

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA MICRÓGLIA DO LOCUS COERULEUS NA
RESPOSTA VENTILATÓRIA E COMPORTAMENTAL AO CO₂ DE RATAS
Wistar EM PERIESTROPAUSA**

Discente: Angela Cristina de Nicola

Relatório de Pós-doutorado realizado na
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” (UNESP), Unidade de
Jaboticabal

Supervisor(a): Prof^a Dr^a Luciane Helena
Gargaglioni Batalhão

PROGRAMA DE PÓS-DOCTORADO DA UNESP

Jaboticabal

2024

RESUMO

O envelhecimento do organismo feminino tem despertado interesse da comunidade científica em razão das inúmeras doenças associadas à senescência deste grupo majoritário entre o crescente grupo dos idosos. A perimenopausa caracteriza-se como um estado de transição da meia-idade que leva à senescência reprodutiva em mulheres, e onde há maior vulnerabilidade ao estresse e à ansiedade, como resultado do declínio nos níveis circulantes de esteroides ovarianos, principalmente o estrogênio. Dentre os distúrbios de ansiedade, tem-se o transtorno do pânico (TP), que também pode aumentar nesta fase da vida e caracteriza-se por maior sensibilidade ao CO₂. Os neurônios noradrenérgicos do locus coeruleus (LC) são quimiossensíveis ao CO₂/pH e participam da resposta ventilatória ao CO₂. O estímulo hipercápnico deste núcleo pode desencadear ataques de pânico em humanos e camundongos; ratos, no entanto, apresentam maior sensibilidade ao O₂ como agente panicogênico.

Estudos demonstram possível conexão entre as células microgliais e ataques de pânico, uma vez que as respostas pró-inflamatórias da micróglia contribuem para a detecção de um desequilíbrio homeostático, como a inalação de CO₂. Contudo, o envolvimento da micróglia do LC durante a perimenopausa em resposta à hipóxia ainda é desconhecido. Este projeto investigou a resposta ventilatória ao CO₂ e ao O₂ durante a periropausa, e se micróglia do LC é ativada em resposta panicogênica provocada pela exposição à 7% O₂.

Os resultados deste estudo mostraram que os parâmetros respiratórios de volume corrente (V_T) e ventilação (V_E) durante hipercapnia na periropausa, assim como na fêmea com ciclo estral regular em diestro, aumentam em relação à normocapnia. No entanto, neste período, estes animais diminuem a frequência respiratória (fR) em exposição ao CO₂, contrariamente ao que ocorre com os animais jovens. O metabolismo neste período não foi alterado, a temperatura corporal reduziu significativamente em animais jovens e o equivalente respiratório foi menor nos animais senis comparado ao grupo jovem. Em hipóxia, os animais senis responderam ao estímulo reduzindo V_E e fR e aumentando V_T. O consumo de O₂ aumentou e o envelhecimento causa redução significativa do metabolismo. A relação V_E/VO₂ aumentou em ambos os grupos, provocando hiperventilação nas fêmeas senis e a temperatura corporal também reduziu em

ambos os grupos. O estímulo panicogênico com 7% O₂ aumentou o comportamento de freezing nos animais senis, evidenciando prevalência de uma resposta ansiogênica na peri menopausa. Durante esta fase de transição, também se observou que fêmeas senis apresentaram significativo aumento da progesterona plasmática.

Esse conjunto de resultados permite concluir que nesta fase de oscilação hormonal em fêmeas, estímulos hipercápnicos e hipóxicos causam redução da frequência respiratória e do metabolismo, bem como acentuam o comportamento ansiolítico.

Palavras chaves: perimenopausa, hipercapnia, hipóxia, LC, microglia

1. INTRODUÇÃO

O aumento da população idosa ao redor do mundo tem colocado em destaque doenças neurodegenerativas que acompanham o envelhecimento do ser humano, e que nos últimos tempos já alcançaram proporções epidêmicas. Segundo o relatório de envelhecimento da população mundial da Nações Unidas, o número de indivíduos com idade superior a 60 anos está projetado para aumentar de 841 milhões em 2013 para mais de 2 bilhões em 2050.

O envelhecimento do organismo feminino, particularmente, tem despertado interesse da comunidade científica em razão das inúmeras doenças associadas à senescência deste grupo majoritário entre o crescente grupo dos idosos. Ao longo da vida, as mulheres progredem da vida reprodutiva (pré-menopausa) para a não reprodutiva (pós-menopausa) por meio de um período de transição denominado perimenopausa (HARLOW; GASS; HALL; LOBO *et al.*, 2012)

É neste período que as mulheres experimentam várias transformações como: alterações no comprimento de seus ciclos, sintomas vasomotores, sintomas de humor disfórico, insônia, sintomas somáticos, ansiedade, depressão (BRINTON; YAO; YIN; MACK *et al.*, 2015; DIAZ BRINTON, 2012; KULKARNI, 2018) e ainda, constituem grupo de alto risco para transtorno do pânico (PD), sendo este período, um momento de intervenção particularmente importante (CHEN; WANG; ZHANG; XU *et al.*, 2020; KULKARNI, 2018)). Fêmeas de ratas *Wistar* de 18 meses representam o modelo experimental que melhor se assemelha à perimenopausa em mulheres, uma vez que nesta idade estes animais apresentam redução nas concentrações plasmáticas de estrogênio e aumento nas concentrações plasmáticas de hormônio folículo estimulante (FSH) (FERREIRA; DE NICOLA; ANSELMO-FRANCI; DORNELLES, 2015; NICOLA; LEITE; NISHIKAVA; DE CASTRO *et al.*, 2016).

Esteroides ovarianos, principalmente estradiol e progesterona, afetam regiões encefálicas envolvidas na modulação do humor e do comportamento (MCEWEN, 1989), e as flutuações na secreção dos hormônios ovarianos modificam a neuroquímica encefálica (BARTH; VILLRINGER; SACHER, 2015; SCHMIDT; NIEMAN; DANACEAU; ADAMS *et al.*, 1998). Além disso, evidências indicam que progesterona (P₄), testosterona (T) e estrogênio (E₂) estão envolvidos no controle neural da respiração, e ainda influenciam o quimiorreflexo

central e periférico (BEHAN; KINKEAD, 2011). Neste contexto, estudo de Marques e colaboradores (2015) demonstram que apesar das flutuações hormonais durante o ciclo estral, as respostas ventilatórias ao CO₂ em ratas são semelhantes ao longo do ciclo; entretanto, ratas adultas ovariectomizadas (OVX) apresentaram resposta ventilatória hipercápnica reduzida. Além disso, a reposição hormonal com E₂ (10 µg/0.2 ml) ou com E₂+P₄ (2.5 mg/0.2 ml) em fêmeas adultas OVX não restaurou a resposta ventilatória hipercápnica, sugerindo que outros fatores gonadais estão possivelmente envolvidos nessa resposta. A resposta ventilatória à hipercapnia depende dos quimiorreceptores sensíveis ao CO₂/pH e podem ser classificados como periféricos (localizados nos corpos carotídeos) e centrais (localizados no sistema nervoso central; SNC). Estes últimos apresentam função predominante na resposta ao CO₂ em relação aos periféricos e localizam-se especificamente na superfície ventrolateral da medula oblonga (LOESCHCKE, 1982; MITCHELL; LOESCHCKE; MASSION; SEVERINGHAUS, 1963; SCHLAEFKE, 1981).

Vários estudos demonstraram que os quimiorreceptores centrais estão amplamente distribuídos no SNC, em diferentes áreas do tronco encefálico, incluindo o núcleo do trato solitário, núcleo retrotrapezóide (MULKEY; STORNETTA; WESTON; SIMMONS *et al.*, 2004), rafe bulbar, hipotálamo lateral e núcleo fastigial do cerebelo (NATTIE; LI, 2002) e o locus coeruleus (LC) (GARGAGLIONI; HARTZLER; PUTNAM, 2010).

O LC é um núcleo pontino dorsal localizado bilateralmente no assoalho do quarto ventrículo (4V), de onde parte a maior inervação noradrenérgica (NA) do encéfalo e cuja atividade está aumentada durante a periestrovia de fêmeas *Wistar* (NICOLA; LEITE; NISHIKAVA; DE CASTRO *et al.*, 2016). Além da regulação da função reprodutiva, é sabido que os neurônios deste núcleo são altamente quimiossensíveis ao CO₂/pH (GARGAGLIONI; HARTZLER; PUTNAM, 2010; VICENTE; DIAS; FONSECA; BÍCEGO *et al.*, 2016). É sabido que mais de 80% destes neurônios respondem à hipercapnia com aumento da taxa de disparo (FILOSA; DEAN; PUTNAM, 2002) e uma lesão química desta região atenua a resposta ventilatória hipercápnica em ratos e ratas adultos não-anestesiados (BIANCARDI; BICEGO; ALMEIDA; GARGAGLIONI, 2008; DE CARVALHO; PATRONE; TAXINI; BIANCARDI *et al.*, 2014). Além dos neurônios, as células da glia também podem ser afetadas por hipercapnia (MARQUES;

GARGAGLIONI; JOSEPH; BRETZNER; BÍCEGO *et al.*, 2021). Neste estudo, os autores demonstraram que a ovariectomia promoveu ativação microglial no LC, indicando um estado de inflamação. Adicionalmente, a exposição ao CO₂ aumentou a distância entre as células microgliais neste núcleo, sugerindo assim um aumento na motilidade celular nesta estrutura.

A sobrevivência e a função normal de um neurônio são altamente dependentes da glia e podem ser afetadas por alterações celulares que são internas a eles (ANGELOVA; BROWN, 2019; YORK; BERNIER; MACVICAR, 2018). A micróglia são células críticas específicas do sistema nervoso que influenciam o desenvolvimento do encéfalo, a manutenção do ambiente neural, a resposta a lesões e o reparo, que durante o envelhecimento, mudam sua morfologia e podem apresentar capacidade diminuída para suas funções normais (HARRY, 2013). Silva e colaboradores (2018) demonstraram que estas células são altamente responsivas às flutuações de CO₂/H⁺, participando, portanto, das respostas cardiorrespiratórias inerentes ao transtorno do pânico. Células microgliais (VILLA; GELOSA; CASTIGLIONI; CIMINO *et al.*, 2018) e o transtorno do pânico (MARQUES; GARGAGLIONI; JOSEPH; BRETZNER; BÍCEGO *et al.*, 2021) apresentam dimorfismo sexual significativo, o que permite a estas células responder diferentemente ao mesmo estímulo, dependendo da ação dos hormônios sexuais ou da idade (CRAIN; NIKODEMOVA; WATTERS, 2009; 2013; LUO; CHEN, 2012; NISSEN, 2017; SOHRABJI; WILLIAMS, 2013). Desse modo, o envelhecimento da glia pode afetar a progressão de doenças neurodegenerativas (COHEN; TORRES, 2019; HOLTZMAN; ULRICH, 2019; SPITTAU, 2017), além de ter um impacto significativo na viabilidade neuronal, bem como nas proteínas que eles expressam ou mesmo no *turnover* de proteínas (BROWN, 2009; VERKHRATSKY; RODRÍGUEZ; PARPURA, 2014).

