

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

Vitória Silva Oliveira

**CONTROLE DA VENTILAÇÃO EM RATAS WISTAR: efeito da progesterona
endógena e exógena na quimiorrecepção ao CO₂/pH**

Belo Horizonte
2025

Vitória Silva Oliveira

CONTROLE DA VENTILAÇÃO EM RATAS WISTAR: efeito da progesterona endógena e exógena na quimiorrecepção ao CO₂/pH

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Glauber dos Santos Ferreira da Silva

Belo Horizonte
2025

043 Oliveira, Vitória Silva.
Controle da ventilação em ratas Wistar: efeito da progesterona endógena e exógena na quimiorrecepção ao Co₂/PH [manuscrito] / Vitória Silva Oliveira. – 2025.
72 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Glauber dos Santos Ferreira da Silva.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Progesterona. 3. Progestinas. 4. Sistema Respiratório. 5. Hipercapnia. I. Silva, Glauber dos Santos Ferreira da. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISILOGIA E FARMACOLOGIA - SECRETARIA

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado N° 602 DE VITÓRIA SILVA OLIVEIRA

Às 14:00 horas do dia 18 do mês de março de 2025, na Sala Wilson Beraldo A4 175 - ICB/UFMG, Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-UFMG, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **Vitória Silva Oliveira**. A presidência da sessão coube ao **Prof. Dr. Glauber dos Santos Ferreira da Silva**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. Glauber dos Santos Ferreira da Silva**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Prof. Dr. Cleyton Roberto Sobrinho**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais e a **Dra. Kaoma Stephani da Costa Silva**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: "**CONTROLE DA VENTILAÇÃO EM RATAS Wistar: EFEITO DA PROGESTERONA ENDÓGENA E EXÓGENA NA QUIMIORECEPÇÃO AO CO₂/PH**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 18 de março de 2025.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Kaoma Stephani Da Costa Silva**, **Usuária Externa**, em 08/04/2025, às 18:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Glauber dos Santos Ferreira da Silva**, **Professor do Magistério Superior**, em 10/04/2025, às 16:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cleyton Roberto Sobrinho**, **Usuário Externo**, em 11/04/2025, às 12:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4057082** e o código CRC **C687D097**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA - SECRETARIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 602 DE VITÓRIA SILVA OLIVEIRA

**"CONTROLE DA VENTILAÇÃO EM RATAS WISTAR: EFEITO DA PROGESTERONA
ENDÓGENA E EXÓGENA NA QUIMIORRECEPÇÃO AO CO₂/PH"**

VITÓRIA SILVA OLIVEIRA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **18 de março de 2025**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

PROF. DR. GLAUBER DOS SANTOS FERREIRA DA SILVA - ORIENTADOR - ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROF. DR. CLEYTON ROBERTO SOBRINHO - ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

DRA. KAOMA STEPHANI DA COSTA SILVA - ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Belo Horizonte, 18 de março de 2025



Documento assinado eletronicamente por **Kaoma Stephani Da Costa Silva, Usuária Externa**, em 08/04/2025, às 18:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Glauber dos Santos Ferreira da Silva, Professor do Magistério Superior**, em 10/04/2025, às 16:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Cleyton Roberto Sobrinho, Usuário Externo**, em 11/04/2025, às 12:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4057085** e o código CRC **2F97A3D1**.

À Grace, pela dádiva da vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de existência e pelo amparo!

Agradeço à minha mãe, Grace, por fornecer o essencial para o meu crescimento e desenvolvimento e também por demonstrar que é necessário ser forte.

Ao meu orientador, prof. Glauber, pela paciência e confiança, por proporcionar uma experiência incrível com a pesquisa e pelo conhecimento exímio que me faz querer continuar no caminho pela busca do conhecimento.

Ao Willer pelo companheirismo, dedicação e apoio.

A minha família e amigos que tanto fizeram para colaborar com a minha caminhada.

Aos meus colegas de trabalho pela companhia e apoio durante o desenvolvimento da pesquisa.

As agências de fomento: CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo suporte financeiro à pesquisa na forma de bolsa de Mestrado. O presente trabalho foi realizado com apoio da CAPES – Código de Financiamento 001. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

We breathe no matter what.

(Jack L Feldman, 2003)

RESUMO

A progesterona (P4) possui ação estimulante do sistema respiratório, sendo esta ação verificada, mediada pelo receptor de progesterona (PR). Além disso, o estradiol (E2) é capaz de induzir a formação de receptores de progesterona potencializando seu efeito. Existem diferenças biológicas e farmacocinéticas entre a P4 natural e a sintética (PS) devido às diferentes fórmulas químicas, apesar dessas diferenças, a PS também é capaz de atuar com ação estimulante no sistema respiratório. Straus et al. em 2010 demonstraram a recuperação parcial da quimiossensibilidade em duas mulheres com a Síndrome da Hipoventilação Central Congênita (CCHS) que fizeram uso da PS desogestrel. Assim, a P4 natural e sintética possuem ação no sistema respiratório. O trabalho de Straus et al. teve grande relevância por demonstrar a PS como uma possível medida de tratamento para a CCHS, síndrome causada por uma mutação no gene PHOX2B, caracterizada por hipoventilação central devido a respostas ventilatórias reduzidas ou ausentes à hipercapnia. No entanto, o estudo sobre os efeitos da P4 e da PS em animais in vivo não anestesiados ainda são escassos. Dessa maneira, a nossa hipótese é de que a reposição hormonal com P4 ou PS aumente a resposta ventilatória à hipercapnia. Obtivemos medidas ventilatórias por pletismografia de corpo inteiro em quatro condições com oscilações de progesterona: durante o ciclo estral, pseudoprenhez, reposição da P4 em animais ovariectomizados e com o uso da PS ETOnogestrel (ETO), metabólito do desogestrel. Nossos resultados mostraram que o aumento endógeno da P4 não pode alterar a resposta ventilatória. No entanto, em ratas ovariectomizadas com reposição da P4 e E2 ($\% \dot{V}_E$ 309,9±19,6) e em ratas intactas com a reposição de ETO e E2 ($\% \dot{V}_E$ 294,8±17,7) ocorreu um aumento da resposta ventilatória à hipercapnia ($p < 0,05$), sugerindo que ambas as substituições hormonais modulam uma resposta excitatória dos ajustes respiratórios à hipercapnia.

Palavras-chave: progesterona; progestina; quimiorrecepção central; controle respiratório; ventilação.

ABSTRACT

Progesterone (P4) has a stimulating action on the respiratory system, and this action is verified, mediated by the progesterone receptor. In addition, estradiol (E2) is able to induce the formation of progesterone receptors, enhancing its effect. There are biological and pharmacokinetic differences between natural and synthetic (PS) P4 due to the different chemical formulas, despite these differences, PS is also capable of acting with a stimulating action on the respiratory system. Straus et al. in 2010 demonstrated partial recovery of chemosensitivity in two women with Congenital Central Hypoventilation Syndrome (CCHS) who used desogestrel a PS. Thus, natural and synthetic P4 have an action on the respiratory system. The study by Straus et al. was of great relevance because it demonstrated PS as a possible treatment measure for CCHS, a syndrome caused by a mutation in the PHOX2B gene, characterized by central hypoventilation due to reduced or absent ventilatory responses to hypercapnia. However, studies on the effects of P4 and PS on non-anesthetized in vivo animals are still scarce. Thus, our hypothesis is that hormone replacement with P4 or PS increases the ventilatory response to hypercapnia. Ventilatory measures were obtained by whole-body plethysmography in four conditions with progesterone oscillations: during the estrous cycle, pseudopregnancy, P4 replacement in ovariectomized animals, and with the use of PS ETONogestrel (ETO), a metabolite of desogestrel. Our results showed that endogenous increase in P4 cannot alter the ventilatory response. However, in ovariectomized rats with P4 and E2 replacement ($\% \dot{V}E$ 309.9 ± 19.6) and in intact rats with ETO and E2 replacement ($\% \dot{V}E$ 294.8 ± 17.7) there was an increase in the ventilatory response to hypercapnia ($p < 0.05$), suggesting that both hormone replacements modulate an excitatory response of respiratory adjustments to hypercapnia.

Keywords: progesterone; progestin; central chemoreception; respiratory control; ventilation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema para as vias de sinalização da progesterona	26
Figura 2. Coleta do esfregaço vaginal	37
Figura 3. Fases do ciclo estral	38
Figura 4. Indução da pseudoprenhez	38

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Concentração da progesterona e estradiol durante o ciclo estral	30
Gráfico 2. Concentração da progesterona durante a prenhez e pseudoprenhez	31
Gráfico 3. Resposta ventilatória de ratas Wistar durante as fases do ciclo estral	44
Gráfico 4. Resposta ventilatória de ratas Wistar em porcentagem durante a hipercapnia em diferentes fases do ciclo estral	45
Gráfico 5. Relação ventilação/consumo de O ₂ ; metabolismo e temperatura de ratas Wistar durante diferentes fases do ciclo estral	46
Gráfico 6. Resposta ventilatória de ratas Wistar durante a pseudoprenhez	47
Gráfico 7. Resposta ventilatória de ratas Wistar em porcentagem durante a hipercapnia ao longo da pseudoprenhez	48
Gráfico 8. Relação ventilação/consumo de O ₂ , metabolismo e temperatura de ratas Wistar durante a pseudoprenhez	49
Gráfico 9. Concentração de progesterona plasmática no PP9	49
Gráfico 10. Peso do útero de ratas Wistar tratadas com E2	50
Gráfico 11. Resposta ventilatória de ratas Wistar em ar ambiente em diferentes condições hormonais	51
Gráfico 12. Resposta ventilatória de ratas Wistar em porcentagem durante a hipercapnia em diferentes condições hormonais	52
Gráfico 13. Relação ventilação/consumo de O ₂ , metabolismo e temperatura de ratas Wistar em diferentes condições hormonais	52
Gráfico 14. Figura representativa das fases do ciclo estral durante 21 dias	53
Gráfico 15. Resposta ventilatória de ratas Wistar tratadas com ETO	56
Gráfico 16. Resposta ventilatória em porcentagem durante a hipercapnia de ratas Wistar tratadas com ETO	57
Gráfico 17. Relação ventilação/consumo de O ₂ , metabolismo e temperatura de ratas Wistar durante a hipercapnia em diferentes concentrações do ETO	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros ventilatórios em ar ambiente: ciclo estral	45
Tabela 2. Parâmetros ventilatórios em ar ambiente: pseudoprenhez	48
Tabela 3. Tabela esquemática da variação do ciclo estral dos animais controle	54
Tabela 4. Tabela esquemática da variação do ciclo estral dos animais tratados com a dose 0,25µg/0,1ml/animal	54
Tabela 5. Tabela esquemática da variação do ciclo estral dos animais tratados com a dose 2,5µg/0,1ml/animal	55
Tabela 6. Tabela esquemática da variação do ciclo estral dos animais tratados com a dose 25µg/0,1ml/animal	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP - Adenosina Trifosfato

BötC - Bötzinger

Ca²⁺ - Cálcio

CCHS - Síndrome da Hipoventilação Central Congênita

CO₂ - Dióxido de Carbono

cVRG - Grupo Respiratório Ventral caudal

DM - Diestro Manhã

DRG - Grupo Respiratório Dorsal

E2 - Estradiol

E-AUG - aumento da expiração

fR - Frequência Respiratória

FSH - Hormônio Folículo Estimulante

G1 - Grupo 1 (0,25µg/0,1 ml/animal 1 de ETONogestrel)

G2 - Grupo 2 (2,5µg/0,1ml/animal de ETONogestrel)

G3 - Grupo 3 (25µg/0,1ml/animal de ETONogestrel)

G4 - Grupo 4 (25µg/0,1ml/animal de ETONogestrel + E2)

GABA_A - Ácido Gama-Aminobutírico A

GC - Grupo Controle

GnRH - Hormônio Liberador de Gonadotrofina

GRP - Peptídeo Liberador de Gastrina

H⁺ - Hidrogênio

K⁺ - Potássio

KF - Kölliker-Fuse

LC - Locus Cereuleus

LH - Hormônio Luteinizante

mRNAs - Ácidos Ribonucleicos Mensageiros

nPR - Receptores Nucleares de Progesterona

NTS - Núcleo do Trato Solitário

O₂ - Oxigênio

P4 - Progesterona

PaCO₂ - Pressão Parcial de CO₂ Arterial

PaO₂ - Pressão Parcial de O₂ Arterial
PB - Complexo Parabraquial
pFRG - Núcleo Parafacial
pH - Concentração de Íons de Hidrogênio
PM - Proestro Manhã
pré-BötC - pré-Bötzinger
PRG - Grupo Respiratório Pontino
PR - Receptor de Progesterona
PS - Progesterona Sintética
PT - Proestro Tarde
RAR - Fibras Aferentes Adaptadoras de Estiramento Rápidas
RTN- Núcleo Retrotrapezóide
rVRG - Grupo Respiratório Ventral rostral
SAR - Fibras Aferentes Adaptadoras de Estiramento Lentas
SHBG - Hormônios Sexuais
SNC - Sistema Nervoso Central
SST - Somatostatina
TRH - Hormônio Liberador de Tireotropina
V̇E - Ventilação pulmonar
V̇O₂ - Consumo de Oxigênio
VRC - Coluna Ventral Respiratória
VRG - Grupo Respiratório Ventral
V_r - Volume Residual
V_T - Volume Corrente

