub>2</sub> decreases membrane conductance and depolarizes neurons in the nucleus tractus solitarii. *Experimental brain research*, 76(3), 656-661. 1989

Dejours P. *Principle of Comparative Respiratory Physiology*, 2nd edn. Elsevier/North-Holland, New York. 1981

Dempsey, Jerome A.; Olson, E. Burt; Skatrud, James B. Hormones and neurochemicals in the regulation of breathing. *Comprehensive Physiology*, 1986.

Dempsey, Jerome A.; Olson, E. Burt; Skatrud, James B. Hormones and neurochemicals in the regulation of breathing. *Comprehensive Physiology*, 1986.

Deng, B. S., Nakamura, A., Zhang, W., Yanagisawa, M., Fukuda, Y., & Kuwaki, T. Contribution of orexin in hypercapnic chemoreflex: evidence from genetic and pharmacological disruption and supplementation studies in mice. *Journal of Applied Physiology*, 103(5), 1772-1779. 2007.

Dias, M..B., Nucci, T.B., Margatho, L.O., Antunes-Rodrigues, J., Gargaglioni, L.H., Branco, L.G. Raphe magnus nucleus is involved in ventilatory but not hypothermic response to CO<sub>2</sub>. *J ApplPhysiol* 103, 1780–1788. 2007

Dutton, K., Blanksby, B. A., & Morton, A. R., CO<sub>2</sub> sensitivity changes during the menstrual cycle. *Journal of Applied Physiology*, 67(2), 517-522. 1989

Findlay, Jock K. An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biology of reproduction*, v. 48, n. 1, p. 15-23, 1993.

Fogel, R. B., Malhotra, A., Pillar, G., Pittman, S. D., Dunaif, A., & White, D. P. Increased Prevalence of Obstructive Sleep Apnea Syndrome in Obese Women with Polycystic Ovary Syndrome 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(3), 1175-1180. 2001

Freeman, M. E. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. *The physiology of reproduction*, v. 2, p. 613-658, 1994.

Fregly, M. J., Field, F. P., Katovich, M. J., & Barney, C. C. Catecholamine-thyroid hormone interaction in cold-acclimated rats. In *Federation proceedings* Vol. 38, No. 8, p. 2162. 1979

Gautier, H., Bonora, M., Trinh, H. C. Ventilatory and metabolic responses to cold and CO<sub>2</sub> in intact and carotid body-denervated awake rats. *Journal of Applied Physiology*, 75(6), 2570-2579. 1993

Goldman, Jerome M., Ashley S. Murr, and Ralph L. Cooper. The rodent estrus cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology* 84-97. 2007

González-Arenas, A., Neri-Gómez, T., Guerra-Araiza, C., & Camacho-Arroyo, I. Sexual dimorphism in the content of progesterone and estrogen receptors, and their cofactors in the lung of adult rats. *Steroids*, 69(5), 351-356. 2004.

Gruber C.J., Tschugguel W., Schneeberger C., Huber J.C.,. Production and actions of estrogens. *N. Engl. J. Med.*, v. 346, p. 340–352. 2002

Guyenet, Patrice G. The 2008 Carl Ludwig Lecture: retrotrapezoid nucleus, CO<sub>2</sub> homeostasis, and breathing automaticity. *Journal of Applied Physiology*, v. 105, n. 2, p. 404-416, 2008.

Hayashi, K., Kawashima, T., Suzuki, Y. Effect of menstrual cycle phase on the ventilatory response to rising body temperature during exercise. *Journal of Applied Physiology*, 113(2), 237-245. 2012

Hempleman, Steven C.; Pilarski, Jason Q. Prenatal development of respiratory chemoreceptors in endothermic vertebrates. *Respiratory physiology & neurobiology*, v. 178, n. 1, p. 156-162, 2011.

Hodges, Matthew R.; BEST, Simon; RICHERSON, George 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, 2011.

Hojo, Yasushi et al. Estrogen synthesis in the brain—role in synaptic plasticity and memory. *Molecular and cellular endocrinology*, v. 290, n. 1, p. 31-43, 2008.