Embora a região de LC esteja entre as primeiras estruturas encefálicas comprometidas em estágios iniciais de doenças neurodegenerativas, ainda não está claro como as alterações na estrutura e função do LC influenciam a patogênese e a progressão dos sintomas (BETTS; KIRILINA; OTADUY; IVANOV *et al.*, 2019). A perda neuronal de LC acompanha o processo normal de envelhecimento (HENEKA; NADRIGNY; REGEN; MARTINEZ-HERNANDEZ *et al.*, 2010; STOWELL; SIPE; DAWES; BATCHELOR *et al.*, 2019), contudo, esta perda torna-se aumentada entre 50 (MATTHEWS; CHEN; ESIRI; KEENE *et al.*,

2002) a 60% (GERMAN; MANAYE; WHITE; WOODWARD *et al.*, 1992) em pacientes com Alzheimer, por exemplo. A função noradrenérgica diminui com a idade e pode estar subjacente ao declínio cognitivo no envelhecimento (LIU; KIEVIT; TSVETANOV; BETTS *et al.*, 2020; MATHER; HARLEY, 2016). O LC é vulnerável à degeneração e a perda de neurônios noradrenérgicos do LC em humanos com envelhecimento normal é quantificável com imagens (LIU; ACOSTA-CABRONERO; CARDENAS-BLANCO; LOANE *et al.*, 2019). De fato, as consequências da perda do tônus noradrenérgico com o envelhecimento podem ser observadas em respostas fisiológicas, como reflexo de dilatação pupilar prejudicado e déficits de atenção, aprendizado e memória e excitação (GRUDZIEN; SHAW; WEINTRAUB; BIGIO *et al.*, 2007; JACOBS; RIPHAGEN; RAMAKERS; VERHEY, 2021; LIU; KIEVIT; TSVETANOV; BETTS *et al.*, 2020; MATHER; HARLEY, 2016). Neste contexto, O LC parece ser particularmente propenso à neurodegeneração e tal suscetibilidade pode ser explicada por vários aspectos, incluindo o estresse oxidativo causado pelo metabolismo da NA, em paralelo com a vulnerabilidade metabólica devido à alta atividade neuronal do LC ao longo da vida (WEINSHENKER, 2018). Em consonância com a degeneração do LC, as concentrações de NA são significativamente reduzidas nas áreas alvo do LC, incluindo a amígdala e hipocampo, entre as estruturas límbicas, bem como no hipotálamo entre as estruturas subcorticais (ARAI; KOSAKA; IIZUKA, 1984; FARLEY; HORNYKIEWICZ, 1977).

O estrogênio (E₂) contribui continuamente para o crescimento e desenvolvimento do encéfalo através da regulação da sobrevivência, diferenciação, proliferação e migração das células (BUSTAMANTE-BARRIENTOS; MENDEZ-RUETTE; ORTLOFF; LUZ-CRAWFORD *et al.*, 2021; PINCETI; SHULTS; RAO; PAK, 2016), e está envolvido na neurogênese (MCCLURE; BARHA; GALEA, 2013). O declínio do estrogênio está associado a níveis reduzidos de fator neurotrópico derivado do encéfalo (BDNF) (CHHIBBER; WOODY; KARIM RUMI; SOARES *et al.*, 2017), indicando que E₂ é essencial para manter os fatores de crescimento. Estudos em animais e humanos demonstraram que E₂ melhora a atividade dos antioxidantes neuronais (BELLANTI; MATTEO; ROLLO; DE ROSARIO *et al.*, 2013; MOORTHY; SHARMA; BASIR; BAQUER, 2005), protegendo assim contra doenças neurodegenerativas (BUSTAMANTE-BARRIENTOS; MENDEZ-RUETTE;

ORTLOFF; LUZ-CRAWFORD *et al.*, 2021). O metabolismo cerebral também é afetado por E₂. De fato, a perda de estrogênio associada à menopausa é talvez a razão pela qual as mulheres não apenas correm um risco maior de doenças neurodegenerativas do que os homens (PAGANINI-HILL; HENDERSON, 1994), mas também experimentam um declínio cognitivo mais acelerado (BUSTAMANTE-BARRIENTOS; MENDEZ-RUETTE; ORTLOFF; LUZ-CRAWFORD *et al.*, 2021).

Visto que a perimenopausa é o período de intensa transformação do organismo feminino, com significativas variações hormonais de gonadotrofinas e esteroides, em especial E₂, que alteram a fisiologia dos sistemas e refletem na qualidade de vida da mulher, sobretudo no humor, crises depressivas, desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e episódios de pânico, a compreensão da participação da micróglia do LC na resposta ventilatória e comportamental ao CO₂ neste período é importante para o desenvolvimento de novas ferramentas de intervenção precoce.

Portanto, a hipótese deste estudo é que durante a periropausa (PE) há maior resposta ventilatória frente a desafios hipercápnicos e hipóxicos, além de maior atividade comportamental e ativação microglial do LC sob hipóxia.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Verificar se no período de periropausa a resposta ventilatória hipercápnica e hipóxica está aumentada, bem como se neste período há aumento na resposta comportamental e na ativação das células microgliais do LC sob o efeito panicogêncio de ar hipóxico.

2.2. Específicos

2.2.1. Avaliar a resposta ventilatória frente ao estímulo hipercápnico (7% de CO₂) e hipóxico (O₂) em fêmeas *Wistar* adultas com ciclo estral regular e na fase de diestro (4 meses) e em PE (18 meses);

2.2.2 - Avaliar a resposta comportamental de fêmeas *Wistar* adultas com ciclo estral regular e na fase de diestro (4 meses) e em PE (18 meses);

2.2.3 - Avaliar a condição metabólica de fêmeas *Wistar* adultas com ciclo estral regular e na fase de diestro (4 meses) e em PE (18 meses), através de

medidas de temperatura corporal (T_c) e consumo de O₂ durante hipercapnia e hipóxia;

2.2.4 – Analisar a micróglia dos grupos controle e expostos a agente panicogênico (7% O₂) de fêmeas *Wistar* adultas com ciclo estral regular e na fase de diestro (4 meses) e em PE (18 meses);

2.2.5 – Determinar as concentrações plasmáticas dos esteroides ovarianos dos grupos controle após os desafios gasosos de fêmeas *Wistar* adultas com ciclo estral regular e na fase de diestro (4 meses) e em PE (18 meses).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos animais foram submetidos ao Comitê de Ética no Uso de Animal da Faculdade de Ciências Agrária e Veterinárias de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP e aprovados sob o protocolo CEUA: 8417/22.

Animais: Foram utilizadas fêmeas *Wistar* nas idades de 4 e 18 meses (n=8/experimento), fornecidas pelo Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA). No biotério, os animais foram mantidos em caixas coletivas (4 animais/caixa) em estantes ventiladas, com controle de temperatura (25 ± 2°C), umidade (55 ± 10%) e ciclo de luz (12/12 h - luzes acesas às 6h), com acesso livre à água e ração (Presence® ratos e camundongos).

O ciclo estral de todos os animais foi realizado diariamente através do esfregaço vaginal colhido no período matutino (9h), para determinação da regularidade do ciclo estral nos animais adultos, bem como da irregularidade do ciclo, com a persistência da fase do diestro nos animais de 18 meses. O esfregaço vaginal diário foi analisado a fresco ao microscópio óptico, segundo a técnica de Long e Evans (1922) por 15 dias consecutivos, durante o terceiro e décimo sétimo mês das ratas. No estudo foram utilizados somente animais adultos que apresentaram ciclo estral regular e ratas senis com irregularidade estral, ou seja, que apresentaram diestro persistente durante o período correspondente a três ciclos consecutivos.

3.1. Experimento 1: Avaliação comportamental, metabólica e ventilatória de fêmeas *Wistar* adultas e em PE diante de desafio por CO₂ ou O₂

3.1.1. Determinação da ventilação (V_E) pulmonar: A V_E foi medida por pletismografia de corpo inteiro em sistema fechado (BARTH; VILLRINGER; SACHER, 2015; LOESCHCKE, 1982; MCEWEN, 1989), com permanência do animal em câmara experimental de 5L por um período de aclimação de no mínimo 30 min, com ar ambiente. Após interrupção do fluxo de ar para a câmara do animal, foram realizadas duas medidas de V_E em normocapnia, com duração de 100 segundos/cada em intervalos de 10 min. Em seguida, a câmara foi ventilada primeiramente com mistura de 7% CO₂ e foram realizadas três medidas de V_E com duração de 100 segundos/cada em intervalos de 10 min. Após exposição à hipercapnia, o animal foi submetido a 60 min de recuperação, com ventilação de ar ambiente para o interior da câmara, e duas medidas de V_E foram realizadas aos 40 e 60 min deste período. A seguir, a câmara foi ventilada com mistura de 7% O₂ e foram realizadas três medidas de V_E com duração de 100 segundos/cada em intervalos de 10 min. A temperatura corporal (T_c) e o consumo de O₂ (VO₂) foram medidos continuamente durante todo o experimento. Em virtude das oscilações hormonais próprias de cada fase do ciclo estral, todos os procedimentos experimentais foram realizados com um animal/vez até às 13 h.