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1. JUSTIFICATIVA	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Respiração	20
2.2 Progesterona	24
2.3 Ciclo hormonal, estral e a respiração	28
2.4 Pseudoprenhez	30
2.5 Síndrome da Hipoventilação Central Congênita (CCHS)	32
3. OBJETIVO	34
3.1 Objetivo geral	35
3.2 Objetivos específicos	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Animais	37
4.2 Esfregaço vaginal	37
4.3 Indução da pseudoprenhez	38
4.4 Coleta de sangue e ensaio para hormônio plasmático	39
4.5 Doses hormonais	39
4.6 Ovariectomia	39
4.7 Ventilação e temperatura	40
4.8 Protocolo experimental	40
4.8.1 Experimento 1: Caracterização da resposta ventilatória das ratas Wistar durante o ciclo estral	40
4.8.2 Experimento 2: Caracterização da resposta ventilatória à hipercapnia das ratas Wistar durante a pseudoprenhez induzida por estimulação cervical	41
4.8.3 Experimento 3: Avaliação do efeito da reposição hormonal de P4 e E2 na ventilação de ratas Wistar ovariectomizadas	41

4.8.4 Experimento 4: Avaliação do efeito do tratamento hormonal com ETO na ventilação de ratas Wistar	42
4.9 Análise	42
5. RESULTADOS	43
5.1 Ciclo estral e a resposta ventilatória ao CO ₂	44
5.2 Pseudoprenhez e a resposta ventilatória ao CO ₂	46
5.3 Estradiol promove aumento do peso do útero	50
5.4 Progesterona + estradiol aumentam a resposta ventilatória ao CO ₂	50
5.5 ETONogestrel em diferentes concentrações	53
5.6 ETONogestrel e estradiol aumentam a resposta ventilatória de fêmeas Wistar à hipercapnia	56
6. DISCUSSÃO	58
6.1 Ciclo estral e pseudoprenhez: ventilação, temperatura corporal e metabolismo em normocapnia e hipercapnia	59
6.2 Ovariectomia, reposição hormonal e ETONogestrel: ventilação, temperatura corporal e metabolismo em normocapnia e hipercapnia	61
6.3 Limitações e pontos fortes	63
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1. INTRODUÇÃO

1. JUSTIFICATIVA

O sistema respiratório é responsável primariamente pela troca gasosa, levando o oxigênio atmosférico e tornando-o disponível para as células do organismo (Greer; Funk, 2016). Este sistema de controle respiratório é complexo e robusto, capaz de gerar e manter o ritmo respiratório e alterar seu padrão para atender às diferentes demandas do organismo e à diferentes estímulos. Sugerido como um potencial estimulante respiratório, o hormônio progesterona (P4) foi reconhecido e estudado por seus efeitos no controle neural da respiração (Bayliss et al., 1987; Bayliss; Millhorn, 1992; Machida, 1981). Os efeitos da P4 foram reportados pela primeira vez em 1905, Hasselbalch; Gammeltoft (1915) relacionaram os efeitos da hiperventilação com as alterações hormonais ao notarem a redução da PaCO₂ durante a fase lútea e a gravidez. Machida et al. (1981), reforçaram os achados anteriores demonstrando a relação inversa entre a PaCO₂ e a concentração plasmática de progesterona em mulheres (Machida, 1981). Essas evidências apontaram para a P4 como um potencial hormônio capaz de estimular a resposta ventilatória ao CO₂, possibilitando a restauração da quimiossensibilidade ao CO₂/pH. Dessa maneira, a nossa hipótese é de que o aumento das concentrações de P4 de maneira endógena e a P4 aplicada, exógena, são capazes de aumentar a resposta ventilatória à hipercapnia.

Existem diferenças biológicas e farmacocinéticas entre a progesterona natural e a sintética (PS) devido às diferentes fórmulas químicas. Apesar da PS não possuir efeito neuroprotetor como a progesterona, esta não sofre efeitos de primeira passagem e possui baixa afinidade com a globulina de ligação (Schindler et al., 2003). Na literatura foi demonstrado que, a medroxiprogesterona, um análogo da progesterona, aumentou a ventilação em resposta à hipercapnia e hipóxia (Dempsey; Olson JR.; Skatrud, 2011; Zwillich et al., 1978). Além disso, Straus et al. em 2010 demonstraram a recuperação parcial da quimiossensibilidade em duas mulheres com a síndrome de Ondina que fizeram uso do contraceptivo desogestrel (Straus et al., 2010).

A Síndrome da Hipoventilação Central Congênita (CCHS), conhecida como a síndrome de Ondine, é uma condição caracterizada pela anormalidade do controle automático da ventilação pelo Sistema Nervoso Central (SNC) sem alterações pulmonares, cardiovasculares, neurológicas ou musculares (Trang et al., 2020; Weese-Mayer et al., 1993). Esta é causada tipicamente por uma mutação no gene PHOX2B que codifica um fator de transcrição expresso em neurônios centrais e periféricos envolvidos na quimiorrecepção respiratória (Amiel et al., 2003). Durante o estado de vigília, a ventilação do paciente, embora ainda comprometida, é adequada, enquanto que durante o sono é caracterizado por hipoventilação e apnéia severa,

requerendo muitas vezes, intervenção com ventilação mecânica que se deve à impossibilidade de realizar movimentos rítmicos involuntários durante a respiração (Trang et al., 2020).

Dessa forma, o aumento demonstrado da resposta ventilatória à hipercapnia com o uso da progestina, restabelecendo parcialmente a quimiorrecepção ao CO₂, em mulheres com a síndrome de Ondine, sugeriu o contraceptivo como um possível tratamento promissor. A nossa segunda hipótese é de que a progestina sozinha e combinada com o estradiol possa causar alteração da resposta ventilatória, indicando uma combinação excitatória.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Respiração

Responsável primariamente pela troca gasosa, o sistema respiratório torna o oxigênio atmosférico disponível para as células do organismo. Funções como fonação, defesa imunológica pulmonar, controle ácido-base e manutenção do metabolismo, também são exercidas pelo sistema respiratório, tornando-o um sistema crucial para manutenção da homeostase (Del Negro; Funk; Feldman, 2018; Greer; Funk, 2016). Os elementos necessários para que a respiração ocorra podem ser divididos em três grupos: elementos sensores, centro integrativo e efetores. Elementos sensores são responsáveis por monitorar variáveis relevantes para o sistema respiratório, tais como quimiossensores e mecano-sensores, e enviar as informações até o centro integrativo (Greer; Funk, 2016). O centro integrativo permite adaptações às mudanças no metabolismo, ambiente e às demandas do comportamento, é uma complexa rede de integração localizada no SNC (Ramirez; Baertsch, 2018). Os músculos respiratórios atuam como elementos efetores, ou seja, recebem informações eferentes motoras e executam tais informações (Greer; Funk, 2016).

O monitoramento dos níveis dos gases é essencial para que os sistemas permaneçam em homeostase, sensores específicos são responsáveis pela percepção e resposta às variações dos níveis de oxigênio (O_2), dióxido de carbono (CO_2) e hidrogênio (H^+). Os quimiorreceptores periféricos são responsáveis pela detecção de alterações dos gases no sangue e estão localizados no corpo carotídeo e aórtico, possuem células especializadas e sensíveis, Glomus ou tipo I, capazes de reconhecer principalmente baixa pressão parcial arterial de O_2 (PaO_2) (Lahiri et al., 2006). Existem duas hipóteses com suporte literário sobre como ocorre a resposta das células glomus. A primeira é a hipótese mitocondrial, onde a queda da PaO_2 leva à despolarização da membrana mitocondrial e a liberação de cálcio do complexo mitocôndria-retículo endoplasmático. A segunda, baixos níveis de O_2 inibem a ativação de canais para potássio (K^+) sensíveis ao O_2 alterando o potencial de membrana e estimulando a abertura dos canais para cálcio (Ca^{2+}) que atuam estimulando a liberação de neurotransmissores, sendo os principais a acetilcolina e adenosina trifosfato (ATP). Esses sensores enviam informações através de sinapses excitatórias para regiões de controle central respiratório, principalmente para a região caudal do Núcleo do Trato Solitário (NTS) (Jia et al., 2022; Zoccal et al., 2014) e como feedback a ventilação aumenta, restaurando a PaO_2 com intuito de manter a homeostase.

Os quimiorreceptores centrais também são capazes de responder às alterações da PaCO₂ (Greer; Funk, 2016). Tem sido reportada na literatura a identificação de diversos locus responsáveis pela quimiorrecepção ao CO₂ que parecem funcionar de maneira dependente do estado de sono e vigília e do desenvolvimento com a mudança da idade. Com as evidências é possível citar os locus: NTS, hipotálamo lateral, rafe, Locus Ceruleus (LC) e Núcleo Retrotrapezoide (RTN) (Gargaglioni; Hartzler; Putnam, 2010; Iceman; Richerson; Harris, 2013; Nattie, 2001). Entretanto, o RTN se destaca e parece ser o maior responsável pela geração da resposta à hipercapnia. Os neurônios do RTN são capazes de aumentar sua taxa de disparo em resposta ao aumento da PaCO₂, são sensíveis à acidificação, possuem projeções para áreas importantes para o controle neural da respiração, além de que, a inibição por optogenética do RTN promove redução significativa da resposta à inalação do CO₂ (Janes et al., 2024)

A quimiorrecepção no RTN ocorre através de células especializadas no reconhecimento da pressão parcial de dióxido de carbono (PCO₂) e das concentrações de íons de hidrogênio (pH). O CO₂ se difunde através da barreira hematoencefálica dentro do fluido cerebrospinal, a hidratação e ionização do gás faz com que ocorra um aumento das concentrações dos íons H⁺ no fluido cerebrospinal causando uma redução do pH. Uma hipótese para a forma como ocorre a estimulação dos quimiorreceptores centrais no RTN é a de que este núcleo possui canais para K⁺ sensíveis à alteração do pH, assim, devido às alterações das concentrações dos íons H⁺, ocorre a abertura dos canais para K⁺ gerando a despolarização celular e conseqüentemente liberação de ATP. Dessa maneira, o aumento da PCO₂ leva como compensação a um aumento da ventilação. A resposta ventilatória ao CO₂ reduz com o passar do tempo devido à excreção renal de bicarbonato que reduz os íons H⁺ e conseqüentemente a ativação dos quimiorreceptores centrais. Importante mencionar que apesar da localização anatômica distinta dos quimiorreceptores centrais e periféricos, há evidências que sugerem uma interação sinérgica destes quimiorreceptores, no qual, a sensibilidade dos centrais pode ser alterada pelas aferências dos periféricos (Greer; Funk, 2016).

O centro integrativo localizado no tronco encefálico produz as três fases respiratórias: fase inspiratória, fase pós-inspiratória e expiração tardia (Ramirez; Baertsch, 2018; Smith et al., 2009). A variação e ajuste dessas três fases permite inspiração, a vocalização, a fala e a expiração ativa em casos de aumento da demanda ventilatória (Ramirez; Baertsch, 2018). A respiração é composta por ritmo e padrão que se diferenciam entre si. A frequência respiratória, em geral, é controlada pelos neurônios geradores de ritmo, enquanto que, o volume corrente, a ativação das vias aéreas superiores e de músculos é controlada pelos geradores do padrão respiratório (Ramirez; Baertsch, 2018). A Coluna Ventral Respiratória (VRC), localizada no

bulbo, é considerada a fonte para a geração do ritmo e padrão respiratório, esta é composta por quatro subnúcleos distintos: Complexo pré-Bötzing (pré-BötC); Complexo Bötzing (BötC); Grupo Respiratório Ventral Rostral (rVRG); e Grupo Respiratório Ventral Caudal (cVRG) (Smith et al., 1991, 2007).

A inspiração ocorre devido à atividade de neurônios geradores de ritmo localizados na VRC, no complexo pré-BötC (Feldman; Del Negro; Gray, 2013; Smith et al., 1991). Dois critérios são necessário para o estabelecimento de uma área geradora de ritmo: 1) ativação de um neurônio ou um grupo de neurônio em fase com o ritmo e 2) o(s) neurônio(s) precisam modificar o ritmo de uma maneira fase-dependente em resposta à um estímulo (Ramirez; Baertsch, 2018). Os neurônios do pré-BötC expressam receptores neurokinina-1, μ -opioide e somatostatina (SST), a característica de geração do ritmo advém de propriedades intrínsecas da membrana dos neurônios, tendo como alvo principal os neurônios glutamatérgicos que expressam neurokinina-1 (Lumb; Horner, 2013).

A inspiração ocorre de maneira ativa recrutando músculos para a sua efetivação, enquanto que, no padrão eupneico, a expiração ocorre de forma passiva na fase pós-inspiratória e na expiração tardia (Smith et al., 2013). Considerando que os neurônios do pré-BötC promovem a inspiração através da sua atividade ritmogênica, seria necessária a ocorrência da inibição desses neurônios para haver o relaxamento da musculatura inspiratória e consequente saída do ar. O complexo BötC é composto predominantemente por neurônios glicinérgicos que exercem atividade inibitória (Ezure; Tanaka; Kondo, 2003; Feldman; Del Negro; Gray, 2013). Dessa maneira, evidências apontam que os neurônios do BötC responsáveis pelo aumento da expiração (E-AUG) exercem extensa inibição dos neurônios inspiratórios (Ezure; Tanaka; Kondo, 2003). Apesar de não haver evidências na literatura que o BötC promove inputs excitatórios para motoneurônios expiratórios ou que são ritmogênicos, a sua atividade parece estar atrelada à expiração (Janczewski; Feldman, 2006). O pré-BötC ainda parece ser controlado por múltiplos drives excitatórios da ponte, RTN e Rafe (Smith et al., 2007), assim, os inputs pontinos modulam o padrão respiratório. A região pontina da respiração inclui ainda o núcleo Kölliker-Fuse (KF) e o complexo parabraquial (PB) na área dorsolateral, além de outras áreas da ponte ventrolateral (Alheid; Milsom; McCrimmon, 2004).