Hosono, Takayoshi et al. Effects of estrogen on thermoregulatory tail vasomotion and heat-escape behavior in freely moving female rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 280, n. 5, p. R1341-R1347, 2001.

Hotchkiss, J.; Knobil, E. The menstrual cycle and its neuroendocrine control. *The physiology of reproduction*, v. 2, p. 711-749, 1994.

J.A. Dempsey, A.I. Pack (Eds.), *Lung Biology in Health and Disease. Regulation of Breathing*, Marcel Dekker, New York, pp. 829–864. 1995

Johnson, S. M., Haxhiu, M. A., & Richerson, G. B. GFP-expressing locus ceruleus neurons from Prp57 transgenic mice exhibit CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> responses in primary cell culture. *Journal of Applied Physiology*, 105(4), 1301-1311. 2008

Kapsimalis, Fotis; Kryger, Meir H. Gender and obstructive sleep apnea syndrome, part 1: Clinical features. *Sleep*, v. 25, n. 4, p. 412-419, 2002.

Katovich, Michael J.; O'meara, Effect of chronic estrogen on the skin temperature response to naloxone in morphine-dependent rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, v. 65, n. 4, p. 563-567, 1987.

Kawai, Akira; Onimaru, Hiroshi; Homma, Ikuo. Mechanisms of CO<sub>2</sub>/H<sup>+</sup> chemoreception by respiratory rhythm generator neurons in the medulla from newborn rats in vitro. *The Journal of physiology*, v. 572, n. 2, p. 525-537, 2006.

Kent, Stephen; Hurd, Mark; Satinoff, Evelyn. Interactions between body temperature and wheel running over the estrous cycle in rats. *Physiology & behavior*, v. 49, n. 6, p. 1079-1084, 1991.

Laudenslager, M. L., Wilkinson, C. W., Carlisle, H. J., & Hammel, H. T. Energy balance in ovariectomized rats with and without estrogen replacement. *Am J Physiol*, 238(5), R400-5. 1980

León-Velarde F, Ramos MA, Hernández JA, De Idiaquez D, Muñoz LS, Gaffo A, Córdova S, Durand D, Monge C C. The role of menopause in the development of chronic mountain sickness. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 272:R90–R94. 1997

Loeschke H. H. Central chemosensitivity and the reaction theory. *J Physiol* 332: 1–24. 1982

MacNutt, M.J., De Souza, S.E. Tomczak, J.L., Homer, A.W. Sheel Resting and exercise ventilatory chemosensitivity across the menstrual cycle *Journal of Applied Physiology*, 112pp. 737–747. 2012

Marrone, Babetta L.; Thomas Gentry, R.; Wade, George N. Gonadal hormones and body temperature in rats: effects of estrous cycles, castration and steroid replacement. *Physiology & behavior*, v. 17, n. 3, p. 419-425, 1976.

Marrone, Babetta L.; Thomas Gentry, R.; Wade, George N. Gonadal hormones and body temperature in rats: effects of estrous cycles, castration and steroid replacement. *Physiology & behavior*, v. 17, n. 3, p. 419-425, 1976.

Mcewen, Bruce S. Invited review: estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. *Journal of Applied Physiology*, v. 91, n. 6, p. 2785-2801, 2001.

Mclean, Jack H.; Coleman, William P. Temperature variation during the estrous cycle: active vs restricted rats. *Psychonomic Science*, v. 22, n. 3, p. 179-180, 1971.

Melcangi, Roberto C.; Mensah-Nyagan, Ayikoe G. Neuroprotective effects of neuroactive steroids in the spinal cord and peripheral nerves. *Journal of molecular neuroscience*, v. 28, n. 1, p. 1-2, 2006.

Melcangi, Roberto C.; Panzica, G.; Garcia-Segura, Luis M. Neuroactive steroids: focus on human brain. *Neuroscience*, v. 191, p. 1-5, 2011.

Mitchell, R. A. et al. Respiratory responses mediated through superficial chemosensitive areas on the medulla. *J Appl Physiol*, v. 18, n. 3, p. 523-533, 1963.