Durante a realização das medidas de V_E, o fluxo de ar foi interrompido e a câmara do animal permaneceu vedada por cerca de 100 segundos. Os fluxos de entrada e saída de ar foram de 2 L. min⁻¹ medidos por fluxômetro ("Mass Flow System" - MFS, Sable Systems International, Inc, Las Vegas, EUA). Os sinais foram detectados por transdutor de diferencial de pressão (TSD 160A, Biopac Systems, Santa Barbara, CA - EUA) conectado à câmara do animal, coletados por amplificador (DA 100C, Biopac Systems) e direcionados a um conversor analógico-digital para serem digitalizados em computador equipado com programa para aquisição (AcqKnowledge MP 100, BioPacSystems, Inc., Santa Barbara, CA, EUA). Foram medidos a fR e V_T, sendo o último calculado através de fórmula (BARTH; VILLRINGER; SACHER, 2015; BIANCARDI; BICEGO; ALMEIDA; GARGAGLIONI, 2008; DE CARVALHO; PATRONE; TAXINI; BIANCARDI *et al.*, 2014; LOESCHCKE, 1982).

3.1.2. Indução de ataques de pânico: O desafio de 7% de O₂ foi utilizado para induzir comportamento de pânico nos animais (BATISTELA; VILELA-COSTA; FRIAS; HERNANDES *et al.*, 2021). Outro grupo independente de animais foi utilizado neste experimento. Para este procedimento, o animal foi aclimatado por 30 minutos e o registro comportamental foi realizado durante 15 min, em normocapnia. Em seguida, gás nitrogênio (N₂) foi ventilado para o interior da câmara (2 L/min), por aproximadamente 2 min, até que a concentração de O₂ atingisse 7,6%. Imediatamente após, uma mistura com 7% O₂ foi conectada à câmara para que esta concentração se mantivesse por 15 minutos.

3.1.3. Medidas comportamentais: Para análise das respostas comportamentais, os experimentos foram gravados por uma câmera (Logitech, EUA) posicionada de modo que o animal e seus movimentos fossem captados. As respostas comportamentais analisadas que denotam ataques de pânico ao CO₂ foram descritas por Spiacci e colaboradores (SPIACCI; VILELA-COSTA; SANT'ANA; FERNANDES *et al.*, 2018) e foram utilizadas no presente estudo. Foram analisados os seguintes comportamentos: número de saltos (jump), tempo gasto imóvel (freezing), levantamento (rearing), velocidade máxima (running) e autolimpeza (grooming). A análise foi realizada por um experimentador experiente e não conhecedor do grupo do animal. O comportamento de congelamento evocado por CO₂ parece ser consistente em roedores e provavelmente representa um comportamento defensivo associado ao medo (WINTER; AHLBRAND; NAIK; SAH, 2017). A frequência de levantamento representa o comportamento exploratório e a motivação para escapar (BIAGIONI; DOS ANJOS-GARCIA; ULLAH; FISHER *et al.*, 2016; GRIEBEL; PERRAULT; SANGER, 1997; SHANSKY, 2015) e será incluída para avaliar a responsividade à ameaça evocada pelo O₂.

3.1.4. Determinação da taxa metabólica: realizada pelo método de calorimetria indireta (VO₂), através da configuração Pull mode e sistema aberto de respirometria (MORTOLA, 1984; PATRONE; BIANCARDI; MARQUES; BICEGO *et al.*, 2018). Para esta análise utilizou-se uma bomba do analisador de O₂ (ADInstruments®) conectada à saída da câmara para controlar o fluxo de entrada do gás na câmara. O gás expirado foi seco através de uma pequena coluna de dessecante (Drierite TM, Sigma-Aldrich) antes de passar pelo analisador. O ar foi continuamente amostrado pelo analisador de O₂ permitindo

a determinação do consumo pelo programa de aquisição de dados (Power-Lab System, ADInstruments® Sidnei, Austrália) e o mesmo foi calculado utilizando fórmula apropriada (PATRONE; BIANCARDI; MARQUES; BICEGO *et al.*, 2018).

3.1.5. Medidas da Tc: a Tc foi obtida por meio da implantação abdominal de sensor de temperatura datalogger (Biomark, EUA). Os mesmos foram implantados cirurgicamente na cavidade abdominal do animal, sob sedação com isoflurano (5% para indução e 1% para manutenção). Após o procedimento, os animais receberam injeção de antibiótico (enrofloxacina, Baytril; 2,5 mg.kg⁻¹ S.C., Bayer S.A., São Paulo, SP, Brasil) e analgésico (Flunixinina Meglumina, Banamine; 10 mg.kg⁻¹), em seguida, foram colocados em caixas com água e ração “*ad libitum*” e mantidos em sala com temperatura ambiente, umidade e luminosidade controladas, por um período de 2 dias de recuperação antes dos experimentos. Durante os experimentos, a temperatura corporal foi aferida em 2 tempos de 10 min em normocapnia e em 6 tempos de 5 min, na hipercapnia e na hipóxia. A temperatura no interior da câmara foi continuamente amostrada a cada 5 min, durante todo o procedimento experimental (Subcue) e a temperatura do ambiente foi mantida a 25°C.

3.1.6. Determinação das concentrações plasmáticas de esteroides em fêmeas Wistar adultas e em PE: imediatamente após o término dos desafios gasosos, os animais tiveram suas caudas anestesiadas com gel de cloridrato de lidocaína 5% para realização de coleta sanguínea destinadas à determinação das concentrações plasmáticas de esteroides ovarianos, por ensaio imunoenzimático (ELISA).

3.2. Experimento 2: Avaliação da micróglia (Iba-1) do Locus Coeruleus de fêmeas Wistar adultas e em PE após estímulo panicogênico por desafio hipóxico com 7% O₂

3.2.1. Perfusão transcardíaca para fixação do tecido cerebral

Seis horas após o desafio hipóxico com 7% O₂, os grupos experimentais foram perfundidos transcardiacamente. Os animais foram previamente anestesiados com Cloridrato de Cetamina (Syntec® 80 mg/Kg pc/ip) e Cloridrato de Xilazina (Syntec® 40 mg/Kg pc/ip) e em seguida, submetidos aos procedimentos descritos a seguir:

Passo 1: infusão por bomba peristáltica, de 40 mL de tampão fosfato salina (PBS) a 0,01 M para a lavagem sistêmica do animal (fluxo 8 mL/min, por aproximadamente 5 min) e limpeza do encéfalo.

Passo 2: infusão por bomba peristáltica, de 400 mL de paraformaldeído (PFA) a 4% (obtido a partir da mistura de solução PBS 0,2 M e PFA 8% na proporção 1:1) para a fixação do tecido cerebral, durante 50 minutos.

Passo 3: remoção do encéfalo e manutenção em PFA 4% overnight, em geladeira.

Passo 4: imersão do encéfalo em solução de sacarose 30% diluída em PB 0,2 M até a saturação.

Passo 5: congelamento do encéfalo em isopentano a -50°C por 1 min e armazenamento do mesmo a -80° C para processamento e análise posteriores.

3.2.2. Imunoistoquímica para micróglia no LC:

Para quantificação das células microgliais da região do LC foi realizada imunomarcção da molécula-adaptadora-de ligação 1 (Iba-1) (MARQUES; GARGAGLIONI; JOSEPH; BRETZNER; BICEGO *et al.*, 2021) utilizando-se a metodologia free-floating. Os encéfalos congelados foram cortados em criostato, em secções coronais de 30 µm com 4 séries contendo a região do LC. Em seguida, os mesmos foram armazenados em solução crioprotetora a -20°C, até o momento da imunomarcção. Uma das 4 séries foi submetida à imunomarcção, sendo inicialmente submetida à recuperação antigênica por 30 min em tampão citrato, seguido pelo bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 1% (30 min) e das ligações inespecíficas com albumina 1% (BSA), por 2 h. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo Iba-1 policlonal de coelho (1:250, Wako, Osaka, Japão) overnight, 4°C, para posterior incubação em IgG anti-coelho biotilado (1: 400, Vector) em solução de bloqueio por 3 h e em complexo avidina-biotina (ABC, Vector Laboratories) a 1: 600 por 2 h. Após lavagens em PBS 0,01 M, as secções foram incubadas primeiramente com H₂O₂ 1% (20 min) e em seguida, com o cromógeno DAB em pastilha (3,3'-Diaminobenzidine SIGMAFAST™ DAB), por 5 min. A reação foi interrompida com 4 lavagens dos cortes em solução de PBS 0,01 M por 5 min cada.

Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas para microscopia e posteriormente desidratados em bateria de álcool etílico em concentrações

crescentes (70%, 80%, 95%, 100%) e diafanizadas em xilol, para serem recobertas por lamínula.

3.2.3. Análise microglial: foi realizada utilizando-se microscópio Leica (Leica DM 4000B LED) equipado com câmera digital Leica (Leica DFC 450) acoplada a um dispositivo de contraste. Foram selecionadas secções sob o mesmo nível anatômico (Bregma -9,96 mm conforme Paxinos e Watson, 2007) (GEORGE PAXINOS, 2009; PAXINOS; WATSON, 2009), de cinco animais/grupo experimental. Fotomicrografias bilaterais com ampliação de 200x foram utilizadas para avaliar a densidade microglial, e a ampliação de 400x foi utilizada para avaliar as medidas do corpo celular e da área de arborização.

Os parâmetros analisados serão: número de células, densidade celular, índice morfológico, tamanho médio do soma, área média de arborização e distância celular mais próxima (NND), conforme descrito anteriormente (MARQUES; GARGAGLIONI; JOSEPH; BRETZNER; BICEGO *et al.*, 2021; VERDONK; ROUX; FLAMANT; FIETTE *et al.*, 2016).

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS:

Inicialmente os resultados foram plotados ponto-a-ponto para verificar em qual tempo da exposição aconteciam alterações. Nesta condição, foi adotado o tempo de 20 min para todos os parâmetros ventilatórios e metabólicos em todos os grupos experimentais.

As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism (versão 8.0 para Windows). Os dados foram avaliados quanto à conformidade pressuposições de homogeneidade das variâncias e normalidade dos erros studentizados. O teste ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido pelo teste de Tukey, foi realizado para parâmetros metabólicos e ventilatórios. A concentração plasmática dos esteroides e as análises comportamentais foram realizadas utilizando teste t independente. A análise microglial foi realizada usando o teste ANOVA bidirecional, seguido pelo teste de Tukey. Os dados foram apresentados usando média \pm EPM e o nível de significância estatística usado foi de 5% ($p < 0,05$) para todas as análises.