Outra área que possui característica ritmogênica, agora para a expiração ativa, é o núcleo parafacial (pFRG) (Feldman; Mitchell; Nattie, 2003). Em situações de aumento da demanda ventilatória a expiração se torna ativa recrutando a musculatura abdominal (Leirão et al., 2018; Pagliardini et al., 2011). A atividade dos neurônios do pFRG foi identificada quando o gerador do ritmo respiratório foi deprimido por um agonista μ -opioide e a atividade expiratória

permaneceu operacional (Janczewski; Feldman, 2006), assim, esses neurônios também são capazes de gerar ritmo. Dessa forma, a proposta é de que o pFRG interaja com o pré-BötC para gerar um padrão coordenado de atividade inspiratória e expiratória ativa.

Os elementos efetores recebem informações do centro integrativo para exercer a função da troca gasosa. Os movimentos que possibilitam a circulação do ar no sistema respiratório são gerados e regulados pelos músculos respiratórios, com destaque para o diafragma, principal músculo inspiratório. As alterações de volume da caixa torácica devido à ação da musculatura geram as diferenças de pressão que possibilitam o fluxo de ar. (Lumb; Horner, 2013). Os nervos motores respiratórios eferentes permitem a ativação muscular. O nervo frênico inerva o diafragma e seu núcleo motor está localizado na porção cervical da medula espinhal (C3-C6). Os nervos hipoglosso e laríngeo, os quais têm seus núcleos localizados respectivamente na porção dorsal do bulbo e corpos celulares localizados no núcleo ambíguo, são responsáveis respectivamente pela inervação da musculatura da língua e da laringe, tanto a abduzora (cricoaritenóide) quanto adutora (tireoaritenóide). A musculatura do abdome é inervada pelos nervos motores cujos núcleos se localizam na região tóraco lombar (T4-L3) da medula espinhal e a inervação dos músculos intercostais ocorre pelos nervos motores que estão localizados nos núcleos da região torácica (T1-T12) (Bianchi; Denavit-Saubié; Champagnat, 1995).

Três categorias de receptores são tipicamente identificados abaixo da laringe: fibras aferentes adaptadoras de estiramento lentas (SAR), rápidas (RAR) e fibras C. Mecanorreceptores pulmonares e das vias respiratórias são inervados por fibras aferentes mielinizadas, de rápida condução. São sensíveis aos aspectos estáticos e dinâmicos do volume pulmonar e pressão transmural. As SAR são comumente ativadas pela inflação pulmonar, enquanto que as RAR são ativadas normalmente por inalação de substâncias irritantes. As fibras C não são mielinizadas e são ativadas por deformação mecânica, estímulo químico, aumento de fluido intersticial ou aumento de temperatura (Kubin et al., 2006). Os reflexos dos mecanorreceptores são importantes para a proteção das vias aéreas e manutenção do tônus durante o sono. As aferências terminam principalmente nas porções medial e caudal do NTS.

Dessa maneira, os três elementos: sensores, centro integrativo e efetores, são capazes de gerar a respiração. A ativação dos músculos intercostais externos, escaleno e paraesternal, contração diafragmática e conseqüente aumento do volume da cavidade torácica permite a intensa entrada do ar pelas vias aéreas. Inicialmente o ar é filtrado, aquecido e umidificado, passa pela traquéia que se divide em brônquio principal esquerdo e direito que se ramificam sucessivamente da zona condutora até as zonas transicionais e respiratórias onde se encontram os sacos alveolares que acarretam a redução da velocidade do ar em função do número de

ramificações. Os vasos sanguíneos acompanham as ramificações no interior do pulmão e os capilares permitem a passagem de apenas um eritrócito se tornando um sistema extremamente eficiente para realizar as trocas gasosas. Assim, o ar é levado para o interior dos pulmões, onde as trocas gasosas ocorrem por processo de difusão, e então é expelido pelas mesmas vias.

2.2 Progesterona

Sintetizados nas gônadas, glândula adrenal, placenta, gordura abdominal subcutânea e no SNC (neuroesteroides), os hormônios esteróides são liberados no sistema circulatório (Birzniece et al., 2006). Cortisol, testosterona, estrogênio e progesterona estão presentes em machos e fêmeas (Behan; Kinkead, 2011). Entretanto, foi demonstrado que dentre os hormônios, a progesterona foi a única com ação estimulante do sistema respiratório, sendo esta ação verificada, mediada pelo receptor de progesterona (PR) (Bayliss et al., 1987; Bayliss; Millhorn, 1992; Dempsey; Olson Jr.; Skatrud, 2011). A progesterona exerce seus efeitos em diversos sistemas no corpo humano. No sistema reprodutor feminino participa do ciclo menstrual e mantém a gestação por meio de seus efeitos antiestrogênico e antiandrogênico; Nos ossos tem efeito estimulatório na secreção de calcitonina; No SNC possui efeito neuroprotetor por mecanismos imediatos e de longo prazo; Além dos efeitos em diversos outros sistemas, a característica lipofílica dos esteróides permite que estes tenham fácil acesso às células do organismo e atravessem a barreira hematoencefálica acessando populações neuronais de áreas responsáveis pela respiração (Bayliss; Millhorn, 1992).

O efeito da progesterona nos sistemas biológicos pode ocorrer de maneira genômica e não genômica (Boukari; Marcouiller; Joseph, 2015). Os efeitos da progesterona, de maneira genômica, ocorrem através da via clássica de sinalização mediada pelos receptores nucleares de progesterona (nPR) (nPR-A, nPR-B entre outros), as suas isoformas possuem diferentes promotores para gerar subclasses distintas de ácidos ribonucleicos mensageiros (mRNAs). Estes receptores estão localizados em núcleos hipotalâmicos, em áreas envolvidas no controle respiratório como NTS, nervo vago, nervo hipoglossos e locus ceruleus e também nos corpos carotídeos de ratos (Brinton et al., 2008; Helena et al., 2006; Romeo; Bellani; McEwen, 2005). A molécula lipofílica se difunde através da membrana celular e nuclear para se ligar aos receptores. Após a ligação aos nPR, ocorrem mudanças conformacionais e subsequentemente a ligação ao gene regulatório para iniciar a transcrição de genes responsivos à progesterona. Numerosos fatores de transcrição (AP1, SP1, STATs) estão envolvidos na ação do PR. A progesterona pode ainda exercer seus efeitos através da via não clássica que pode depender ou

não de regulação genômica e transcricional (Boukari; Marcouiller; Joseph, 2015; Garg et al., 2017).

As vias não clássicas de ação da progesterona (Figura 1) podem ser divididas em ação através de: 1 receptores de membrana; 2 fatores de crescimento intracelular; 3 c-SRC/MAPK; 4 PI3K/AKT; integração de sinais endócrinos e mecânicos. A ação neuroprotetora parece ocorrer pela via não clássica por receptores de membrana para progesterona, estes receptores são encontrados no útero, ovários, fígado, intestino e SNC (Garg et al., 2017). Cinco tipos distintos de receptores membranares foram reportados na literatura (mPR α , mPR β , mPR γ , mPR δ and mPR ξ) (Singh; Su; Ng, 2013). A ligação da molécula à esses receptores ativa a proteína intracelular Gi inibindo cAMP para ativar MAPK o que ativa as proteínas quinases (Erk1 e Erk2). mPR α está expresso predominantemente em tecidos reprodutivos e mPR β no cérebro, entretanto, evidências apontam que os receptores tanto mPR α quanto mPR β são expressos na parte dorsal no tronco encefálico a nível do NTS (Boukari; Marcouiller; Joseph, 2015). Especificamente o receptor membranar mPR β , em camundongos, é importante para o quimiorreflexo (Boukari et al., 2016).

Figura 1. Esquema para as vias de sinalização da progesterona

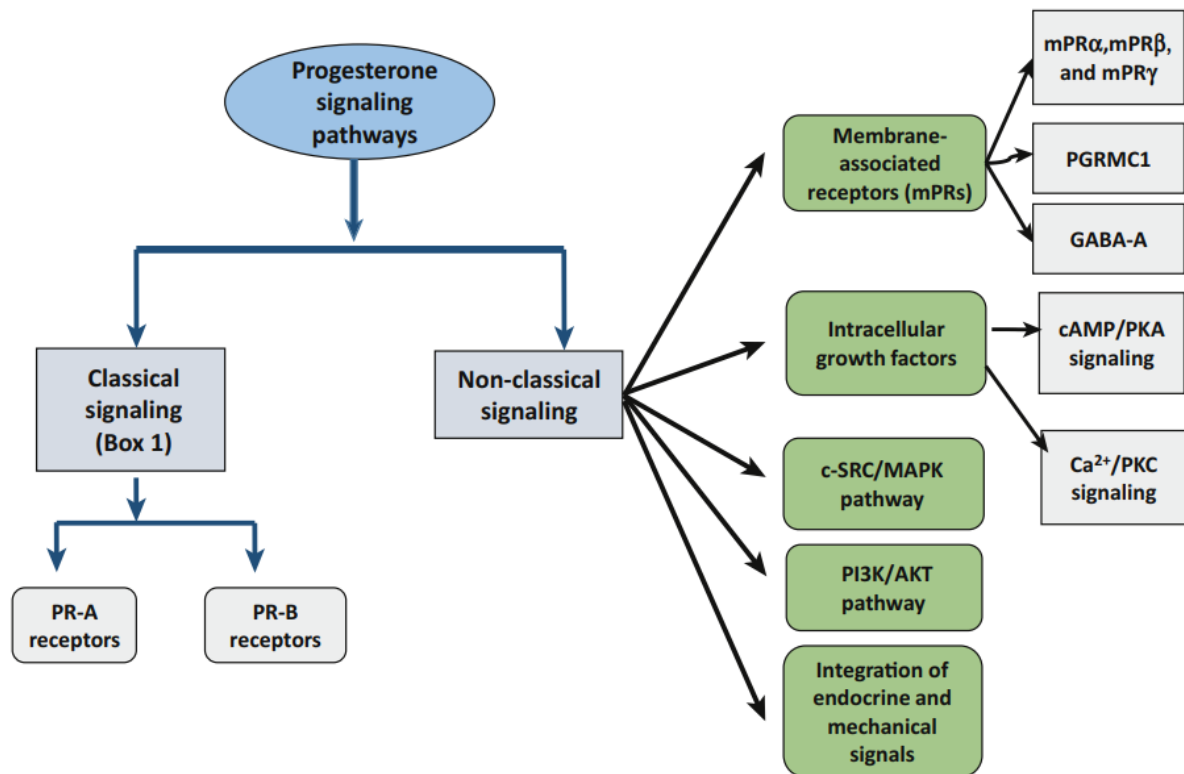


Figura 1. Esquema para as vias de sinalização da progesterona adaptado de (Garg et al., 2017).

O hormônio progesterona tem sido reconhecido e estudado por seus efeitos no controle neural da respiração desde 1905. Foi reportada na literatura a relação da hiperventilação com as alterações hormonais ao notarem a redução da PaCO_2 durante a fase lútea e a gravidez (Hasselbalch; Gammeltoft, 1915). Machida et al., reforçou os achados anteriores demonstrando em 1981 a relação inversa entre a PaCO_2 e a concentração plasmática de progesterona em mulheres. A progesterona também exerceu efeito crítico na ventilação de outras espécies adultas, agindo no SNC (Bayliss et al., 1987; Bayliss; Cidlowski; Millhorn, 1990) e nos receptores periféricos (Hannhart; Pickett; Moore, 1990; Joseph; Niane; Bairam, 2012). As mudanças durante a gestação exigem adaptações, entre elas, no sistema de controle respiratório. Foi observado em mulheres grávidas, similar à fase lútea, uma hiperventilação (Jensen; Ofir; O'donnell, 2009.). Dentre as variações estão, o aumento da ventilação por minuto no início da gestação, a diminuição da PaCO_2 ao longo do processo de desenvolvimento gestacional e aumento da resposta ventilatória frente às situações de hipóxia e hipercapnia. Um possível fator para explicar tais alterações seria o aumento da resposta quimiorreflexa central ao CO_2 (Beran; Kinkead, 2011). Em acordo com as evidências da hiperventilação durante a fase lútea e durante

a gestação e o desaparecimento da hiperventilação durante a pós menopausa, os hormônios gonadais surgem como potenciais interventores sobre o sistema respiratório. Dentre os hormônios gonadais capazes de atuar sobre o sistema respiratório a progesterona possui maior relevância, uma vez que é possível encontrar na literatura evidências da sua ação estimulante sobre o sistema respiratório.

Importante notar que durante a gestação ocorre atenuação da PCO_2 arterial e do líquido cefalorraquidiano e aumento da PO_2 arterial, favorecendo a “desativação” dos quimiorreceptores (Milne, 1979). Sugere-se então que o aumento da ventilação durante a gestação se deve à ação central da progesterona. Evidências sugerem que os níveis elevados de progesterona durante a gestação são capazes de induzir modificações nos receptores ácido gama-aminobutírico A ($GABA_A$) (Maguire et al., 2009), devido à abundância desses receptores nos núcleos respiratórios, como o complexo pré-BötC, o grupo rVRG e cVRG, a ventilação poderia ser afetada. Devido ao envolvimento dos receptores $GABA_A$ na inibição recíproca para geração do ritmo respiratório, a explicação para o aumento da resposta ventilatória, seria da modulação desses receptores fazendo com que ocorra um aumento da atividade do nervo frênico (Beran; Kinkead, 2011).

Ademais, existem diferenças biológicas e farmacocinéticas entre a progesterona natural e a sintética (PS) devido às diferentes fórmulas químicas. Apesar da PS não possuir efeito protetor, esta não sofre efeitos de primeira passagem, possui baixa afinidade com a globulina de ligação (Schindler et al., 2003). Na literatura, a medroxiprogesterona, um análogo da progesterona, aumentou a ventilação em resposta à hipercapnia e hipóxia (Dempsey; Olson Jr.; Skatrud, 2011; Skatrud; Dempsey; Kaiser, 1978; Zwillich et al., 1978)). O aumento demonstrado da resposta ventilatória à hipercapnia, restabelecendo parcialmente a quimiorrecepção ao CO_2 , em mulheres com a síndrome de Ondine, sugeriu o contraceptivo como um possível tratamento promissor (Straus et al., 2010).