Moon, Rachel Y.; Horne, Rosemary Sc; Hauck, Fern R. Sudden infant death syndrome. *The Lancet*, v. 370, n. 9598, p. 1578-1587, 2007.

Moore, L. G., (1989). Combined effects of female hormones and metabolic rate on ventilatory drives in women. *Journal of Applied Physiology*, 66(2), 808-813.

Moreira, Thiago S. et al. Inhibitory input from slowly adapting lung stretch receptors to retrotrapezoid nucleus chemoreceptors. *The Journal of physiology*, v. 580, n. 1, p. 285-300, 2007.

Mortola, Jacopo P.; Saiki, Chikako. Ventilatory response to hypoxia in rats: gender differences. *Respiration physiology*, v. 106, n. 1, p. 21-34, 1996.

Mulkey, Daniel K. et al. Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. *Nature neuroscience*, v. 7, n. 12, p. 1360-1369, 2004.

Muza, S. R., Rock, P. B., Fulco, C. S., Zamudio, S., Braun, B., Cymerman, A, Moore, L. G. Women at altitude: ventilatory acclimatization at 4,300 m. *Journal of Applied Physiology*, 91(4), 1791-1799. 2001

Nattie E. E, Li A Respiration and autonomic regulation and orexin. *Prog Brain Res* 198: 25-46. 2012

Nattie E. E. Central chemosensitivity, sleep, and wakefulness. *Respir Physiol* 129: 257-268. 2001

Nattie, E. E., Li, A., Review Central chemoreception is a complex system function that involves multiple brain stem sites. *J ApplPhysiol* 106(4):1464-6. 1985.

Nattie, Eugene; Li, Aihua. Central chemoreception is a complex system function that involves multiple brain stem sites. *Journal of applied physiology*, v. 106, n. 4, p. 1464-1466, 2009.

Ngun, T. C., Ghahramani, N., Sánchez, F. J., Bocklandt, S., & Vilain, E..The genetics of sex differences in brain and behavior. *Frontiers in neuroendocrinology*, 32(2), 227-246. 2011

Niblock, Mary Melissa et al. Fos-Tau-LacZ mice reveal sex differences in brainstem c-fos activation in response to mild carbon dioxide exposure. *Brain research*, v. 1311, p. 51-63, 2010.

Nieburgs, H. W.; Kupperman, H. S.; Greenblatt, R. B. Studies on temperature variations in animals as influenced by the estrus cycle and the steroid hormones. *The Anatomical record*, v. 96, n. 4, p. 529-529, 1946.

Noebels, Jeffrey *et al.* (Ed.). *Jasper's basic mechanisms of the epilepsies*. Oxford University Press, 2012.

Nucci, T.B., Dias, M.B., Branco, L.G., Gargaglioni, L.H.. Ionotropic glutamatergic receptors in the rostral medullary raphe modulate hypoxia and hypercapnia-induced hyperpnea. *RespirPhysiolNeurobiol* 175, 104–111. 2011

Nussey, Stephen S.; Whitehead, Saffron A. *Endocrinology: an integrated approach*. CRC Press, 2013.

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

Patrick, J. M.; Howard, A. The influence of age, sex, body size and lung size on the control and pattern of breathing during CO<sub>2</sub> inhalation in Caucasians. *Respiration physiology*, v. 16, n. 3, p. 337-350, 1972.

Presto, Bruno. *Fisioterapia respiratória*. Elsevier Brasil, 2011.

Preston, R. A. Comparative effects of conventional vs. novel hormone replacement therapy on blood pressure in postmenopausal women. *Climacteric*, v. 12, n. s1, p. 66-70, 2009.

Rebuck, A. S. et al. Correlation of ventilatory responses to hypoxia and hypercapnia. *Journal of applied physiology*, v. 35, n. 2, p. 173-177, 1973.

Refinetti, R., Menaker, Michael., The circadian rhythm of body temperature. *Physiology & Behavior* 51.3: 613-637. 1991

Refinetti, Roberto; Menaker, Michael. The circadian rhythm of body temperature. *Physiology & behavior*, v. 51, n. 3, p. 613-637, 1992.