5. RESULTADOS

5.1. Parâmetros ventilatório e metabólico de fêmeas *Wistar* adultas e em periostropausa diante de desafio por CO₂

As Figuras 1A-C e E mostram as medidas dos parâmetros ventilatórios de fêmeas *Wistar* adultas e em periostropausa durante normocapnia e hipercapnia com 7% CO₂ por 20 minutos. A normocapnia não aponta diferença estatística entre jovem e senil ($p=0,079$) para a VE (Fig. 1A). Na condição hipercápnic, observa-se que V_E aumenta em ambos os grupos ($p<0,001$; $F(1,6)=183,76$) em comparação com a normocapnia, contudo, não há interação entre idade e condição gasosa ($p=0,074$; $F(1,6)=4,689$). Na figura 1B, observa-se que a hipercapnia provoca aumento da frequência respiratória em ambos os grupos ($p<0,001$; $F(1,6)=196,59$), sendo que no grupo senil, esse aumento é menor quando comparado com o grupo jovem ($p<0,01$). Neste parâmetro houve interação entre idade e condição gasosa ($p=0,106$; $F(1,6)=3,624$). O volume corrente (Fig. 1C) também aumentou em ambos os grupos ($p<0,001$; $F(1,6)=171,728$) sem interação entre idade e condição gasosa ($p=0,091$). Em normocapnia não houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,950$; $F(1,6)=0,0042$). Os parâmetros metabólicos estão representados nas figuras 1D e F. Não houve diferença estatística entre os grupos em normocapnia durante o consumo de O₂ ($p=0,954$), V_E/VO_2 ($p=0,923$) e na temperatura corporal ($p=0,279$). O consumo de oxigênio (Fig. 1D) não revelou diferença estatística entre os grupos durante estímulo hipercápnic ($p=0,933$), assim como na interação entre idade e condição gasosa ($p=0,986$; $F(1,6)=0,000326$). No entanto, o equivalente respiratório (Fig. 1E) e a temperatura corporal (Fig. 1F), mostram alteração nesta condição. Em hipercapnia há hiperventilação por aumento no equivalente respiratório quando comprado à condição ambiente em ambos os grupos ($p<0,001$; $F(1,6)=566,413$). A temperatura corporal não apresentou diferença estatística em ambos os grupos ($p_J = 0,06$ e $p_{PE} = 0,09$). Não houve diferença estatisticamente significativa na interação entre idade e condição gasosa (Fig. 1E-F) na relação V_E/VO_2 ($p = 0,398$, $F(1,6) = 0,827$) e na temperatura corporal ($p = 0,883$; $F(1,6) = 0,0235$).

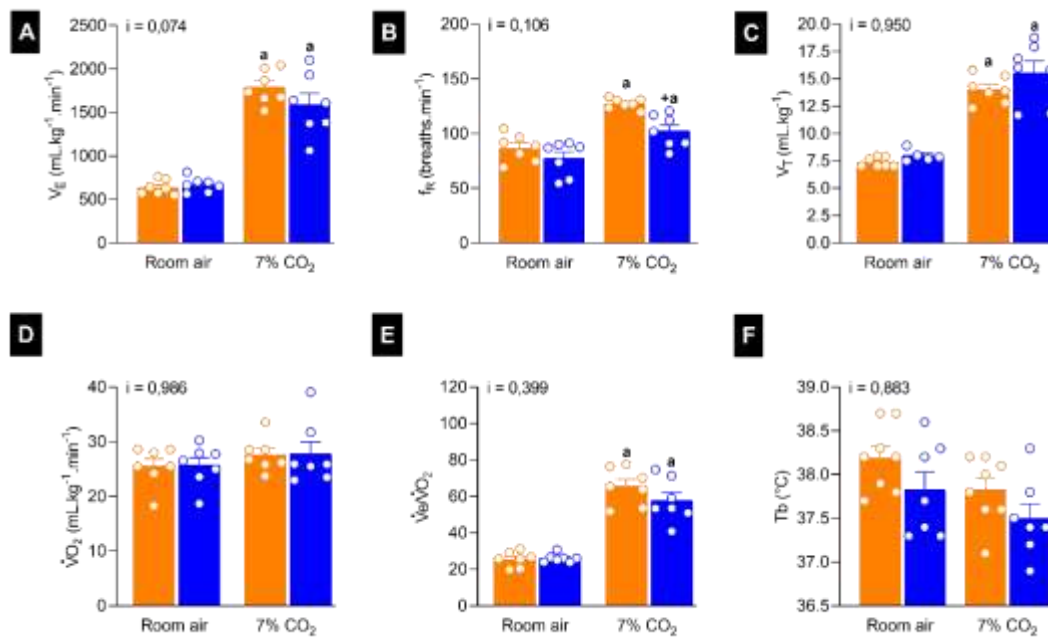


Figura 1 – (A) Ventilação (V_E), (B) frequência respiratória (f_R), (C) Volume corrente (V_T), (D) Consumo de O_2 ($\dot{V}O_2$), (E) Equivalente respiratório ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$) e (F) Temperatura corporal (T_b) em animais jovens (○) e senis (○) durante desafio hipercápnico com 7% CO_2 . Teste ANOVA Two way de medidas repetidas, seguida pelo pós-teste de Tukey. ^a representa diferença estatística intra-grupos ($p < 0,01$), + representa diferença estatística inter-grupos ($p < 0,01$) e ⁱ representa interação idade e condição gasosa hipercápnica.

5.2. Parâmetros ventilatório e metabólico de fêmeas *Wistar* adultas e em periostropausa diante de desafio por O_2

A Figura 2 (A-C e E) mostra os parâmetros ventilatórios de fêmeas *Wistar* jovem e PE sob desafio com O_2 por 20 minutos. Não houve diferença estatística entre o grupo jovem e PE ($p = 0,963$) para V_E em normocapnia (Fig. 2A). No entanto, durante o desafio hipóxico, V_E aumenta em ambos os grupos ($p < 0,001$; $F(1,5) = 76,166$) (Fig. 2A); porém, não há interação entre idade e condição gasosa ($p = 0,204$; $F(1,5) = 2,132$). Na figura 2B, observou-se que a hipóxia causa aumento da frequência respiratória em ambos os grupos ($p < 0,001$; $F(1,5) = 127,957$), com interação entre idade e condição gasosa ($p = 0,003$; $F(1,5) = 27,586$). Não houve diferença estatística entre os grupos ($p = 0,677$) na normocapnia. O volume corrente (Fig. 2C) não aumentou significativamente em nenhum dos grupos em normocapnia ($p = 0,897$), mas em hipóxia o grupo PE apresentou maior V_T ($p = 0,017$). A interação entre idade e condição gasosa foi estatisticamente significativa ($p = 0,034$; $F(1,5) = 8,373$).

Não houve diferença estatística entre os grupos durante a normocapnia no consumo de O_2 ($p=0,931$), V_E/VO_2 ($p=0,990$) e temperatura corporal ($p=0,754$). O metabolismo, avaliado indiretamente pelo consumo de oxigênio (Fig. 2D), durante a hipóxia indicou aumento no VO_2 no grupo jovem ($p = 0,006$), enquanto no grupo PE não houve alteração ($p=0,796$). No entanto, o consumo de O_2 no grupo PE foi menor ($p=0,012$) quando comparado ao grupo jovem. Não houve interação entre idade e condição gasosa ($p = 0,057$; $F(1,6)=5,548$). O equivalente respiratório (Fig. 2E) e a temperatura corporal (Fig. 2F) são sensíveis a essa condição. Em hipóxia, o grupo PE aumentou o equivalente respiratório ($p<0,01$) em relação à normocapnia, assim como os animais jovens ($p<0,05$), e a temperatura corporal diminuiu em ambos os grupos ($p_{PE}<0,05$; $p_J<0,001$). Não houve diferença estatisticamente significativa na interação entre idade e condição gasosa para esses dois parâmetros ($p_{V_e / VO_2} = 0,420$; $F(1,5)=0,772$ e $p_{T_b}=0,243$; $F(1,6)=1,674$).

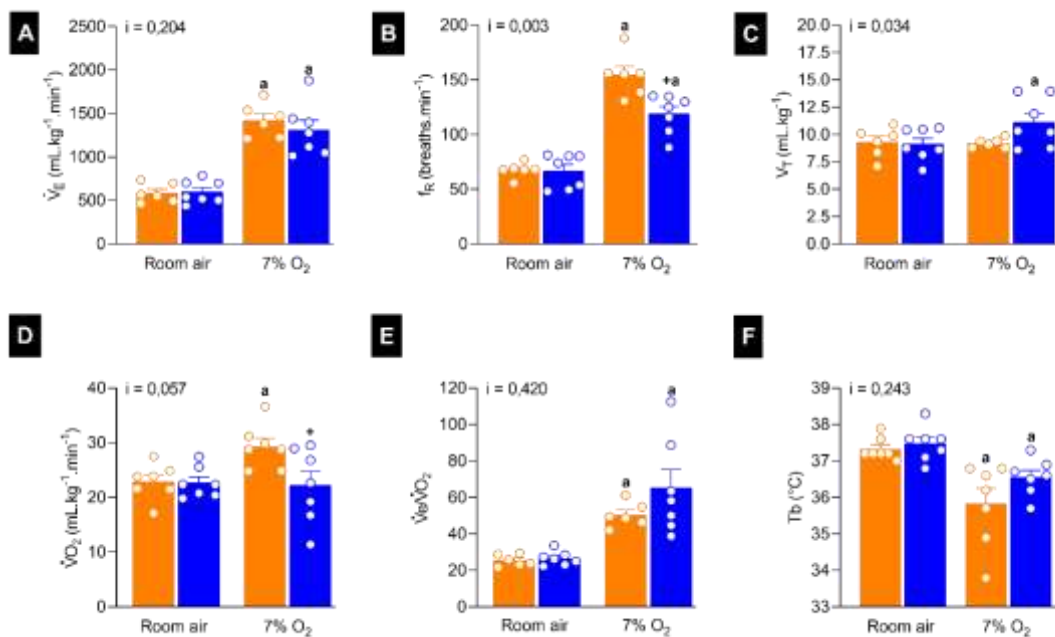


Figura 2 – (A) Ventilação (V_E), (B) frequência respiratória (f_R), (C) Volume corrente (V_T), (D) Consumo de O_2 ($\dot{V}O_2$), (E) Equivalente respiratório (\dot{V}_E/VO_2) e Temperatura corporal (T_b) em animais jovens (○) e PE (○) durante desafio hipóxico com 7% O_2 . Teste ANOVA Two way de medidas repetidas, seguida pelo pós-teste de Tukey. ^a representa diferença estatística intra-grupos ($p<0,05$), ⁺ representa diferença estatística inter-grupos ($p<0,01$) e ⁱ representa interação idade e condição gasosa hipóxico.