O Desogestrel é uma pró droga sintética que possui maior afinidade pelos receptores de progesterona do que o próprio hormônio (Cardani et al., 2018). Sua configuração permite alta atividade progesterônica e baixos efeitos androgênicos e estrogênicos. Experimentos em animais in vitro demonstraram a seletividade desta progestina, o que significa que sua disponibilidade é maior para o alvo específico gerando o efeito desejado. O desogestrel é completamente metabolizado e sua biodisponibilidade é de 76%, com pico de concentração alcançado em 1,15h. 32% se liga à globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG), 66% à albumina e 2% permanecem livres, enquanto que a progesterona possui intenso metabolismo de primeira passagem e não é bem absorvida em sua forma cristalina.

A maior afinidade poderia acentuar o efeito do aumento da ventilação, sendo capaz de modificar o padrão ventilatório para mulheres com a síndrome de Ondine. O metabólito ativo do desogestrel, ETONogestrel, é uma progestina que tem sido utilizado por mulheres como contraceptivo oral por muitos anos (Bennink, 2020). Estudos anteriores o apontam como provável responsável pelo efeito estimulatório na ventilação, possivelmente devido à sua estimulação de áreas da ponte e suprabulbares ricas em receptores de progesterona (Cardani et al. 2022). Assim, buscamos avaliar os efeitos do ETONogestrel na ventilação de ratas Wistar com intuito de elucidar o efeito da progestina.

Outra questão a ser considerada é que o estradiol é capaz de induzir a formação de receptores de progesterona potencializando seu efeito (Brodeur et al., 1986). Na literatura é mostrado que a combinação do estradiol e da progesterona é capaz também de reduzir a síntese de dopamina nos quimiorreceptores periféricos abolindo a inibição dopaminérgica na respiração mediada por receptores de dopamina D2 (Joseph et al., 2002). Além disso, a imunohistoquímica realizada no nosso laboratório também demonstrou aumento de receptores de progesterona no NTS após o uso do estradiol, sugerindo esse núcleo como possível modulador do aumento da ventilação das ratas à hipercapnia. Dessa maneira, decidimos avaliar o efeito da combinação hormonal da progesterona e da progestina com o estradiol.

2.3 Ciclo hormonal, estral e a respiração

Os hormônios gonadais são de extrema importância para manutenção da fertilidade e regulação das funções ovarianas. Através do eixo hipotálamo-pituitária-ovário é possível regular a produção hormonal. O hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) é secretado pelos neurônios hipotalâmicos no sistema porta hipofisário, onde atua estimulando a liberação de gonadotrofinas hipofisárias: hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH), responsáveis por regular as funções ovarianas (Behan; Kinkead, 2011).

O ciclo menstrual de mamíferos é composto pela fase folicular e lútea. O FSH na fase folicular atua estimulando o desenvolvimento dos folículos ovarianos, da formação de pequenas cavidades com fluido até a formação do antro e da produção do E2, onde o FSH atua estimulando a produção de enzimas, aromatase, que converte os andrógenos em estrogênio, além disso, o FSH também estimula a produção de inibina B pelas células granulosas, a qual é responsável pela inibição do FSH na adeno-hipófise. O LH é responsável pela estimulação das células internas da teca a sintetizar e secretar andrógenos. Anterior à ovulação, fase pré-ovulatória, em um exemplo de feedback positivo, o E2 atua nos gonadotrofos da adeno-hipófise e em neurônios liberadores de gonadotrofina no hipotálamo, tornando os gonadotrofos mais

sensíveis ao GnRH, induzindo um pico de secreção de LH. Assim, o desenvolvimento de um folículo estimulado pelo FSH sofre ruptura, pela ação de citocinas inflamatórias e enzimas proteolíticas induzidas pelo LH, acarretando na liberação do óvulo. O aumento dos níveis de E2 durante a fase folicular também estimula a proliferação do endométrio (Garcia; Walker; Zoellner, 2018; Randall et al., 2002).

A ovulação inicia a fase lútea, na qual o folículo que sofreu ruptura se transforma no corpo lúteo por ação do LH. O corpo lúteo secreta, principalmente o hormônio P4, que exerce um feedback negativo nos neurônios hipotalâmicos e na adeno hipófise levando à redução dos níveis secretados de FSH e LH. A P4 atua no endométrio preparando o tecido para a implantação do óvulo fertilizado, caso não ocorra a implantação, os níveis de P4 decrescem causando regressão do corpo lúteo e descamação do endométrio. Com a redução dos níveis de E2, P4 e inibina B, as secreções de LH e FSH começam a aumentar novamente, iniciando um novo ciclo. É importante ressaltar que a duração das fases folicular e lútea varia de acordo com diferentes grupos animais (Randall et al., 2002).

O ciclo estral das ratas ocorre a cada 4-5 dias. O ciclo estral é dividido em proestro com duração de 12-14h onde ocorre um pico de P4 e E2, estro 25-27h, os níveis de E2 aumentam gradualmente e os níveis de progesterona estão baixos, metaestro 6-8h e diestro 55-57h ocorre outro pico de P4, embora mais discreto do que durante o proestro (Gráfico 1), sendo sua caracterização realizada através do monitoramento do tipo celular presente no esfregaço vaginal. O proestro pode ser identificado pela predominância de células epiteliais nucleadas agrupadas, o estro pela presença de célula epitelial escamosa cornificada, com formato irregular e anucleada e durante a fase de metaestro e diestro as pequenas células com citoplasma granular, leucócitos, são as células dominantes (Behan; Kinkead, 2011).

Gráfico 1. Concentração da progesterona e estradiol durante o ciclo estral

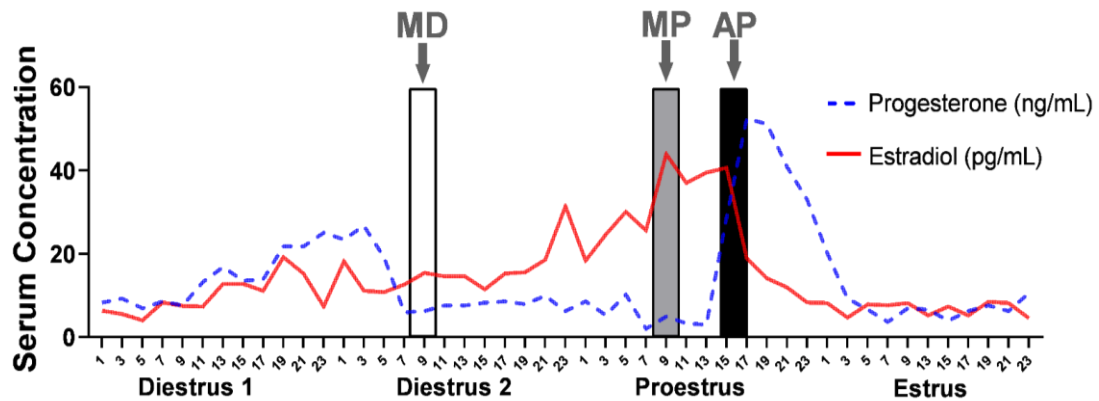


Gráfico 1. Concentração sérica de progesterona (linha azul tracejada) e estradiol (linha vermelha) ao longo do ciclo estral de ratas a cada hora. Diestro manhã (MD); Proestro manhã (MP); Proestro tarde (AP). Adaptado (Smith; Freeman; Neill, 1975).

Em mulheres, diferentes respostas ventilatórias foram reportadas na literatura de acordo com as diferentes fases do ciclo menstrual. O aumento da resposta ventilatória à hipercapnia ou hipóxia demonstrou que, além da manutenção da fertilidade e regulação das funções ovarianas, os hormônios gonadais também são capazes de interferir na respiração. Foi demonstrado na literatura o aumento da ventilação durante a fase lútea (Machida, 1981), Popovic; White demonstraram maior atividade do músculo genioglosso durante a fase lútea, além disso, Driver et al. demonstrou que a resistência das vias aéreas era menor durante a fase lútea (Driver et al., 2005; Popovic; White, 1998; White et al., 1983).

2.4 Pseudoprenhez

Em ratas, a estimulação do cérvix uterino é um método capaz de induzir o reflexo neuroendócrino que induz a liberação de prolactina. O corpo lúteo, formado durante o ciclo estral secreta P4 e possui curta duração, 2 a 3 dias, com a regressão do corpo lúteo formado, os níveis de progesterona decrescem (Gorospe; Freeman, 1982). Dessa forma, quando o corpo lúteo é mantido ocorre também elevação da secreção de P4. Para manutenção e atividade secretora do corpo lúteo é essencial a produção do hormônio prolactina, na literatura a prolactina é considerada o principal estímulo luteotrófico que inicia e mantém a secreção de P4 pelos corpos lúteos. O aumento de secreção de progesterona pela prolactina ocorre de duas

maneiras, potencializando os efeitos do LH e inibindo a hidroxisteróide desidrogenase responsável pela inativação da progesterona (Freeman et al., 2000). Devido ao período prolongado de liberação de prolactina, mas ausência da cópula, a estimulação do cérvix uterino é conhecida como pseudoprenhez (Gorospe; Freeman, 1982).

Durante a pseudoprenhez ocorre aumento dos níveis de P4 até o 5º dia, permanecendo em platô até o 9º dia, enquanto que durante a prenhez os níveis de P4 atingem um pico no 15 e 16º dia. Pepe e Rothchild (1974) demonstraram que durante os primeiros nove dias os níveis de P4 foram similares entre a prenhez e pseudoprenhez (Gráfico 2) (Pepe; Rothchild, 1974). Dessa maneira, a pseudoprenhez permite o estudo dos efeitos dos hormônios encontrados nos primeiros nove dias de prenhez sem as modificações estruturais que ocorrem no corpo do animal devido à prenhez.

Gráfico 2. Concentração da progesterona durante a prenhez e pseudoprenhez

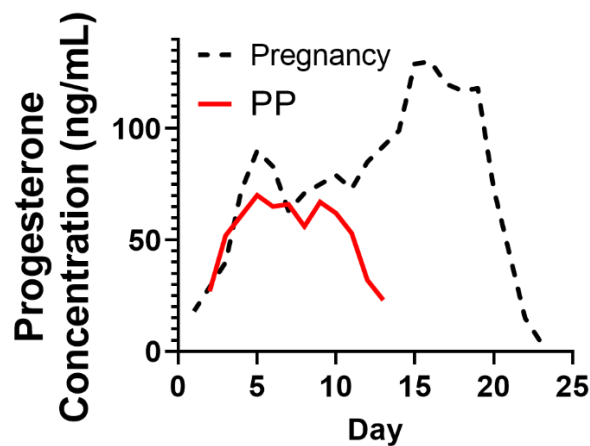


Gráfico 2. Concentração da progesterona endógena durante a prenhez (linha tracejada) e a pseudoprenhez (linha vermelha) ao longo dos dias. Adaptado (Pepe; Rothchild, 1974).

Como demonstrado, a manutenção dos níveis de P4 através da pseudoprenhez, atua inibindo a ovulação, podendo mimetizar os níveis hormonais durante a gestação até o 9º dia. A efetividade da pseudoprenhez pode ser avaliada também através da visualização do diestro, presença de leucócitos no esfregaço vaginal, que aparece por cerca de dez dias devido à ação da P4.

2.5 Síndrome da Hipoventilação Central Congênita (CCHS)

Conhecida também como síndrome de Ondine, a CCHS é uma condição caracterizada por hipoventilação alveolar devido à deficiência no controle autonômico central da ventilação e disfunção autonômica global (Dubreuil et al., 2008). O termo dado a essa síndrome surgiu em 1962 com Severinghaus e Mitchell, após descreverem as manifestações da CCHS em três pacientes que realizaram cirurgia no tronco encefálico. A hipoventilação alveolar causada pela síndrome não é explicada por nenhuma anomalia pulmonar, cardiovascular, neurológica ou muscular (Trang et al., 2020). Clinicamente a CCHS é caracterizada por hipoventilação central devido à redução anormal ou ausência de resposta à hipercapnia e hipóxia e manifestações associadas à disfunção autonômica (Weese-Mayer et al., 1993). A severidade da apneia faz com que os pacientes necessitem de ventilação mecânica principalmente durante a noite, devido ao controle neural automático ser predominante. Entretanto, o padrão ventilatório permanece anormal durante o período acordado, apesar de ocorrer (Maloney et al., 2018).

Duas décadas foram necessárias para compreender um pouco da natureza da CCHS. Os critérios propostos para o diagnóstico são: 1 - evidência de hipoventilação persistente durante o sono ($\text{PaCO}_2 > 60$ mmHg); 2 - sintomas normalmente percebidos no primeiro ano de vida; 3 - ausência de doença primária pulmonar ou neuromuscular. Para complementar, em 2003 o gene PHOX2B foi identificado como o maior responsável pela ocorrência da CCHS. Dessa maneira, a CCHS é classificada como hipoventilação alveolar relacionada ao sono com presença de mutação no gene PHOX2B pela Classificação Internacional dos Distúrbios do Sono (3º ed. 2014). A mutação no gene PHOX2B é encontrada na maioria dos pacientes CCHS, porém, outros genes também podem contribuir com o aparecimento da síndrome.

Até o momento, nenhuma medicação é capaz de aumentar e manter a ventilação o suficiente para prevenir os problemas acarretados pela hipoventilação. Algumas moléculas têm sido estudadas com possível propriedade para aumentar a ventilação, mas o manejo com uso de ventiladores mecânicos ainda é o principal meio de tratamento (Maloney et al., 2018; Trang et al., 2020). Para cada paciente, o suporte ventilatório deve permitir a ventilação adequada a qualquer momento, durante o sono e se necessário durante a vigília, além de acompanhar o desenvolvimento, as mudanças de atividades e permitir a ventilação adequada também durante intercorrências, o que torna o aparelho ventilatório necessário para a vida gerando alto custo financeiro.