Regensteiner, J. G., Woodard, W. D., Hagerman, D. D., Weil, J. V., Pickett, C. K., Bender, P. R., Schläfke, Marianne E.; Koepchen, Hans Peter; SEE, Wolf R. (Ed.). Central neurone environment and the control systems of breathing and circulation. Springer, 1983.

Saaresranta, Tarja; Polo, Olli. Hormones and breathing. *CHEST Journal*, v. 122, n. 6, p. 2165-2182, 2002.

Saiki C, Mortola JP. Effect of CO<sub>2</sub> on the metabolic and ventilatory responses to ambient temperature in conscious adult and newborn rats. *J. Physiol.*, v. 491, p. 261-269, 1996.

Sanchez-Alavez, Manuel; ALBONI, Silvia; CONTI, Bruno. Sex-and age-specific differences in core body temperature of C57Bl/6 mice. *Age*, v. 33, n. 1, p. 89-99, 2011.

Saunders, Norman R. Ontogeny of the blood-brain barrier. *Experimental eye research*, v. 25, p. 523-550, 1977.

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.

Schoene, N.W., Schoene, A., Farretti, D., Fiore. Production of prostaglandins in homogenates of kidney medullae and cortices of spontaneously hypertensive rats fed menhaden oil *Lipids*, 16, pp. 866–869. 1981

Schoene, R. B., Robertson, H. T., Pierson, D. J., & Peterson, A. P., Respiratory drives and exercise in menstrual cycles of athletic and nonathletic women. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology*, 50(6), 1300. 1981

Schoene, R. B., Robertson, H. T., Pierson, D. J., & Peterson, A. P. Respiratory drives and exercise in menstrual cycles of athletic and nonathletic women. *J Appl Physiol*, 50(6), 1300-5. 1981

Schumacher, M., Weill-Engerer, S., Liere, P., Robert, F., Franklin, R. J. M., Garcia-Segura, L. M., Akwa, Y. Steroid hormones and neurosteroids in normal and pathological aging of the nervous system. *Progress in neurobiology*, 71(1), 3-29. 2003

Shughrue, P. J., Scrimo, P. J., & Merchenthaler, I. Estrogen binding and estrogen receptor characterization (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) in the cholinergic neurons of the rat basal forebrain. *Neuroscience*, 96(1), 41-49. 2000

Silva, N. L.; Boulant, J. A. Effects of testosterone, estradiol, and temperature on neurons in preoptic tissue slices. *Am J Physiol*, v. 250, n. 4 Pt 2, p. R625-R632, 1986.

Simerly, R. B., Swanson, L. W., Chang, C., & Muramatsu, M.. 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.

Singletary, S. J., Kirsch, A. J., Watson, J., Karim, B. O., Huso, D. L., Hurn, P. D., & Murphy, S. J., 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*, 44(6), 37. 2005.

Skatrud, J. B., Dempsey, J. A., & Kaiser, D. G. Ventilatory response to medroxyprogesterone acetate in normal subjects: time course and mechanism. *Journal of Applied Physiology*, 44(6), 393-344.1978

Skatrud, J. B.; Dempsey, J. A.; Kaiser, D. G. Ventilatory response to medroxyprogesterone acetate in normal subjects: time course and mechanism. *Journal of Applied Physiology*, v. 44, n. 6, p. 393-344, 1978.

Slatkovska, L. D., Jensen, G.A.L., Davies, L.A. Wolfe Phasic menstrual cycle effects on the control of breathing in healthy women *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 154, pp. 379–388. 2006

Slatkovska, L., Jensen, D., Davies, G. A., & Wolfe, L. A. Phasic menstrual cycle effects on the control of breathing in healthy women. *Respiratory physiology & neurobiology*, 154(3), 379-388. 2006.