5.3. Medidas comportamentais de fêmeas *Wistar* adultas e em periostropausa durante estímulo panicogênico com 7% O₂

A Figura 3 mostra o efeito da hipóxia nos comportamentos de salto, corrida e congelamento durante o envelhecimento feminino. A análise estatística mostrou que os animais PE exibiram fuga horizontal ($p=0,045$; $t(13)=2,212$) e maior duração do comportamento de congelamento ($p=0,0042$; $t(13)=3,468$) do que os animais jovens. Nenhuma diferença estatística foi observada no número de saltos ($p=0,0892$; $t(13)=1,837$) comparando os grupos. Durante a normocapnia, nenhum desses comportamentos foi observado.

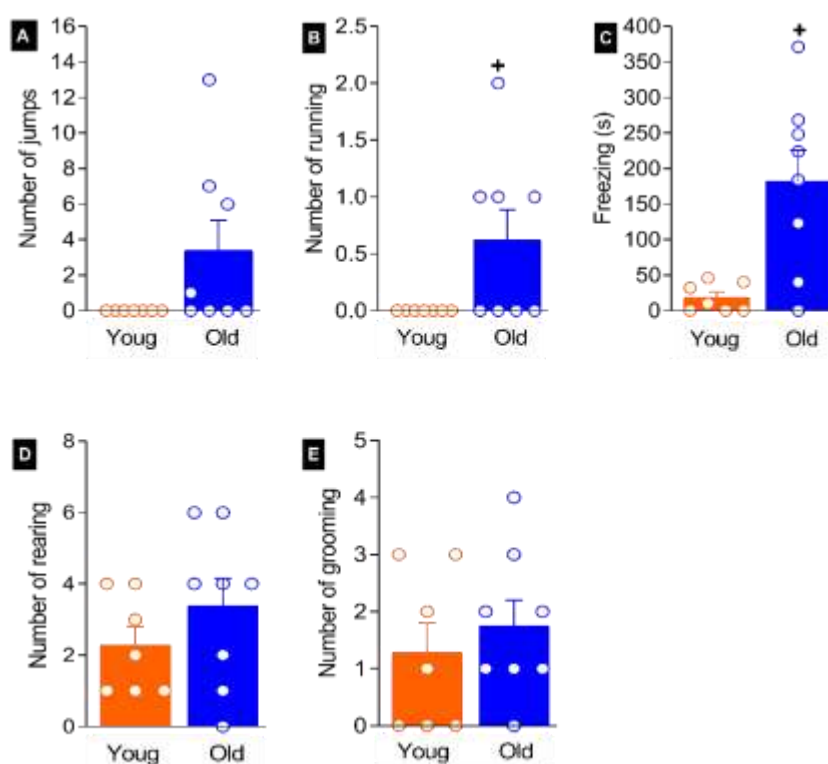


Figura 3 – Medidas comportamentais em animais jovens (○) e PE (◐) durante estímulo panicogênico com 7% O₂. Teste T independente. + representa diferença estatística inter-grupos ($p < 0,05$).

5.4. Concentrações plasmáticas de esteroides

A Figura 4 mostra as concentrações plasmáticas de E₂ (A) e P₄ (B) após o término dos protocolos experimentais para hipercapnia e hipóxia. O resultado para E₂ não apresentou diferença estatística entre os grupos ($p=0,348$; $t(20)=0,962$), enquanto P₄ no grupo PE foi significativamente maior ($p < 0,05$; $t(28)=-2,294$).

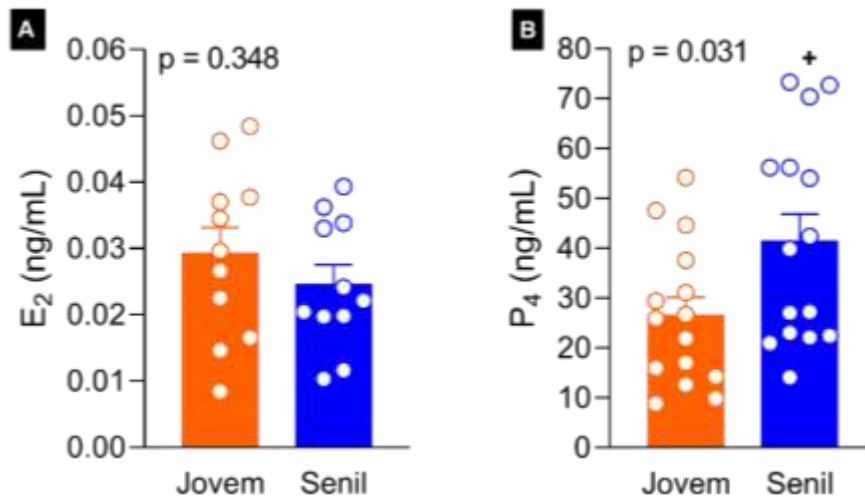


Figura 4 – Níveis sanguíneos de E₂ e P₄ em animais jovens (○) e PE (○) após estimulação panicogênica com 7% de O₂. Teste t independente. + representa diferença estatística entre os grupos (p<0,05).

5.5. Análise da micróglia dos grupos controle e expostos a agente panicogênico (7% O₂) de fêmeas *Wistar* jovens (4 meses) e em periostropausa (18 meses)

A seguir são demonstradas fotos dos cortes da região do LC (Fig. 5) dispostos em lâmina para microscopia logo após o término da imunomarcagem para Iba-1 (Fig. 5)



Figura 5 – Cortes da região do LC montados em lâmina gelatinizada ao término da imunomarcagem para Iba-1.

As fotomicrografias das células microgliais com aumento de 400x, mostram que há diferença no tamanho do corpo celular e na ramificação destas células em animais jovens e em PE durante normocapnia e após 6h do estímulo hipóxico com 7% de O₂.

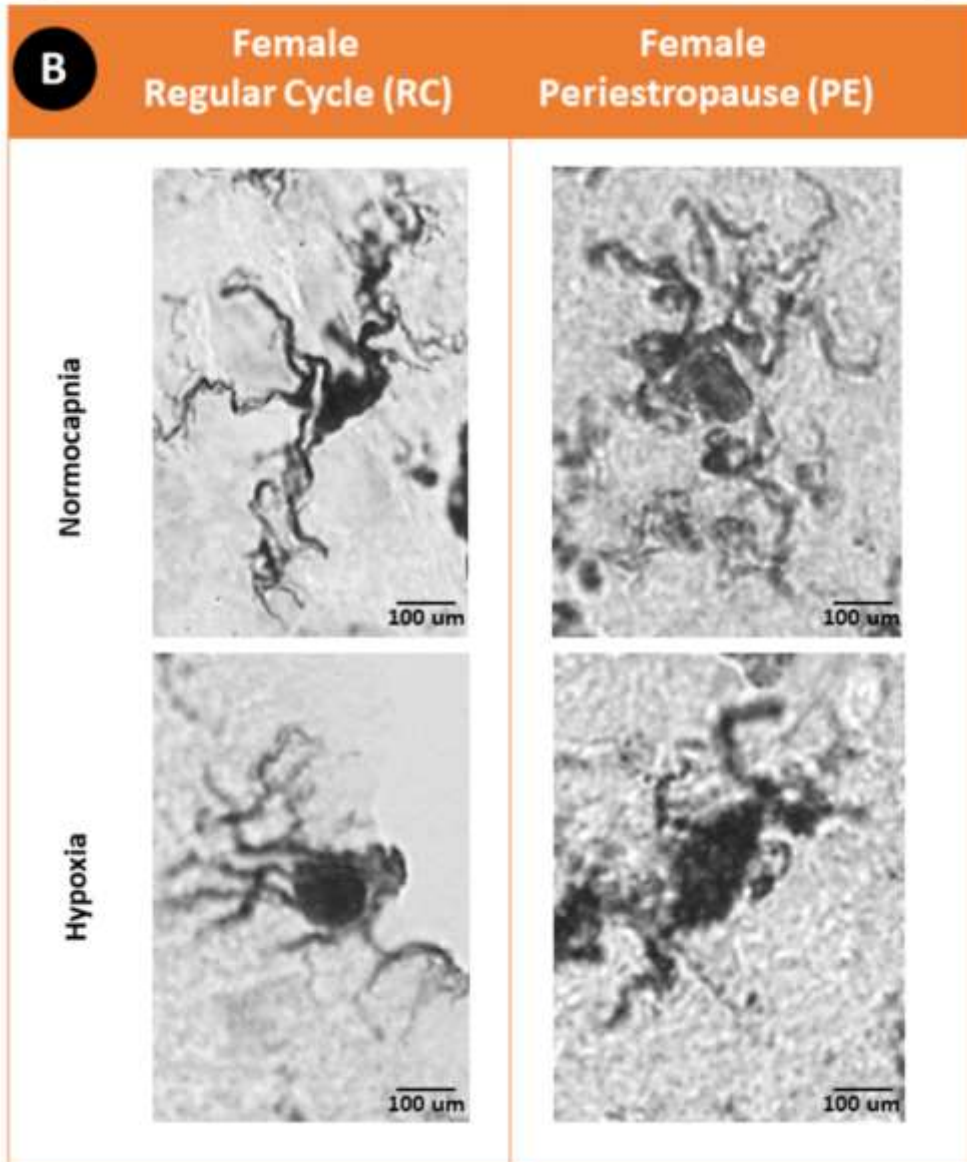
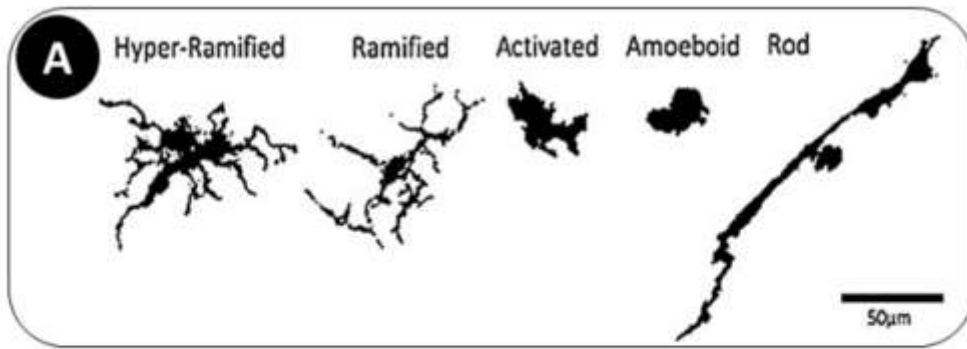


Figura 6 - (A) Representação dos morfotipos da microglia (adaptado de CHOI; GUO; CORDEIRO, 2021). (B) Fotomicrografias da microglia de animais jovens e PE em normocapnia e hipóxia. Barra de escala: 1 cm = 100 µm.

6. DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que no processo de envelhecimento durante a periostropausa há redução do consumo de O_2 (hipometabolismo) por hiperventilação em condições hipóxicas. Esta fase, também é determinante para que ocorra aumento da ventilação por redução na frequência respiratória quando há variação nas concentrações gasosas tanto de CO_2 quanto de O_2 . Observou-se ainda redução da temperatura corporal e aumento no comportamento de freezing e no número de corridas durante ataques de pânico induzido por 7% O_2 e que a morfologia microglial 6 h após desafio hipóxico é significativamente alterada neste período.

6.1. O envelhecimento altera a resposta ventilatória sem alterar o metabolismo frente à hipercapnia

Assim como observado por Dominiqini-Moraes e colaboradores (2025) em fêmeas de camundongos em diestro, a hipercapnia não altera o VO_2 em ratas cíclicas na fase de diestro e em fêmeas em periostropausa.

Fêmeas com ciclo regular na fase de diestro (RC) e em periostropausa (PE) apresentam valores similares de V_E em condições normocápnicas, assim como demonstrado por Holley e colaboradores (2012) em fêmeas de 30 e 90 dias. Diante de estímulo hipercápnico, fêmeas jovens e senis aumentam significativamente V_E , no entanto, fêmeas senis aumentam aproximadamente 20% menos V_E como resultado da redução frequência respiratória comparada ao grupo jovem e aumento do volume corrente, assim como ocorre no grupo jovem na mesma condição.

Da mesma forma que fêmeas de camundongos na fase de diestro submetidas à hipercapnia com 20% CO_2 (DOMINIQUINI-MORAES; BERNARDES-RIBEIRO; PATRONE; FONSECA *et al.*, 2025), fêmeas *Wistar* jovens nesta fase em hipercapnia com 7% CO_2 também aumentam V_E , V_T , V_E/VO_2 sem aumentar VO_2 . Assim como observado neste estudo, Marques e colaboradores (2015) também demonstraram que em condições normocápnicas, não há alteração na V_E , mas que em hipercapnia, fêmeas aumentam V_E , V_T e f_R e V_E/VO_2 , com redução da temperatura corporal. Segundo Preston e colaboradores (2009) mulheres na pré e pós-menopausa não apresentam diferença na sensibilidade ao CO_2 , no entanto, neste estudo fica evidenciado que fêmeas com ciclo regular e em periostropausa são

sensíveis ao CO₂, uma vez que os esteroides agem na plasticidade respiratória e no controle neural da respiração (HOLLEY; BEHAN; WENNINGER, 2012) e que durante a periostropausa há flutuações hormonais, com baixas concentrações plasmáticas de E₂ e altas concentrações plasmáticas de P₄ (NICOLA; FERREIRA; MATA; VILHENA-FRANCO *et al.*, 2021; NICOLA; LEITE; NISHIKAVA; DE CASTRO *et al.*, 2016), corroborando com o estudo de Marcouiller e colaboradores (2104), cujo tratamento com progesterona aumentou as respostas quimiorreflexas à hipercapnia em fêmeas de camundongo adultas.

6.2. O envelhecimento altera as respostas ventilatória e metabólicas frente à hipóxia

A resposta à hipóxia com 7% O₂ também provoca aumento da V_E em ambos os grupos, porém, no grupo senil esse aumento é discreto comparado ao grupo jovem. Em condições hipóxicas, a idade é determinante para a redução da frequência respiratória e aumento do volume corrente no grupo senil, diferentemente do que acontece no grupo jovem na mesma condição, onde há aumento da fR sem aumentar V_T. Os resultados de V_E e fR de fêmeas jovens em hipóxia corroboram com Marques e colaboradores (2015) e com os parâmetros avaliados por Wenninger e colaboradores (2009) em estudos com fêmeas Fisher 344 jovens (3-4 meses), meia-idade (12-13 meses) e senis (20 ou mais meses), durante estímulo hipercápnico (7%CO₂) e hipóxico (12%O₂).

Contrariamente ao descrito por Wenninger e colaboradores (2009), este estudo aponta que a idade exerce influência sobre o controle respiratório e metabólico em condições hipóxicas, pois reduz VO₂, aumenta V_E e V_E/VO₂, causando hiperventilação, e reduz a temperatura corporal. Da mesma forma como observado nas fêmeas jovens e senis, Haouzi e colaboradores (2009), também verificaram aumento da fR e de V_E/VO₂ durante hipóxia.

A microinjeção de NA provoca respostas hipotérmicas mediadas por 1-adrenoceptores no POA rostromedial (OSAKA, 2009; 2011). Animais em PE possuem maior atividade noradrenergica no LC e maior liberação de NA na POA (NICOLA; LEITE; NISHIKAVA; DE CASTRO *et al.*, 2016), o que causa resposta hipotérmica menos acentuada em comparação às fêmeas RC. Diferentemente do observado em estudos com ratos recém-nascidos (HICHRI; LAURIN; JULIEN; JOSEPH *et al.*, 2012; LEFTER; MORENCY;

JOSEPH, 2007) e em desenvolvimento (BAIRAM; LUMBROSO; JOSEPH, 2013) a progesterona não aumenta a resposta ventilatória hipóxica em fêmeas PE e, contrariamente ao que ocorre durante o desenvolvimento (BAIRAM; LUMBROSO; JOSEPH, 2013) aumenta a taxa metabólica na fase adulta de fêmeas, reduzindo-a com o envelhecimento.

6.3. O envelhecimento afeta a resposta comportamental ao pânico provocado por 7% de O₂.

O envelhecimento aumenta significativamente o número de corrida e o tempo de freezing diante do estímulo panicogênico por 7% de O₂, similarmente ao observado por Spiacci e colaboradores (2018), que demonstraram o comportamento de fuga à hipóxia em ratos. Neste estudo verificou-se que fêmeas cíclicas em diestro e em periestro-pausa não respondem sensivelmente ao comportamento de jumping diante de desafio hipóxico 7% O₂, como apontado nos estudos de Spiacci (2018), Batistela (2021), Lovick (2021) e Ferreira-Sgobbi (2022), embora as fêmeas cíclicas em diestro, apresentem baixas concentrações dos esteroides ovarianos. Além disso, foi demonstrado por Kumari e colaboradores (2020) que a hipóxia grave (PO₂ = 59 mmHg) provoca comportamento ansioso em ratos. Contudo, o período de periestro-pausa se mostra mais responsivo aos comportamentos ansiosos de freezing e running, uma vez que neste período a concentração plasmática de progesterona ainda se mantém alta (NICOLA; FERREIRA; MATA; VILHENA-FRANCO *et al.*, 2021), e colabora positivamente para o aumento da ansiedade em mulheres na fase lútea (NILLNI; ROHAN; ZVOLENSKY, 2012).

6.4. Concentrações plasmáticas de P₄ x resposta ventilatória e metabólica

É bem estabelecido que as concentrações plasmáticas de P₄ aumentam significativamente e que as concentrações de E₂ começam a reduzir durante a periestro-pausa (NICOLA; FERREIRA; MATA; VILHENA-FRANCO *et al.*, 2021; NICOLA; LEITE; NISHIKAVA; DE CASTRO *et al.*, 2016). A mensuração das concentrações plasmáticas destes esteroides após estímulo hipercápnico ou hipóxico permitem verificar que estes estímulos não são capazes de alterar estas concentrações durante a fase do diestro em fêmeas cíclicas e na fase de periestro-pausa, e, portanto, não provocam resposta imediata sobre

núcleos hipotalâmicos e as células adenohipofisárias controladoras do ciclo ovariano.

Observa-se ainda que as altas concentrações plasmáticas de P₄ em animais PE provocam resposta ventilatória hipercápnic e hipóxic menos acentuada em relação à resposta observada em animais RC.

Referências Bibliográficas (retiradas do relatório até a 67)