Os problemas com o uso do ventilador vão além dos gastos financeiros. Os pacientes com CCHS precisam estar constantemente atentos à oxigenação, a hipoventilação ou a

hiperventilação de maneira constante, uma vez que podem acarretar prejuízos para a saúde física e mental dos pacientes, no caso do agravamento da hipoventilação a produção da acidose pode resultar em coma. Além disso, a constante atenção exigida pelo aparelho leva a condições de estresse não apenas para o paciente, mas também para os familiares que o acompanham, principalmente durante o período de desenvolvimento (Paddeu et al., 2015).

Assim, apesar do avanço para identificação e tratamento da CCHS, atualmente não existe cura e nem medicamentos capazes de facilitar o manejo da CCHS, o que incentiva a contínua busca por um tratamento eficiente capaz de reduzir a dependência do ventilador mecânico e os prejuízos financeiros e psicológicos acarretados pelo uso do mesmo.

Considerando que: 1 - o hormônio P4, foi reconhecido e estudado por seus efeitos no controle neural da respiração; 2 houve redução da PaCO₂ durante a fase lútea e a gravidez, demonstrando relação inversa entre a PaCO₂ e a concentração plasmática de P4 em mulheres; 3 - foi observado em mulheres grávidas, similar à fase lútea, uma hiperventilação, sendo alterações que desaparecem na pós menopausa; 4 - a progestina possui maior afinidade pelos receptores de P4; 5 - o E2 é capaz de promover aumento no número de receptores para P4; 6 - não há cura e tratamentos farmacológicos para a CCHS, tornando a P4 como possível medicamento promissor; O objetivo do presente trabalho foi avaliar sistematicamente a atividade respiratória e quimiorrecepção ao CO₂/pH em ratas Wistar adultas sob efeito da P4 endógena, exógena e na sua formulação sintética combinada ou não com o E2.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar o papel da progesterona e progestina nas respostas ventilatórias à hipercapnia de ratas Wistar.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar possíveis variações da resposta ventilatória entre as fases do ciclo estral marcada pelas alterações cíclicas de P4 endógena nas ratas Wistar;
- Caracterizar variações da resposta ventilatória em ratas Wistar induzidas à pseudoprenhez por estimulação mecânica;
- Avaliar a resposta ventilatória de ratas Wistar ovariectomizadas com reposição de P4 e ou E2;
- Avaliar as variações do padrão respiratório em ratas tratadas com ETO e ETO combinado com E2;
- Identificar alterações do padrão ventilatório de acordo com alterações hormonais em normocapnia e hipercapnia.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Fêmeas Wistar foram utilizadas (230 e 280 g) providas pelo Centro de Bioterismo do ICB/UFMG (CEBIO). Os animais foram mantidos no biotério setorial do Departamento de Fisiologia da UFMG (parte da estrutura do BICBIO-2). Todos os animais foram mantidos em ambiente com ciclo claro/escuro de 12h/12h, temperatura 24°-25°C e o livre acesso à água e ração. Todos os procedimentos foram aprovados pelo protocolo #87/2018.

4.2 Esfregaço vaginal

Os animais foram submetidos ao esfregaço vaginal diariamente para monitorar a progressão do ciclo estral. O esfregaço vaginal foi realizado todos os dias às 10h00 para verificar a regularidade do ciclo. Apenas fêmeas que exibiram 3 ciclos regulares consecutivos foram utilizadas no experimento. Os estágios do ciclo estral foram determinados usando o critério de Smith; Freeman; Neill (1975) que consiste na caracterização realizada através do monitoramento do tipo celular presente no esfregaço vaginal. O proestro pode ser identificado pela predominância de células epiteliais nucleadas agrupadas, o estro pela presença de células epiteliais escamosas cornificadas, com formato irregular e anucleada e durante a fase de metaestro e diestro, pequenas células com citoplasma granular, leucócitos, são as células predominantes.

Figura 2. Coleta do esfregaço vaginal



Figura 2. Realização da coleta de células vaginais da rata Wistar com pipeta para verificação do ciclo estral. Elaborada pela autora (2021).

Figura 3. Fases do ciclo estral

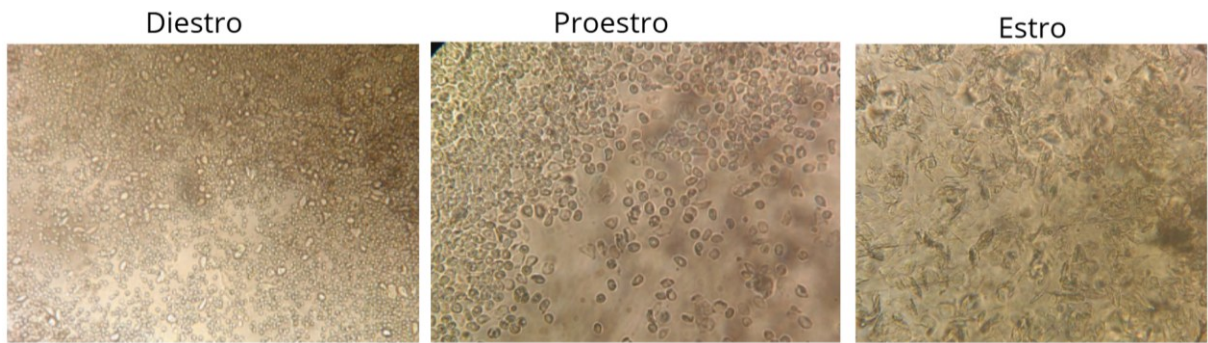


Figura 3. Caracterização das fases do ciclo estral da rata Wistar. Diestro: predominância de leucócitos; Proestro: predominância de células nucleadas; Estro: predominância de células cornificadas. Elaborada pela autora (2021).

4.3 Indução da pseudoprenhez

Foi utilizado um bastão de vidro (com diâmetro 3 mm) para realizar a estimulação mecânica do cérvix uterino para indução da pseudoprenhez. O procedimento foi realizado durante o proestro (19h00) e no dia seguinte durante o estro pela manhã (09h00), sendo a fase estro, contada como primeiro dia.

Figura 4. Indução da pseudoprenhez



Figura 4. Indução da pseudoprenhez com bastão de vidro. Elaborada pela autora (2021).

4.4 Coleta de sangue e ensaio para hormônio plasmático

Para acessar os níveis plasmáticos de P4, os animais foram decapitados após o PP9 e o sangue foi coletado. Aproximadamente 1mL de sangue foi coletado de cada fêmea através de um funil em um tubo eppendorf heparinizado (0,15 mL de heparina sódica 5000 UI/mL em 3 mL de NaCl a 0,9%). O plasma foi separado por uma centrifuga a 2500 rpm por 10 min a 4°C e armazenado a -80°C. Plasma de P4 foi mensurado usando ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) kit (P4: EIA-48K2J1; Monobind Inc., CA, USA) seguindo as instruções do fabricante.

4.5 Doses hormonais

O óleo foi utilizado para os animais controle na dose de 0,2 mL/animal (óleo de soja; 0,2 mL/animal, s.c., Liza; Cargill, Belo Horizonte, Brazil). A progesterona foi utilizada na dose de 2,5 mg/0,2 mL/animal (2,5mg/0,2 mL/animal, s.c.; Sigma, St Louis, MO, USA) e o 17 β -estradiol foi utilizado na dose 10 μ g/0,1 mL/animal (10 μ g/0,1 mL/animal, s.c., E2 cypionate; Pfizer, Belo Horizonte, Brazil). As doses de estradiol e progesterona condizem com valores fisiológicos do proestro tarde (Szawka et al., 2009). Três doses da progestina foram utilizadas e os cálculos para dosagem foram baseados nos cálculos de Allaway et al. para serem equivalentes à concentração para humanos (0,25 μ g/0,1 mL/ animals.c., Sigma, St Louis, MO, USA) sendo outras duas doses adicionadas para observação do efeito contraceptivo na rata (2,5 μ g/0,1 mL/ animal e 250 μ g/0,1 mL/ animal s.c., Sigma, St Louis, MO, USA).

4.6 Ovariectomia

Os animais foram anestesiados (isoflurano 5% indução) até a perda da sensibilidade à dor. Os animais foram mantidos à uma taxa de manutenção entre 1,5-2,5% durante toda a cirurgia. Ovariectomia bilateral foi realizada com uma incisão sagital de 1,5cm no flanco direito para acessar a cavidade abdominal. Ovários e tecido adiposo circundado foram removidos, neste momento um dispositivo foi inserido na cavidade para avaliação da temperatura. A incisão foi fechada por sutura do músculo e da pele. Após a cirurgia, os animais foram tratados com uma dose de antibiótico (10 mg/kg, i.m, Pentabiótico, Belo Horizonte, Brazil), analgésico (2,5 mg/kg, s.c, Flunixin, Meglumine, Banamine, Belo Horizonte, Brazil) e permaneceram em recuperação por 10 dias.

4.7 Ventilação e temperatura

Para obtenção dos dados de fR , V_T e \dot{V}_E , foi realizado o método de pletismografia de corpo inteiro. A avaliação foi feita individualmente e realizada em uma câmara de acrílico de 5 litros de volume, a temperatura da sala foi controlada para permanecer em 24° C. O fluxo de ar para a câmara foi realizado por uma bomba de ar e mantido a 2000 mL/min. Para manter a umidade relativa do ar de 100%, o fundo da câmara foi preenchido por uma fina camada de água e para manter o conforto do animal, uma grade foi utilizada para separação entre a água e a maravalha com o animal. Para medir as variáveis ventilatórias, após o período de habituação (~30 min), a câmara foi fechada interrompendo o fluxo de ar por um curto período (~3 min), um transdutor diferencial de pressão (ML141 Spirometer, PowerLab, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Austrália) foi utilizado para medir o gradiente de pressão no interior do sistema. Utilizando um analisador de gases, foi possível obter os dados da concentração de O_2 no fluxo de entrada e de saída para o cálculo do consumo de O_2 do animal ($\dot{V}O_2$) expresso em mLSTPD.kg.min⁻¹. A medida da resposta ventilatória à mistura de 7% de CO_2 (Gas analyser ML206, AdInstruments, NSW, Australia) também ocorreu após o período de habituação (~30 min) e interrupção do fluxo de ar por um curto período (~3 min). Uma seringa de 1 mL foi conectada à tampa da câmara para realizar a calibração do sistema para posterior cálculo do volume corrente de acordo com a equação de Malan (1973) (Malan, 1973). fR , V_T e \dot{V}_E estão expressos em mL BTPS.kg.min⁻¹. A temperatura corporal foi obtida através do dispositivo implantado ou por temperatura retal. Os animais tiveram seus movimentos restringidos e um termômetro foi inserido por aproximadamente 7 cm pelo anus. O termômetro permaneceu por pelo menos 15 segundos antes da anotação da temperatura. O termômetro foi higienizado com álcool 70% entre cada animal antes e após a medida da ventilação. Os animais foram habituados ao procedimento por 5 dias.

4.8 Protocolo experimental

4.8.1 Experimento 1: Caracterização da resposta ventilatória das ratas Wistar durante o ciclo estral

Ratas Wistar (230-300g n=8) foram submetidas ao esfregaço vaginal, sendo utilizadas aquelas que completaram três ciclos consecutivos. As medidas ventilatórias foram obtidas pela pletismografia de corpo inteiro durante a manhã do diestro (MD), durante o proestro manhã (MP), entre as 9 horas da manhã e as 12 horas e proestro tarde (AP) entre as 16 horas e as 19

horas da noite no horário de Brasília. A fase DM foi identificada como o primeiro dia em que surgiram leucócitos no esfregaço vaginal e o proestro foi identificado como a presença de células nucleadas e a ausência de leucócitos. Antes de serem colocadas na câmara e logo após a última medida da pletismografia, as ratas tiveram a sua temperatura medida por um termômetro (temperatura retal).

4.8.2 Experimento 2: Caracterização da resposta ventilatória à hipercapnia das ratas Wistar durante a pseudoprenhez induzida por estimulação cervical

Ratas Wistar (230-300g n=10) foram submetidas ao esfregaço vaginal, sendo utilizadas aquelas que completaram três ciclos consecutivos. As medidas ventilatórias pelo método de pletismografia foram obtidas no segundo dia de diestro pela manhã e 5º e 9º dia após a indução da pseudoprenhez. Após a estimulação, o esfregaço vaginal continuou a ser realizado para certificação da pseudoprenhez caracterizada pela contínua presença de leucócitos, ou seja, manutenção citológica similar ao diestro. A temperatura foi obtida pelo Data Logger (DL) implantado em cirurgia uma semana antes do início do esfregaço vaginal. O sangue dos animais foi coletado após o término do protocolo para avaliação da concentração de P4 no plasma.

4.8.3 Experimento 3: Avaliação do efeito da reposição hormonal de P4 e E2 na ventilação de ratas Wistar ovariectomizadas

Ratas Wistar (200-270g n=43) foram submetidas ao esfregaço vaginal, sendo utilizadas aquelas que completaram três ciclos consecutivos. As fêmeas foram ovariectomizadas e divididas em dois grupos: 1) receberam pré-tratamento com estradiol por três dias consecutivos (n = 10) e 2) receberam pré-tratamento com óleo por três dias consecutivos (n = 9). Posteriormente, os dois grupos foram tratados por um dia com progesterona (grupo P1) para avaliação do efeito agudo e por três dias (grupo P3) para avaliação do efeito crônico. A injeção subcutânea foi aplicada pela manhã. As ratas foram submetidas ao método de pletismografia de corpo inteiro: 1) no diestro, antes de iniciar os tratamentos; 2) após o pré-tratamento; 3) 2h após o primeiro dia de tratamento com progesterona, e 4) um dia após três dias consecutivos de tratamento com a progesterona.