Smekal, G., Von Duvillard, S. P., Frigo, P., Tegelhofer, T., Pokan,, Hofmann, P., Bachl, N. Menstrual cycle: no effect on exercise cardiorespiratory variables or blood lactate concentration. *Medicine and science in sports and exercise*, 39(7), 1098-1106. 2007

Stupfel M, Moutet JP, Magnier M, Romary F. Can the difference in resistance to acute hypoxia between male and female mice be modified by injections of sex hormones to newborn animals? *C R AcadSciHebdSeancesAcadSci D.* 11;278(11):1499-501. 1974

Suen, V.M., SilvaG.A., MarchiniJ.S. Determinação do metabolismo energético no homem. *Medicina*, 31. pp. 13–21. 1998.

Swaab, D. F., Chung, W. C., Kruijver, F. P., Hofman, M. A., & Ishunina, T. A. Structural and functional sex differences in the human hypothalamus. *Hormones and behavior*, 40(2), 93-98. 2001

Szawka, R. E. Rodovalho, G. V., Monteiro, P. M., Carrer, H. F., & Anselmo-Franci, J. A.. Ovarian-Steroid Modulation of Locus Coeruleus Activity in Female Rats: Involvement in Luteinising Hormone Regulation. *Journal of neuroendocrinology*, v. 21, n. 7, p. 629-639, 2009. after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science*, v. 257, n. 5066, p. 88-91, 1992.

Szawka, R. E., Helena, C. V. V., Rodovalho, G. V., Monteiro, P. M., Franci, C. R., & Anselmo-Franci, J. A. Locus coeruleus norepinephrine regulates the surge of prolactin during oestrus. *Journal of neuroendocrinology*, 17(10), 639-648. 2005.

Takakura, Ana Carolina Thomaz et al. Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO<sub>2</sub>-sensitive neurons in rats. *The Journal of physiology*, v. 572, n. 2, p. 503-523, 2006.

Takase, Kazuko; Nishiyasu, Takeshi; Asano, Katsumi. Modulating effects of the menstrual cycle on cardiorespiratory responses to exercise under acute hypobaric hypoxia. *The Japanese journal of physiology*, v. 52, n. 6, p. 553-560, 2002.

Tankersley, C. G., Nicholas, W. C., Deaver, D. R., Mikita, D., & Kenney, W. L. Estrogen replacement in middle-aged women: thermoregulatory responses to exercise in the heat. *Journal of Applied Physiology*, 73, 1238-1238. 1992

Tatsumi, K., Hannhart, B., Pickett, C. K., Weil, J. V., & Moore, L. G. Effects of testosterone on hypoxic ventilatory and carotid body neural responsiveness. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 149(5), 1248-1253. 1994

Tatsumi, K.; Hannhart, B.; Moore, L. G. Influences of sex steroids on ventilation and ventilatory control. *Lung biology in health and disease*, v. 79, p. 829-864, 1995.

Tsai, Ching Lin; Kanosue, Kazuyuki; Matsumura, Kiyoshi. Effects of estradiol treatment on responses of rat preoptic warm sensitive neurons to progesterone in vitro. *Neuroscience letters*, v. 136, n. 1, p. 23-26, 1992.

Tsai, Ching Lin; Matsumura, Kiyoshi; Nakayama, Teruo. Effects of progesterone on thermosensitive neurons in preoptic slice preparations. *Neuroscience letters*, v. 86, n. 1, p. 56-60, 1988.

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

Vincent Joseph, Mary Behan, and Richard Kinkead Sex, hormones, and stress: How they impact development and function of the carotid bodies and related reflexes.. 2013

Vincent Joseph, Mary Behan, and Richard Kinkead. Sex, hormones, and stress: How they impact development and function of the carotid bodies and related reflexes. 2013.

Wenninger, Julie M. Olson Jr, E. B., Cotter, C. J., Thomas, C. F., & Behan, M. Hypoxic and hypercapnic ventilatory responses in aging male vs. aging female rats. *Journal of Applied Physiology*, v. 106, n. 5, p. 1495-1528, 2009.