1. ANGELOVA, D. M.; BROWN, D. R. Microglia and the aging brain: are senescent microglia the key to neurodegeneration? **J Neurochem**, 151, n. 6, p. 676-688, 12 2019.
2. ARAI, H.; KOSAKA, K.; IIZUKA, R. Changes of biogenic amines and their metabolites in postmortem brains from patients with Alzheimer-type dementia. **J Neurochem**, 43, n. 2, p. 388-393, Aug 1984.
3. BAIRAM, A.; LUMBROSO, D.; JOSEPH, V. Effect of progesterone on respiratory response to moderate hypoxia and apnea frequency in developing rats. **Respir Physiol Neurobiol**, 185, n. 3, p. 515-525, Feb 1 2013.
4. BARTH, C.; VILLRINGER, A.; SACHER, J. Sex hormones affect neurotransmitters and shape the adult female brain during hormonal transition periods. **Front Neurosci**, 9, p. 37, 2015.
5. BATISTELA, M. F.; VILELA-COSTA, H. H.; FRIAS, A. T.; HERNANDES, P. M. *et al.* Enhanced responsiveness to hypoxic panicogenic challenge in female rats in late diestrus is suppressed by short-term, low-dose fluoxetine: Involvement of the dorsal raphe nucleus and the dorsal periaqueductal gray. **J Psychopharmacol**, 35, n. 12, p. 1523-1535, Dec 2021.
6. BEHAN, M.; KINKEAD, R. Neuronal control of breathing: sex and stress hormones. **Compr Physiol**, 1, n. 4, p. 2101-2139, Oct 2011.
7. BELLANTI, F.; MATTEO, M.; ROLLO, T.; DE ROSARIO, F. *et al.* Sex hormones modulate circulating antioxidant enzymes: impact of estrogen therapy. **Redox Biol**, 1, p. 340-346, 2013.
8. BETTS, M. J.; KIRILINA, E.; OTADUY, M. C. G.; IVANOV, D. *et al.* Locus coeruleus imaging as a biomarker for noradrenergic dysfunction in neurodegenerative diseases. **Brain**, 142, n. 9, p. 2558-2571, Sep 1 2019.
9. BIAGIONI, A. F.; DOS ANJOS-GARCIA, T.; ULLAH, F.; FISHER, I. R. *et al.* Neuroethological validation of an experimental apparatus to evaluate oriented and non-oriented escape behaviours: Comparison between the polygonal arena with a burrow and the circular enclosure of an open-field test. **Behavioural Brain Research**, 298, p. 65-77, Feb 1 2016.
10. BIANCARDI, V.; BICEGO, K. C.; ALMEIDA, M. C.; GARGAGLIONI, L. H. Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO₂ drive to breathing. **Pflugers Arch**, 455, n. 6, p. 1119-1128, Mar 2008.
11. BRINTON, R. D.; YAO, J.; YIN, F.; MACK, W. J. *et al.* Perimenopause as a neurological transition state. **Nat Rev Endocrinol**, 11, n. 7, p. 393-405, Jul 2015.
12. BROWN, D. R. Role of microglia in age-related changes to the nervous system. **ScientificWorldJournal**, 9, p. 1061-1071, Oct 02 2009.
13. BUSTAMANTE-BARRIENTOS, F. A.; MENDEZ-RUETTE, M.; ORTLOFF, A.; LUZ-CRAWFORD, P. *et al.* The Impact of Estrogen and Estrogen-Like Molecules in Neurogenesis and Neurodegeneration: Beneficial or Harmful? **Front Cell Neurosci**, 15, p. 636176, 2021.

14. CHEN, G.; WANG, X.; ZHANG, S.; XU, X. *et al.* In vivo investigation on bio-markers of perimenopausal panic disorder and catgut embedding acupoints mechanism. **Medicine (Baltimore)**, 99, n. 19, p. e19909, May 2020.
15. CHHIBBER, A.; WOODY, S. K.; KARIM RUMI, M. A.; SOARES, M. J. *et al.* Estrogen receptor beta deficiency impairs BDNF-5-HT2A signaling in the hippocampus of female brain: A possible mechanism for menopausal depression. **Psychoneuroendocrinology**, 82, p. 107-116, Aug 2017.
16. CHOI, S.; GUO, L.; CORDEIRO, M. F. Retinal and Brain Microglia in Multiple Sclerosis and Neurodegeneration. **Cells**, 10, n. 6, Jun 15 2021.
17. COHEN, J.; TORRES, C. Astrocyte senescence: Evidence and significance. **Aging Cell**, 18, n. 3, p. e12937, 06 2019.
18. CRAIN, J. M.; NIKODEMOVA, M.; WATTERS, J. J. Expression of P2 nucleotide receptors varies with age and sex in murine brain microglia. **J Neuroinflammation**, 6, p. 24, Aug 25 2009.
19. CRAIN, J. M.; NIKODEMOVA, M.; WATTERS, J. J. Microglia express distinct M1 and M2 phenotypic markers in the postnatal and adult central nervous system in male and female mice. **J Neurosci Res**, 91, n. 9, p. 1143-1151, Sep 2013.
20. DE CARVALHO, D.; PATRONE, L. G.; TAXINI, C. L.; BIANCARDI, V. *et al.* Neurochemical and electrical modulation of the locus coeruleus: contribution to CO₂ drive to breathe. **Front Physiol**, 5, p. 288, 2014.
21. DIAZ BRINTON, R. Minireview: translational animal models of human menopause: challenges and emerging opportunities. **Endocrinology**, 153, n. 8, p. 3571-3578, Aug 2012.
22. DOMINQUINI-MORAES, B.; BERNARDES-RIBEIRO, M.; PATRONE, L. G. A.; FONSECA, E. M. *et al.* Impact of the estrous cycle on brain monoamines and behavioral and respiratory responses to CO₂ in mice. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, 477, n. 3, p. 349-369, 2025/03/01 2025.
23. FARLEY, I. J.; HORNYKIEWICZ, O. Noradrenaline distribution in subcortical areas of the human brain. **Brain Res**, 126, n. 1, p. 53-62, Apr 22 1977.
24. FERREIRA-SGOBBI, R.; DE FIGUEIREDO, R. M.; FRIAS, A. T.; MATTHIESEN, M. *et al.* Panic-like responses of female Wistar rats confronted by *Bothrops alternatus* pit vipers, or exposure to acute hypoxia: Effect of oestrous cycle. **Eur J Neurosci**, 55, n. 1, p. 32-48, Jan 2022.
25. FERREIRA, L. B.; DE NICOLA, A. C.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; DORNELLES, R. C. Activity of neurons in the preoptic area and their participation in reproductive senescence: Preliminary findings. **Exp Gerontol**, 72, p. 157-161, Dec 2015.
26. FILOSA, J. A.; DEAN, J. B.; PUTNAM, R. W. Role of intracellular and extracellular pH in the chemosensitive response of rat locus coeruleus neurones. **J Physiol**, 541, n. Pt 2, p. 493-509, Jun 01 2002.
27. GARGAGLIONI, L. H.; HARTZLER, L. K.; PUTNAM, R. W. The locus coeruleus and central chemosensitivity. **Respir Physiol Neurobiol**, 173, n. 3, p. 264-273, Oct 31 2010.
28. GEORGE PAXINOS, C. W. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. **Elsevier/Academic**, p. 340, 2009.
29. GERMAN, D. C.; MANAYE, K. F.; WHITE, C. L.; WOODWARD, D. J. *et al.* Disease-specific patterns of locus coeruleus cell loss. **Ann Neurol**, 32, n. 5, p. 667-676, Nov 1992.
30. GRIEBEL, G.; PERRAULT, G.; SANGER, D. J. Behavioural profiles of the reversible monoamine-oxidase-A inhibitors befloxatone and moclobemide in an experimental model for screening anxiolytic and anti-panic drugs. **Psychopharmacology**, 131, n. 2, p. 180-186, May 1997.

31. GRUDZIEN, A.; SHAW, P.; WEINTRAUB, S.; BIGIO, E. *et al.* Locus coeruleus neurofibrillary degeneration in aging, mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, 28, n. 3, p. 327-335, Mar 2007.
32. HAOUZI, P.; BELL, H. J.; NOTET, V.; BIHAIN, B. Comparison of the metabolic and ventilatory response to hypoxia and H₂S in unsedated mice and rats. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, 167, n. 3, p. 316-322, 2009/07/31/ 2009.
33. HARLOW, S. D.; GASS, M.; HALL, J. E.; LOBO, R. *et al.* Executive summary of the Stages of Reproductive Aging Workshop +10: addressing the unfinished agenda of staging reproductive aging. **Climacteric**, 15, n. 2, p. 105-114, Apr 2012.
34. HARRY, G. J. Microglia during development and aging. **Pharmacol Ther**, 139, n. 3, p. 313-326, Sep 2013.
35. HENEKA, M. T.; NADRIGNY, F.; REGEN, T.; MARTINEZ-HERNANDEZ, A. *et al.* Locus ceruleus controls Alzheimer's disease pathology by modulating microglial functions through norepinephrine. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 107, n. 13, p. 6058-6063, Mar 30 2010.
36. HICHRI, O.; LAURIN, J. C.; JULIEN, C. A.; JOSEPH, V. *et al.* Dose dependent effect of progesterone on hypoxic ventilatory response in newborn rats. **Adv Exp Med Biol**, 758, p. 43-48, 2012.
37. HOLLEY, H. S.; BEHAN, M.; WENNINGER, J. M. Age and sex differences in the ventilatory response to hypoxia and hypercapnia in awake neonatal, pre-pubertal and young adult rats. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, 180, n. 1, p. 79-87, 2012/01/15/ 2012.
38. HOLTZMAN, D.; ULRICH, J. Senescent glia spell trouble in Alzheimer's disease. **Nat Neurosci**, 22, n. 5, p. 683-684, May 2019.
39. JACOBS, H. I. L.; RIPHAGEN, J. M.; RAMAKERS, I.; VERHEY, F. R. J. Alzheimer's disease pathology: pathways between central norepinephrine activity, memory, and neuropsychiatric symptoms. **Mol Psychiatry**, 26, n. 3, p. 897-906, Mar 2021.
40. KULKARNI, J. Perimenopausal depression - an under-recognised entity. **Aust Prescr**, 41, n. 6, p. 183-185, Dec 2018.
41. KUMARI, P.; WADHWA, M.; CHAUHAN, G.; ALAM, S. *et al.* Hypobaric hypoxia induced fear and extinction memory impairment and effect of Ginkgo biloba in its amelioration: Behavioral, neurochemical and molecular correlates. **Behav Brain Res**, 387, p. 112595, Jun 1 2020.
42. LEFTER, R.; MORENCY, C. E.; JOSEPH, V. Progesterone increases hypoxic ventilatory response and reduces apneas in newborn rats. **Respir Physiol Neurobiol**, 156, n. 1, p. 9-16, Apr 16 2007.
43. LIU, K. Y.; ACOSTA-CABRONERO, J.; CARDENAS-BLANCO, A.; LOANE, C. *et al.* In vivo visualization of age-related differences in the locus coeruleus. **Neurobiol Aging**, 74, p. 101-111, Feb 2019.
44. LIU, K. Y.; KIEVIT, R. A.; TSVETANOV, K. A.; BETTS, M. J. *et al.* Noradrenergic-dependent functions are associated with age-related locus coeruleus signal intensity differences. **Nat Commun**, 11, n. 1, p. 1712, 04 06 2020.
45. LOESCHCKE, H. H. Central chemosensitivity and the reaction theory. **J Physiol**, 332, p. 1-24, Nov 1982.
46. LONG, J. A.; EVANS, H. M. **The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena.** Berkeley: University of California Press, 1922. 148 p. (Memoirs of the University of California.
47. LOVICK, T. A.; ZANGROSSI, H., Jr. Effect of Estrous Cycle on Behavior of Females in Rodent Tests of Anxiety. **Front Psychiatry**, 12, p. 711065, 2021.
48. LUO, X. G.; CHEN, S. D. The changing phenotype of microglia from homeostasis to disease. **Transl Neurodegener**, 1, n. 1, p. 9, Apr 24 2012.