4.8.4 Experimento 4: Avaliação do efeito do tratamento hormonal com ETO na ventilação de ratas Wistar

Ratas Wistar (220-250g n=43) foram utilizadas para avaliação dos efeitos do ETO e norgestrel. As fêmeas Wistar foram submetidas ao esfregaço vaginal, sendo utilizadas aquelas que completaram três ciclos consecutivos. O acompanhamento do ciclo estral permaneceu durante todo o tratamento. A injeção subcutânea foi aplicada pela manhã durante 21 dias. Os animais foram divididos de acordo com a droga e concentração em grupo controle (GC, n=8), grupo 1 (G1, n=9), grupo 2 (G2, n=9) e grupo 3 (G3, n=9). Para o tratamento de combinação hormonal foi utilizada a maior dose da progestina, ETO e norgestrel, e estradiol para o grupo 4 (G4, n=8). As ratas foram submetidas ao método de pletismografia de corpo inteiro ao final do tratamento no 22º dia. Antes de ser colocada na câmara e logo após a última medida ventilatória, a rata teve sua temperatura medida por um termômetro (temperatura retal). A medida ventilatória dos animais controle foi realizada no segundo dia de diestro.

4.9 Análise

Para avaliação do sinal gerado pela resposta quimiorreflexa durante à exposição à hipercapnia foram selecionadas as porções mais longas e regulares dentro dos minutos gravados. Todos os valores obtidos foram analisados com o ANOVA two-way ou one-way. Para comparar as variáveis mensuradas nos diferentes protocolos e grupos experimentais utilizamos o software GraphPad Prism para todas as análises. Todos os valores são reportados como média e SE, com valor de P significativo < 0,05.

5. RESULTADOS

5.1 Ciclo estral e a resposta ventilatória ao CO₂

Os animais apresentaram resposta ventilatória à hipercapnia (Gráfico 3), ou seja, houve aumento da \dot{V}_E quando expostos à 7% CO₂ (\dot{V}_E 2162,172±85,35 ml/min/Kg). Assim como houve aumento da fR (147,741±6,16 cycles.min⁻¹) e do VT (14,775±0,23 mL.Kg⁻¹). Entretanto, não houve diferença entre as respostas ventilatórias em hipercapnia de ratas Wistar durante as oscilações hormonais do ciclo estral, assim como em ar ambiente (Gráfico 4).

Em ar ambiente os animais na fase proestro tarde do ciclo estral apresentaram uma temperatura atenuada em comparação à fase diestro manhã (Tabela1). Todavia, essas variações não alteraram os parâmetros ventilatórios dos animais nas diferentes fases do ciclo. O $\dot{V}O_2$, foi pouco influenciado pela hipercapnia nas ratas Wistar considerando o valor médio entre as fases do ciclo (de 28,68±2,12 L/min/kg em ar ambiente, para 27,16±1,58 L/min/kg na hipercapnia). Não houve alteração da temperatura durante as diferentes fases do ciclo em resposta à hipercapnia (Gráfico 4).

O conjunto de dados referente ao experimento 1 demonstra que não houve diferença na ventilação em ar ambiente e nem em resposta ao CO₂ (7%), entre as diferentes fases do ciclo estral.

Gráfico 3. Resposta ventilatória de ratas Wistar durante as fases do ciclo estral

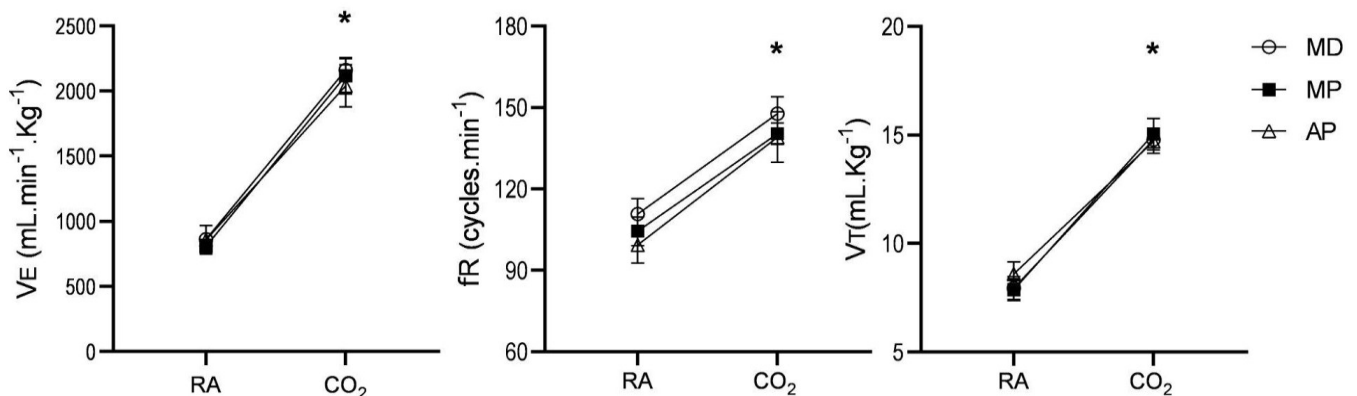


Gráfico 3. Resposta ventilatória (\dot{V}_E em mL/min/Kg) de ratas Wistar em ar ambiente e em resposta à hipercapnia (7% CO₂) durante as fases do ciclo estral: Diestro manhã (MD); Proestro manhã (MP) e Proestro tarde (AP). RA: ar ambiente; CO₂: hipercapnia.

Gráfico 4. Resposta ventilatória de ratas Wistar em porcentagem durante a hipercapnia em diferentes fases do ciclo estral

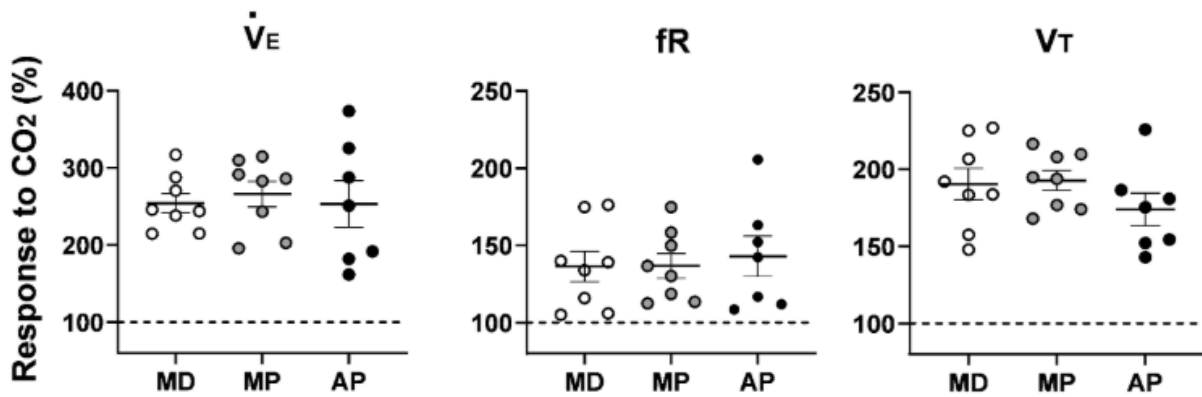


Gráfico 4. Resposta ventilatória de ratas Wistar à hipercapnia em porcentagem durante as fases do ciclo estral: Diestro manhã (MD); Proestro manhã (MP) e Proestro tarde (AP). \dot{V}_E : ventilação; fR: frequência respiratória; VT: volume corrente.

Tabela 1. Parâmetros ventilatórios em ar ambiente: ciclo estral

	MD	MP	AP
<i>n</i>	8	8	7
Peso (Kg)	0,27 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,27 ± 0,01
\dot{V}_E (mL . kg ⁻¹ . min ⁻¹)	861,80 ± 46,44	807,40 ± 52,99	857,00 ± 110,20
fR (breaths . min ⁻¹)	110,70 ± 5,67	104,40 ± 5,23	99,31 ± 6,70
V _T (mL . kg ⁻¹)	7,95 ± 0,52	7,87 ± 0,49	8,60 ± 0,56
$\dot{V}_E/\dot{V}O_2$	27,48 ± 2,28	28,71 ± 2,14	34,41 ± 4,19
$\dot{V}O_2$ (mL . kg ⁻¹ . min ⁻¹)	32,27 ± 2,35	28,68 ± 1,80	24,91 ± 0,88
Tb (°C)	37,73 ± 0,21	37,35 ± 0,19	36,64 ± 0,15 ^a

Tabela 1. Tabela com os dados ventilatórios em ar ambiente durante as fases do ciclo estral: Diestro manhã (MD); Proestro manhã (MP) e Proestro tarde (AP). Dados são mostrados como média ± SEM. *P* < 0,005. *n* = número de animais; *a* = Diferença entre MD e AP (*p* = 0,0372).

Gráfico 5. Relação ventilação/consumo de O₂; metabolismo e temperatura de ratas Wistar durante diferentes fases do ciclo estral

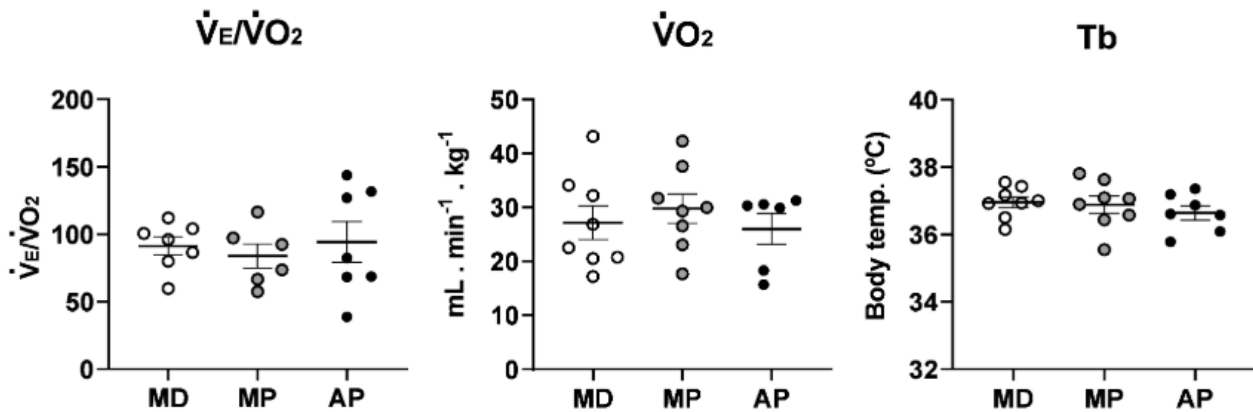


Gráfico 5. Relação ventilação/consumo de O₂ ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$); consumo de O₂ ($\dot{V}O_2$) e temperatura (T_b) de ratas Wistar durante as fases do ciclo estral: Diestro manhã (MD); Proestro manhã (MP) e Proestro tarde (AP).

5.2 Pseudoprenhez e a resposta ventilatória ao CO₂

Todos os animais apresentaram resposta ventilatória quando expostos à hipercapnia (Gráfico 6). A resposta ventilatória não foi diferente para as medidas realizadas antes e após a pseudoprenhez em ar ambiente (Pré 853,988±52,92; Dia 5 980,731±48,93; Dia 9 846,309±29,20). Nenhuma diferença significativa foi encontrada na fR (Pré 84,43±3,33; Dia 5 88,90±2,74; Dia 9 86,19±3,26). Apesar da leve atenuação do VT quando comparado o 5º e 9º dia da pseudoprenhez (Pré 10,282±0,63; Dia 5 11,071±0,39; Dia 9 9,847±0,26), esse valor não foi capaz de alterar a resposta ventilatória das ratas Wistar (Tabela 2).

Apesar do aumento da ventilação com relação ao ar ambiente devido à exposição à hipercapnia, não houve diferença entre os valores da \dot{V}_E encontrados antes e após a pseudoprenhez para a hipercapnia (Pré 2013,223±71,68; Dia 5 2095,157±79,79; Dia 9 2024,393±75,96). Também não houve diferenças significativas quando comparado a fase diestro do ciclo estral e após a pseudoprenhez para fR (Pré 124,84±4,30; Dia 5 125,173±3,66; Dia 9 126,938±4,74) e para o VT (Pré 16,315±0,89; Dia 5 16,763±0,58; Dia 9 16,016±0,48).

Devido à ausência de variação significativa da \dot{V}_E e do $\dot{V}O_2$ (Pré 22,398±1,01; Dia 5 24,096±1,13; Dia 9 21,167±1,39), a razão $\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ também não apresentou diferenças significativas entre os períodos de realização da ventilação. Variações na temperatura também não foram identificadas com relação à pseudoprenhez em ar ambiente (Pré 37,51±0,20 ; Dia 5

37,56±0,19 ; Dia 9 37,64±0,17) e em hipercapnia (Pré 36,7±0,14; Dia 5 36,9±0,17; Dia 9 36,9±0,15).

Após o PP9 os animais foram eutanasiados e o sangue foi coletado. Os dados obtidos através do método de ELISA demonstram um aumento das concentrações de progesterona plasmática quando comparadas as fases do diestro (Diestrus: média 10,36 ng/mL) e PP9 (PP9: média 54,71 ng/mL) (Gráfico 9).

O conjunto de dados referente ao experimento 2 demonstra que apesar das ratas Wistar responderem com aumento da ventilação durante a hipercapnia, não houve diferença significativa na ventilação antes e após a pseudoprenhez.