White, D. P., Douglas, N. J., Pickett, C. K., Zwillich, C. W., & Weil, J. V. Sleep deprivation and the control of ventilation. *The American review of respiratory disease*, 128(6), 984-986. 1983

Xue B, Hay M . 17 $\beta$ -Estradiolinhibits excitatory amino acid-induced activity of neurons of the nucleus tractus solitaries. *Brain Research* 976: 41–52. 2003

Yanase S., Goto, N., Yamamoto, K., Dual solutions of the flow through a curved tube fluid *Dyn. Res.*, 5, pp. 191–201. 1989

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

Zabka, A. G.; Behan, M. G. S. 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*, v. 91, n. 6, p. 2831-2838, 2001.

Zwillich, C. W., Natalino, M. R., Sutton, F. D., & Weil, J. V. Effects of progesterone on chemosensitivity in normal men. *J Lab Clin Med*, 92(2), 262-9. 1978

**ANEXO 1:**

Tabela comparativa entre grupos, com valores significativos para  $p < 0.005$ , em normocapnia e hipercapnia, entre fêmeas em diferentes fases do ciclo estral, considerando  $V_E$ , fR,  $V_T$ , Tc,  $VO_2$  e  $V_E/VO_2$ .

		Normocapnia		Hipercapnia				Normocapnia		Hipercapnia	
Estro vs Proestro	$V_E$	ns	ns			$V_E$	ns	ns			
	$V_T$	ns	ns			$V_T$	ns	ns			
	fR	ns	ns			fR	ns	ns			
	$VO_2$	ns	ns			$VO_2$	ns	ns			
	$V_E/VO_2$	ns	ns			$V_E/VO_2$	ns	ns			
	Tc	<b>p&lt;0,001</b>	<b>p&lt;0,001</b>			Tc	<b>p&lt;0,01</b>	<b>p&lt;0,01</b>			
Estro vs Metaestro	$V_E$	ns	ns			$V_E$	ns	ns			
	$V_T$	ns	ns			$V_T$	ns	ns			
	fR	ns	ns			fR	ns	ns			
	$VO_2$	ns	ns			$VO_2$	ns	ns			
	$V_E/VO_2$	ns	ns			$V_E/VO_2$	ns	ns			
	Tc	<b>p&lt;0,01</b>	<b>p&lt;0,05</b>			Tc	ns	ns			
Diestro vs Metaestro	$V_E$	ns	ns			$V_E$	ns	ns			
	$V_T$	ns	ns			$V_T$	ns	ns			
	fR	ns	ns			fR	ns	ns			
	$VO_2$	ns	ns			$VO_2$	ns	ns			
	$V_E/VO_2$	ns	ns			$V_E/VO_2$	ns	ns			
	Tc	ns	ns			Tc	ns	ns			

## ANEXO 2

Tabela comparativa entre grupos, com valores significativos para  $p < 0.005$  em normocapnia e hipercapnia, entre fêmeas ovariectomizadas que receberam injeções de óleo (OVX+O, n=6), reposição hormonal de Cipionato de E2 (OVX+E2, n=6), ou uma combinação de Cipionato de E2 e P4 (OVX+EP, n=5) e fêmeas intactas em estro (n=6), considerando  $V_E$ , fR,  $V_T$ , Tc,  $VO_2$  e  $V_E/VO_2$ .

	Normocapnia		Hipercapnia			Normocapnia		Hipercapnia	
	$V_E$	ns		ns		$V_E$	ns		ns
OVX+O vs OVX+E	$V_T$	ns		ns	OVX+O vs OVX+EP	$V_T$	ns		ns
	fR	ns		ns		fR	ns		ns
	$VO_2$	ns		ns		$VO_2$	ns		ns
	$V_E/VO_2$	ns		ns		$V_E/VO_2$	ns		ns
	Tc	ns		ns		Tc	ns		ns
OVX+O vs Estro	$V_E$	ns		<b>P&lt;0.001</b>	OVX+E vs OVX+EP	$V_E$	ns		ns
	$V_T$	ns		<b>P&lt;0.001</b>		$V_T$	ns		ns
	fR	ns		<b>P&lt;0.05</b>		fR	ns		ns
	$VO_2$	ns		ns		$VO_2$	ns		ns
	$V_E/VO_2$	ns		<b>P&lt;0.01</b>		$V_E/VO_2$	ns		ns
Tc	ns		ns	Tc	ns		ns		
OVX+E vs Estro	$V_E$	ns		<b>P&lt;0.001</b>	OVX+EP vs Estro	$V_E$	ns		<b>P&lt;0.01</b>
	$V_T$	ns		<b>P&lt;0.001</b>		$V_T$	ns		<b>P&lt;0.01</b>
	fR	ns		<b>P&lt;0.001</b>		fR	ns		<b>P&lt;0.05</b>
	$VO_2$	ns		ns		$VO_2$	<b>P&lt;0.05</b>		ns
	$V_E/VO_2$	ns		<b>P&lt;0.05</b>		$V_E/VO_2$	ns		<b>P&lt;0.05</b>
Tc	ns		ns	Tc	ns		ns		