49. MARCOUILLER, F.; BOUKARI, R.; LAOUAFA, S.; LAVOIE, R. *et al.* The nuclear progesterone receptor reduces post-sigh apneas during sleep and increases the ventilatory response to hypercapnia in adult female mice. **PLoS One**, 9, n. 6, p. e100421, 2014.
50. MARQUES, D. A.; DE CARVALHO, D.; DA SILVA, G. S.; SZAWKA, R. E. *et al.* Ventilatory, metabolic, and thermal responses to hypercapnia in female rats: effects of estrous cycle, ovariectomy, and hormonal replacement. **J Appl Physiol (1985)**, 119, n. 1, p. 61-68, Jul 01 2015.
51. MARQUES, D. A.; GARGAGLIONI, L. H.; JOSEPH, V.; BRETZNER, F. *et al.* Impact of ovariectomy and CO(2) inhalation on microglia morphology in select brainstem and hypothalamic areas regulating breathing in female rats. **Brain Res**, 1756, p. 147276, Apr 1 2021.
52. MARQUES, D. A.; GARGAGLIONI, L. H.; JOSEPH, V.; BRETZNER, F. *et al.* Impact of ovariectomy and CO. **Brain Res**, 1756, p. 147276, 04 01 2021.
53. MATHER, M.; HARLEY, C. W. The Locus Coeruleus: Essential for Maintaining Cognitive Function and the Aging Brain. **Trends Cogn Sci**, 20, n. 3, p. 214-226, Mar 2016.
54. MATTHEWS, K. L.; CHEN, C. P.; ESIRI, M. M.; KEENE, J. *et al.* Noradrenergic changes, aggressive behavior, and cognition in patients with dementia. **Biol Psychiatry**, 51, n. 5, p. 407-416, Mar 01 2002.
55. MCCLURE, R. E.; BARHA, C. K.; GALEA, L. A. 17beta-Estradiol, but not estrone, increases the survival and activation of new neurons in the hippocampus in response to spatial memory in adult female rats. **Horm Behav**, 63, n. 1, p. 144-157, Jan 2013.
56. MCEWEN, B. S. Endocrine effects on the brain and their relationship to behavior. p. Molecular, Cellular, And Medical Aspects, Fourth Edition Xix+984p Raven Press Ltd : New York, New York, Usa Illus 893-914, 01/01 1989.
57. MITCHELL, R. A.; LOESCHCKE, H. H.; MASSION, W. H.; SEVERINGHAUS, J. W. Respiratory responses mediated through superficial chemosensitive areas on the medulla. **J Appl Physiol (1985)**, 18, n. 3, p. 523-533, May 01 1963.
58. MOORTHY, K.; SHARMA, D.; BASIR, S. F.; BAQUER, N. Z. Administration of estradiol and progesterone modulate the activities of antioxidant enzyme and aminotransferases in naturally menopausal rats. **Exp Gerontol**, 40, n. 4, p. 295-302, Apr 2005.
59. MORTOLA, J. P. Breathing pattern in newborns. **J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol**, 56, n. 6, p. 1533-1540, Jun 1984.
60. MULKEY, D. K.; STORNETTA, R. L.; WESTON, M. C.; SIMMONS, J. R. *et al.* Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. **Nat Neurosci**, 7, n. 12, p. 1360-1369, Dec 2004.
61. NATTIE, E. E.; LI, A. Substance P-saporin lesion of neurons with NK1 receptors in one chemoreceptor site in rats decreases ventilation and chemosensitivity. **J Physiol**, 544, n. 2, p. 603-616, 10 15 2002.
62. NICOLA, A. C.; FERREIRA, L. B.; MATA, M. M.; VILHENA-FRANCO, T. *et al.* Vasopressinergic Activity of the Suprachiasmatic Nucleus and mRNA Expression of Clock Genes in the Hypothalamus-Pituitary-Gonadal Axis in Female Aging. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 12, p. 652733, 2021.
63. NICOLA, A. C.; LEITE, C. M.; NISHIKAVA, M. M.; DE CASTRO, J. C. *et al.* The transition to reproductive senescence is characterized by increase in A6 and AVPV neuron activity with attenuation of noradrenaline content. **Exp Gerontol**, 81, p. 19-27, 08 2016.
64. NILLNI, Y. I.; ROHAN, K. J.; ZVOLENSKY, M. J. The role of menstrual cycle phase and anxiety sensitivity in catastrophic misinterpretation of physical symptoms during a CO(2) challenge. **Arch Womens Ment Health**, 15, n. 6, p. 413-422, Dec 2012.
65. NISSEN, J. C. Microglial Function across the Spectrum of Age and Gender. **Int J Mol Sci**, 18, n. 3, Mar 04 2017.

66. OSAKA, T. Heat loss responses and blockade of prostaglandin E2-induced thermogenesis elicited by alpha1-adrenergic activation in the rostromedial preoptic area. **Neuroscience**, 162, n. 4, p. 1420-1428, Sep 15 2009.
67. OSAKA, T. Hypoxia-induced hypothermia mediated by noradrenaline and nitric oxide in the rostromedial preoptic area. **Neuroscience**, 179, p. 170-178, Apr 14 2011.
68. PAGANINI-HILL, A.; HENDERSON, V. W. Estrogen deficiency and risk of Alzheimer's disease in women. **Am J Epidemiol**, 140, n. 3, p. 256-261, Aug 1 1994.
69. PATRONE, L. G. A.; BIANCARDI, V.; MARQUES, D. A.; BICEGO, K. C. *et al.* Brainstem catecholaminergic neurones and breathing control during postnatal development in male and female rats. **J Physiol**, 596, n. 15, p. 3299-3325, Aug 2018.
70. PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. Elsevier/Academic, 2009. 9780123748768.
71. PINCETI, E.; SHULTS, C. L.; RAO, Y. S.; PAK, T. R. Differential Effects of E2 on MAPK Activity in the Brain and Heart of Aged Female Rats. **PLoS One**, 11, n. 8, p. e0160276, 2016.
72. PRESTON, M. E.; JENSEN, D.; JANSSEN, I.; FISHER, J. T. Effect of menopause on the chemical control of breathing and its relationship with acid-base status. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 296, n. 3, p. R722-727, Mar 2009.
73. SCHLAEFKE, M. E. Central chemosensitivity: a respiratory drive. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, 90, p. 171-244, 1981.
74. SCHMIDT, P. J.; NIEMAN, L. K.; DANACEAU, M. A.; ADAMS, L. F. *et al.* Differential behavioral effects of gonadal steroids in women with and in those without premenstrual syndrome. **N Engl J Med**, 338, n. 4, p. 209-216, Jan 22 1998.
75. SHANSKY, R. M. Sex differences in PTSD resilience and susceptibility: Challenges for animal models of fear learning. **Neurobiol Stress**, 1, p. 60-65, Jan 2015.
76. SILVA, T. M.; CHAAR, L. J.; SILVA, R. C.; TAKAKURA, A. C. *et al.* Minocycline alters expression of inflammatory markers in autonomic brain areas and ventilatory responses induced by acute hypoxia. **Exp Physiol**, 103, n. 6, p. 884-895, 06 2018.
77. SOHRABJI, F.; WILLIAMS, M. Stroke neuroprotection: oestrogen and insulin-like growth factor-1 interactions and the role of microglia. **J Neuroendocrinol**, 25, n. 11, p. 1173-1181, Nov 2013.
78. SPIACCI, A., Jr.; VILELA-COSTA, H. H.; SANT'ANA, A. B.; FERNANDES, G. G. *et al.* Panic-like escape response elicited in mice by exposure to CO₂, but not hypoxia. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 81, p. 178-186, Feb 2 2018.
79. SPITTAU, B. Aging Microglia-Phenotypes, Functions and Implications for Age-Related Neurodegenerative Diseases. **Front Aging Neurosci**, 9, p. 194, 2017.
80. STOWELL, R. D.; SIPE, G. O.; DAWES, R. P.; BATCHELOR, H. N. *et al.* Noradrenergic signaling in the wakeful state inhibits microglial surveillance and synaptic plasticity in the mouse visual cortex. **Nat Neurosci**, 22, n. 11, p. 1782-1792, 11 2019.
81. VERDONK, F.; ROUX, P.; FLAMANT, P.; FIETTE, L. *et al.* Phenotypic clustering: a novel method for microglial morphology analysis. **J Neuroinflammation**, 13, n. 1, p. 153, Jun 17 2016.
82. VERKHRATSKY, A.; RODRÍGUEZ, J. J.; PARPURA, V. Neuroglia in ageing and disease. **Cell Tissue Res**, 357, n. 2, p. 493-503, Aug 2014.
83. VICENTE, M. C.; DIAS, M. B.; FONSECA, E. M.; BÍCEGO, K. C. *et al.* Orexinergic system in the locus coeruleus modulates the CO₂ ventilatory response. **Pflugers Arch**, 468, n. 5, p. 763-774, 05 2016.
84. VILLA, A.; GELOSA, P.; CASTIGLIONI, L.; CIMINO, M. *et al.* Sex-Specific Features of Microglia from Adult Mice. **Cell Rep**, 23, n. 12, p. 3501-3511, 06 19 2018.
85. WEINSHENKER, D. Long Road to Ruin: Noradrenergic Dysfunction in Neurodegenerative Disease. **Trends Neurosci**, 41, n. 4, p. 211-223, 04 2018.

86. WENNINGER, J. M.; OLSON, E. B., Jr.; COTTER, C. J.; THOMAS, C. F. *et al.* Hypoxic and hypercapnic ventilatory responses in aging male vs. aging female rats. **J Appl Physiol (1985)**, 106, n. 5, p. 1522-1528, May 2009.
87. WINTER, A.; AHLBRAND, R.; NAIK, D.; SAH, R. Differential behavioral sensitivity to carbon dioxide (CO₂) inhalation in rats. **Neuroscience**, 346, p. 423-433, Mar 27 2017.
88. YORK, E. M.; BERNIER, L. P.; MACVICAR, B. A. Microglial modulation of neuronal activity in the healthy brain. **Dev Neurobiol**, 78, n. 6, p. 593-603, Jun 2018.