Gráfico 6. Resposta ventilatória de ratas Wistar durante a pseudoprenhez

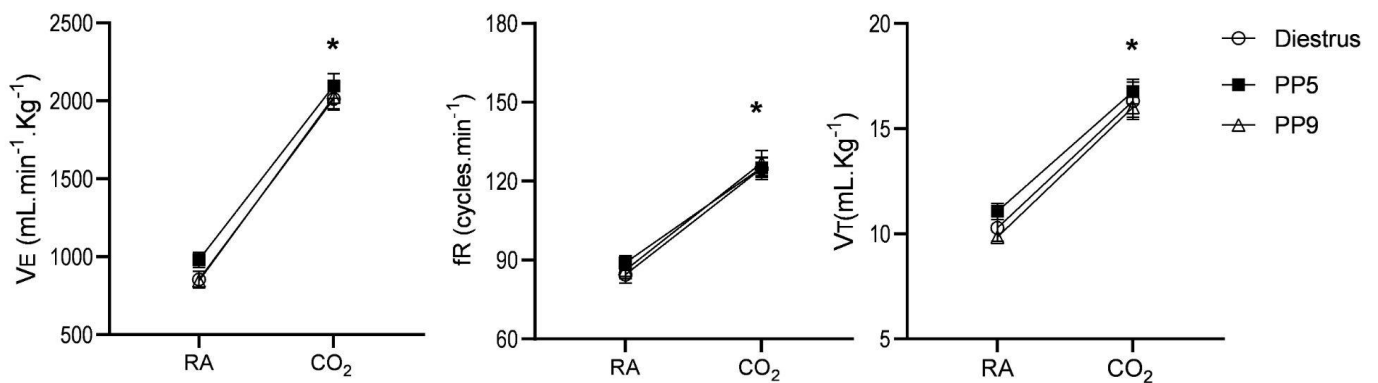


Gráfico 6. Resposta ventilatória (\dot{V}_E em mL/min/Kg) de ratas Wistar em ar ambiente e em resposta à hipercapnia (7% CO₂) antes e após a pseudoprenhez: durante o Diestro; 5º dia de pseudoprenhez (PP5) e 9º dia de pseudoprenhez (PP9). RA: ar ambiente; CO₂: hipercapnia.

Tabela 2. Parâmetros ventilatórios em ar ambiente: pseudoprenhez

	Diestrus	PP5	PP9
<i>n</i>	10	10	10
Peso (Kg)	0,23 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,25 ± 0,01
\dot{V}_E (mL . kg⁻¹ . min⁻¹)	853,99 ± 52,92	980,73 ± 48,93	846,31 ± 29,20
fR (breaths . min⁻¹)	84,44 ± 3,33	88,90 ± 2,74	86,20 ± 3,26
V_T (mL . kg⁻¹)	10,28 ± 0,63	11,07 ± 0,39	9,85 ± 0,26 a
$\dot{V}_E/\dot{V}O_2$	37,55 ± 3,15	41,87 ± 3,86	38,95 ± 2,72
$\dot{V}O_2$ (mL . kg⁻¹ . min⁻¹)	23,36 ± 1,19	24,57 ± 1,78	22,63 ± 1,64
Tb (°C)	37,51 ± 0,20	37,56 ± 0,19	37,64 ± 0,17

Tabela 2. Tabela com os dados ventilatórios em ar ambiente durante a pseudoprenhez. Diestru; 5° dia de pseudoprenhez (PP5) e 9° dia de pseudoprenhez (PP9). Dados são mostrados como média ± SEM. $P < 0,005$. n = número de ratos. a = Diferença entre PP5 e PP9 ($p = 0,0146$).

Gráfico 7. Resposta ventilatória de ratas Wistar em porcentagem durante a hipercapnia ao longo da pseudoprenhez

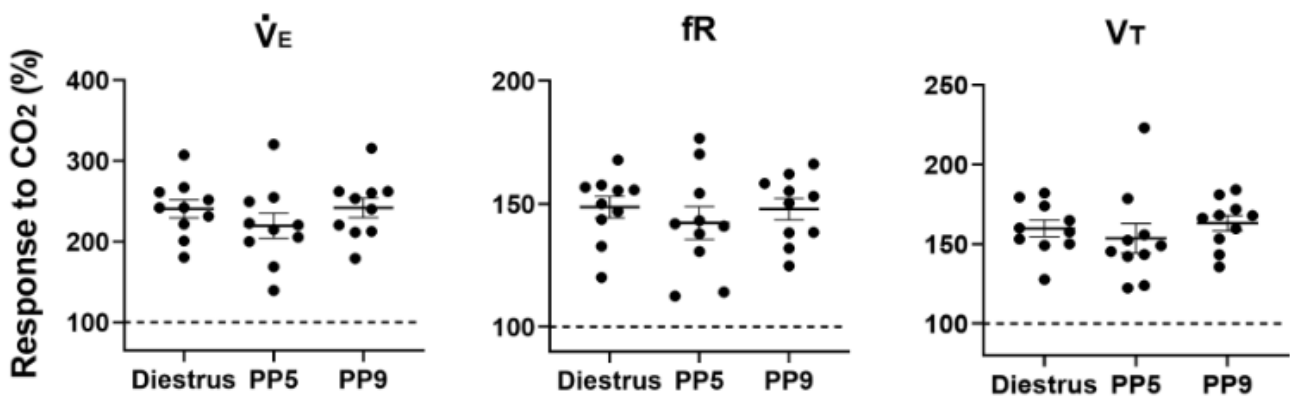


Gráfico 7. Resposta ventilatória de ratas Wistar à hipercapnia em porcentagem durante o Diestru; 5° dia de pseudoprenhez (PP5) e 9° dia de pseudoprenhez (PP9). \dot{V}_E : ventilação; fR: frequência respiratória; V_T: volume corrente.

Gráfico 8. Relação ventilação/consumo de O₂, metabolismo e temperatura de ratas Wistar durante a pseudoprenhez

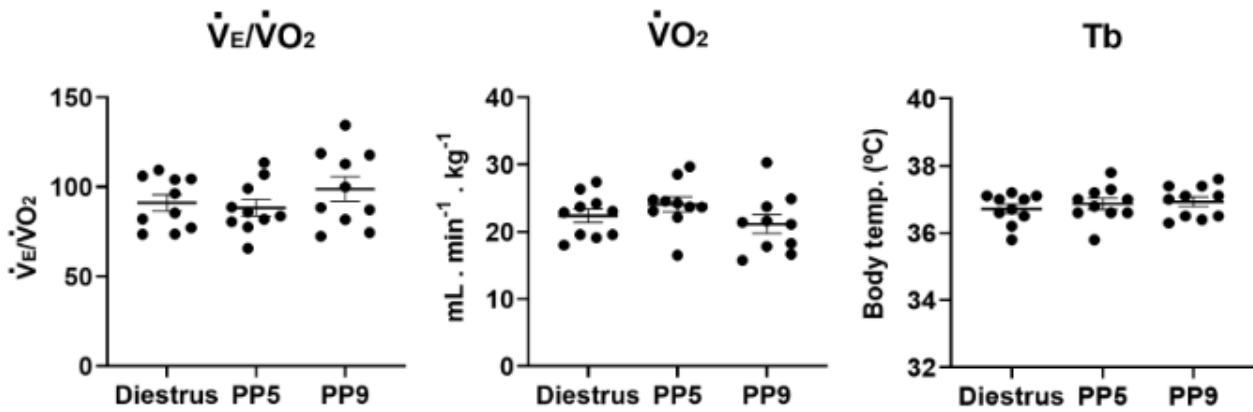


Gráfico 8. Relação ventilação/consumo de O₂ ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$); consumo de O₂ ($\dot{V}O_2$) e temperatura (Tb) de ratas Wistar durante o Diestro; 5º dia de pseudoprenhez (PP5) e 9º dia de pseudoprenhez (PP9).

Gráfico 9. Concentração de progesterona plasmática no PP9

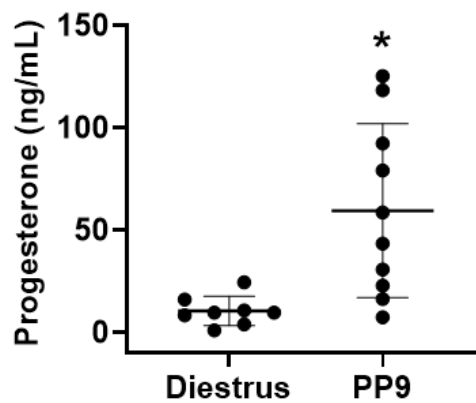


Gráfico 9. Concentração de progesterona plasmática de ratas Wistar durante o Diestro e 9º dia de pseudoprenhez (PP9).

5.3 Estradiol promove aumento do peso do útero

Nossos resultados mostram um aumento no peso do útero das ratas Wistar em resposta ao tratamento com estradiol, validando a ovariectomia e a reposição hormonal.

Gráfico 10. Peso do útero de ratas Wistar tratadas com E2

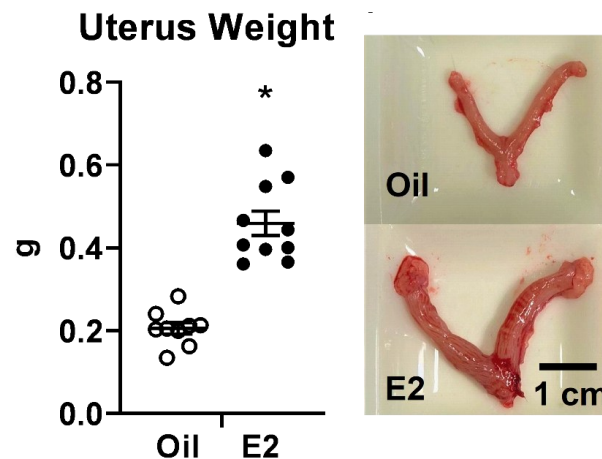


Gráfico 10. Peso do útero de ratas Wistar em gramas para animais tratados com óleo (branco) e estradiol (cinza). Figura do útero dos animais tratados com óleo (Oil) e estradiol (E2).

5.4 Progesterona + estradiol aumentam a resposta ventilatória ao CO₂

O tratamento com P4 + E2 não modificou a resposta ventilatória das ratas Wistar em ar ambiente (Gráfico 11). Interessante notar que a ventilação não sofre alteração com a ovariectomia. Todos os animais tiveram aumento da resposta ventilatória quando expostos à hipercapnia (Gráfico 12).

O tratamento de um dia com P4 + E2 promoveu aumento da fR das ratas Wistar em resposta à hipercapnia (%fR $165,10 \pm 8,24$) quando comparadas com as fêmeas tratadas com P4 + óleo (%fR $138,52 \pm 4,95$). Entretanto, esse aumento não foi capaz de promover um aumento da resposta ventilatória (Gráfico 12).

Os animais tratados durante três dias com P4 + E2 tiveram um aumento significativo da resposta ventilatória ao CO₂ (3-dia P4 % \dot{V}_E $309,9 \pm 19,6$), comparando com as fêmeas tratadas com P4 + óleo (3-dia P4 % \dot{V}_E $237,5 \pm 12,3$) (Gráfico 12). Foi possível identificar também um aumento significativo da fR para animais tratados com P4 + E2 (3-dia P4 %fR $168,6 \pm 8,1$) quando comparada com as fêmeas tratadas com P4 + óleo (3-dia P4 %fR $136,6 \pm 6,2$) (Gráfico 12). Não foram encontradas diferenças significativas no VT.

A ventilação é um produto da frequência respiratória e do volume corrente, dessa maneira, a combinação desses hormônios parece estar atuando predominantemente na modificação da frequência respiratória para alterar a ventilação. Não houve diferença no metabolismo desses animais (Gráfico 12) demonstrando que essa não é a causa para o aumento da ventilação. Além disso, a temperatura não variou para esses animais (Gráfico 13).

O conjunto de dados referente ao experimento 3 demonstra que apenas a combinação do estradiol com a progesterona de maneira crônica (três dias com estradiol + três dias com estradiol e progesterona) foi capaz de causar um aumento expressivo ventilação durante a hipercapnia.

Gráfico 11. Resposta ventilatória de ratas Wistar em ar ambiente em diferentes condições hormonais

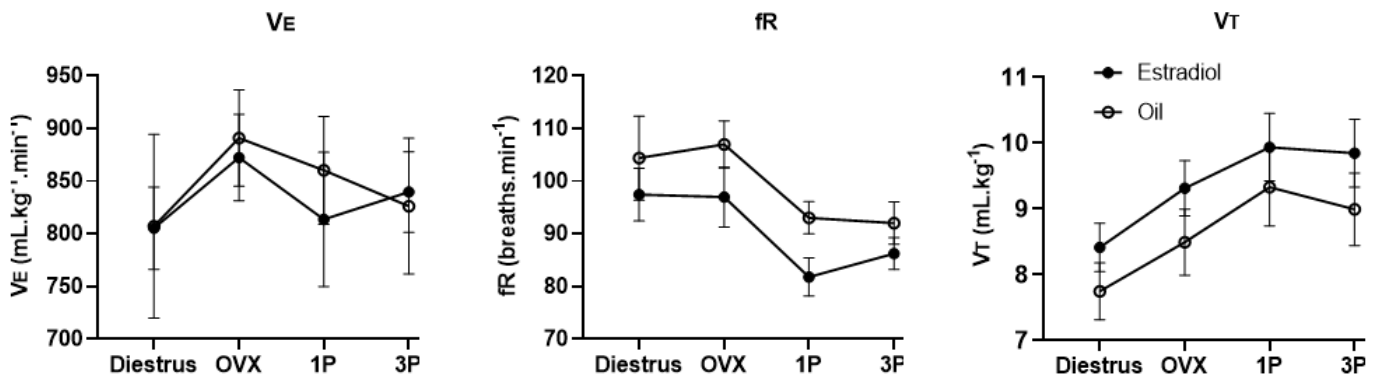


Gráfico 11. Resposta ventilatória em ar ambiente de ratas Wistar para a fase: Diestrus; após ovariectomia (OVX) em animais tratados com estradiol (círculo preenchido) e animais tratados com óleo (círculo não preenchido), após o tratamento de um dia com progesterona (1P) e após o tratamento de três dias com progesterona (3P). VE: ventilação; fR: frequência respiratória; VT: volume corrente.