**ANEXO 3**

Tabela comparativa entre grupos, com valores significativos para  $p < 0.005$  em normocapnia e hipercapnia, entre machos intactos ( $n=6$ ) e orquidectomizados ( $n=5$ ), considerando  $V_E, fR, V_T, Tc, VO_2$  e  $V_E/VO_2$ .

		Normocapnia	Hipercapnia
<b>Intacto vs ORX</b>	$V_E$	ns	<b>P&lt;0.001</b>
	$V_T$	ns	<b>P&lt;0.05</b>
	fR	ns	ns
	$VO_2$	ns	ns
	$V_E/VO_2$	ns	<b>P&lt;0.05</b>
	Tc	ns	<b>ns</b>

## ANEXO 4

Tabela comparativa entre grupos com valores significativos de  $p < 0.005$  em normocapnia e hipercapnia, entre fêmeas ovariectomizadas que receberam óleo (OVX+O, n=6) e fêmeas intactas em Estro (n=6) e entre machos intactos (n=6) e orquidectomizados (n=5), considerando  $V_E$ , fR,  $V_T$ , Tc,  $VO_2$  e  $V_E/VO_2$ .

		Normocapnia		Hipercapnia				Normocapnia		Hipercapnia	
Intacto vs ORX	$V_E$	ns		<b>P&lt;0.001</b>		Intacto vs OVX+O	$V_E$	ns		<b>P&lt;0.05</b>	
	$V_T$	ns		<b>P&lt;0.05</b>			$V_T$	ns		ns	
	fR	ns		ns			fR	ns		ns	
	$VO_2$	ns		ns			$VO_2$	ns		ns	
	$V_E/VO_2$	ns		<b>P&lt;0.05</b>			$V_E/VO_2$	ns		<b>P&lt;0.05</b>	
	Tc	ns		ns			Tc	ns		ns	
Intacto vs Estro	$V_E$	ns		<b>P&lt;0.001</b>		ORX vs OVX+O	$V_E$	ns		ns	
	$V_T$	ns		<b>P&lt;0.001</b>			$V_T$	ns		ns	
	fR	ns		ns			fR	ns		ns	
	$VO_2$	ns		ns			$VO_2$	ns		ns	
	$V_E/VO_2$	ns		<b>P&lt;0.05</b>			$V_E/VO_2$	ns		ns	
	Tc	<b>p&lt;0,001</b>		<b>p&lt;0,001</b>			Tc	ns		ns	
ORX vs Estro	$V_E$	ns		<b>P&lt;0.001</b>		OVX+O vs Estro	$V_E$	ns		<b>P&lt;0.001</b>	
	$V_T$	ns		<b>P&lt;0.001</b>			$V_T$	ns		<b>P&lt;0.001</b>	
	fR	ns		ns			fR	ns		<b>P&lt;0.001</b>	
	$VO_2$	ns		ns			$VO_2$	ns		ns	
	$V_E/VO_2$	ns		<b>P&lt;0.05</b>			$V_E/VO_2$	ns		<b>P&lt;0.001</b>	
	Tc	<b>p&lt;0,001</b>		<b>p&lt;0,001</b>			Tc	ns		<b>p&lt;0,001</b>	