Gráfico 12. Resposta ventilatória de ratas Wistar em porcentagem durante a hipercapnia em diferentes condições hormonais

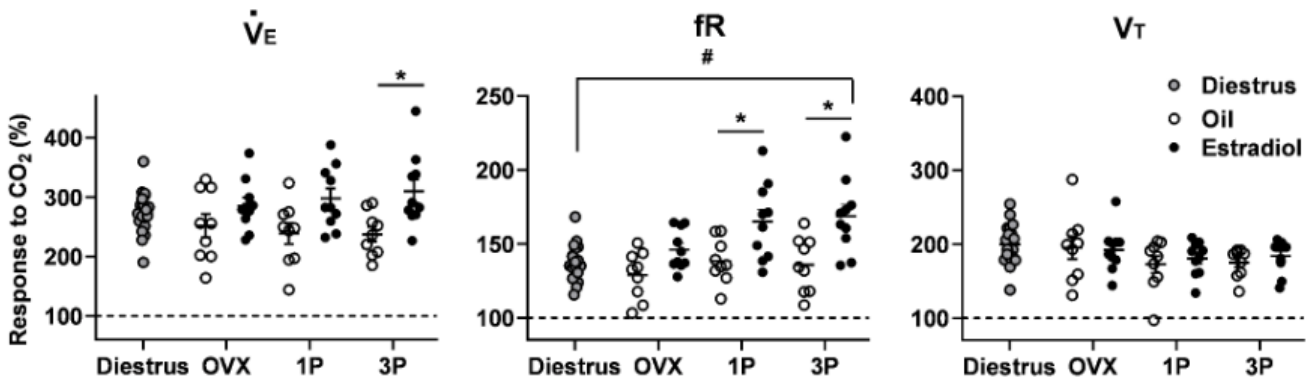


Gráfico 12. Resposta ventilatória ao CO₂ (7%) em porcentagem de ratas Wistar para a fase Diestro; após ovariectomia (OVX), animais tratados com óleo (branco) e em animais tratados com estradiol (preto), após o tratamento de um dia com progesterona (1P) e após o tratamento de três dias com progesterona (3P). \dot{V}_E : ventilação; fR: frequência respiratória; V_T : volume corrente.

Gráfico 13. Relação ventilação/consumo de O₂, metabolismo e temperatura de ratas Wistar em diferentes condições hormonais

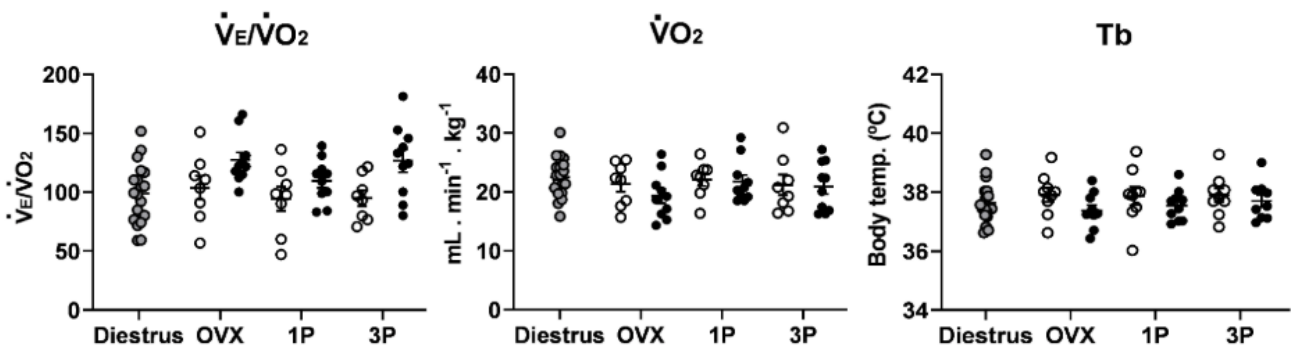


Gráfico 13. Relação ventilação/consumo de O₂ ($\dot{V}_E/\dot{V}O_2$); consumo de O₂ ($\dot{V}O_2$) e temperatura (Tb) de ratas Wistar para a fase Diestro; após ovariectomia (OVX), animais tratados com óleo (branco) e em animais tratados com estradiol (preto), após o tratamento de um dia com progesterona (1P) e após o tratamento de três dias com progesterona (3P).

5.5 ETOngestrel em diferentes concentrações

A única dose capaz de parar o ciclo estral foi a 25 μ g/0,1ml/animal como é possível observar no traçado representativo de um animal das fases do ciclo estral (Gráfico 14) e também nos dados compilados de todos os animais (Tabela 6).

Os animais controle (Tabela 3) apresentaram pouca diferença entre as fases do ciclo, sendo que antes e após o tratamento com óleo o ciclo não parou. As pequenas variações podem ter ocorrido devido ao horário fixo de observação das lâminas, o que poderia permitir a perda da observação da mudança do ciclo com pequena redução ou aumento do tempo entre cada período, além do estresse gerado pela aplicação do óleo.

Gráfico 14. Figura representativa das fases do ciclo estral durante 21 dias

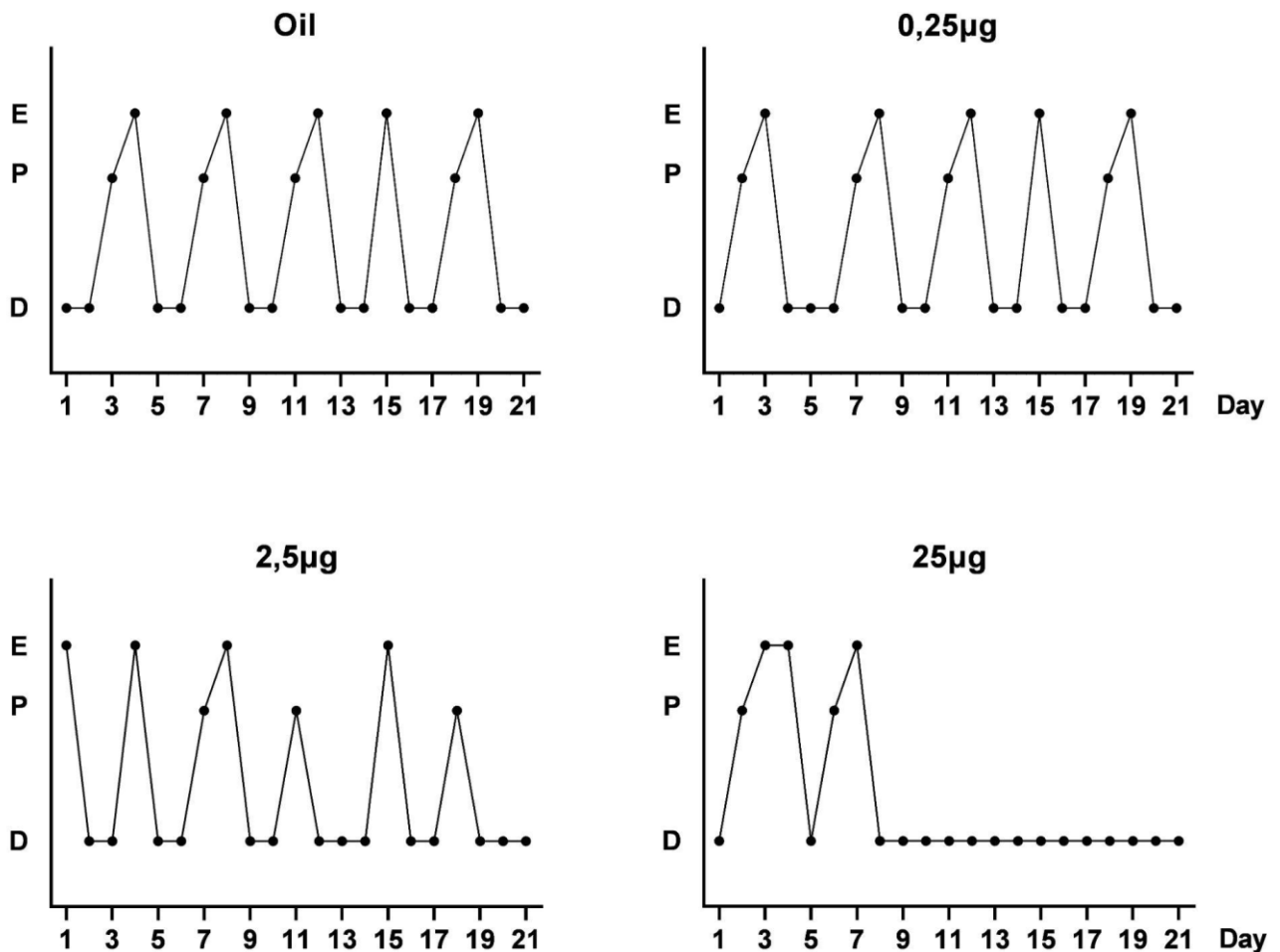


Gráfico 14. Figura representativa das fases do ciclo estral para um animal tratado durante 21 dias para ratas tratadas com óleo (Oil); com ETO 0,25 μ g/0.1 mL/ animal (0,25 μ g); com ETO 2,5 μ g/0,1 mL/ animal (2,5 μ g) e com ETO 25 μ g/0,1 mL/ animal s.c (25 μ g). D: Diestro; P: Proestro; E: Estro.

Tabela 3. Tabela esquemática da variação do ciclo estral dos animais controle

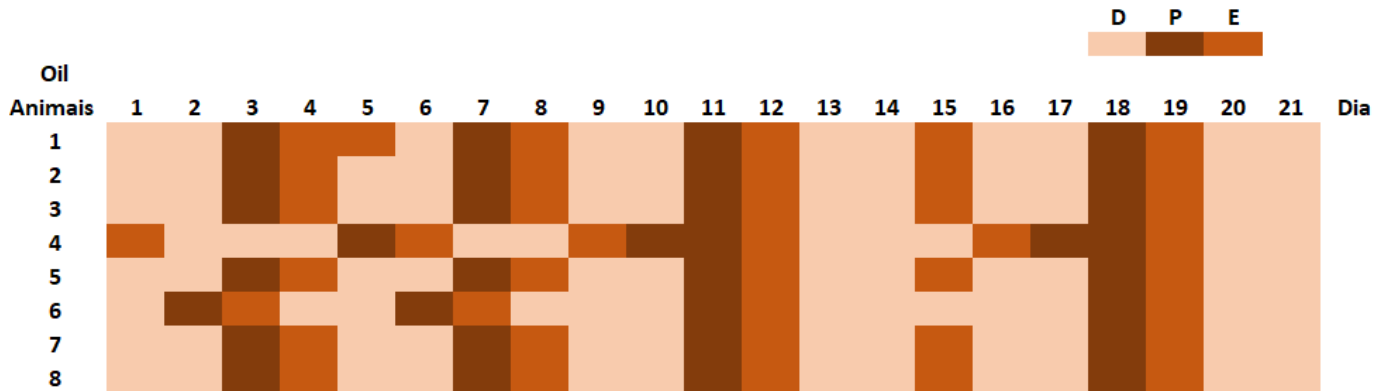


Tabela 3. Fases do ciclo estral das ratas Wistar durante 21 dias. Cada linha horizontal representa um animal. Cada linha vertical representa um dia. Cada fase do ciclo foi representada por uma cor: Diestro (D); Proestro (P); Estro (E).

Tabela 4. Tabela esquemática da variação do ciclo estral dos animais tratados com a dose 0,25µg/0,1ml/animal

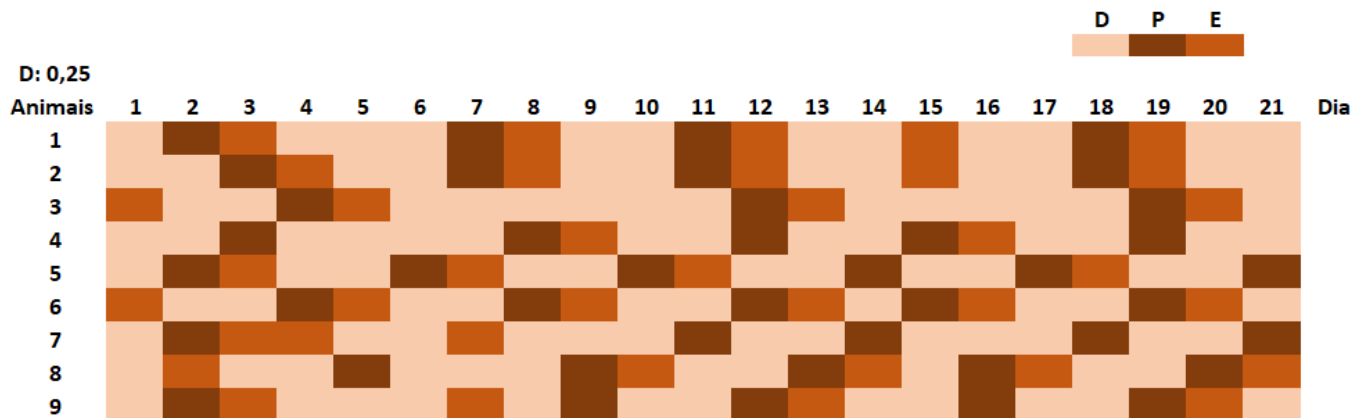


Tabela 4. Fases do ciclo estral das ratas Wistar durante 21 dias. Cada linha horizontal representa um animal. Cada linha vertical representa um dia. Cada fase do ciclo foi representada por uma cor: Diestro (D); Proestro (P); Estro (E). D: 0,25: ETO 0,25µg/0,1 mL/ animal.

Tabela 5. Tabela esquemática da variação do ciclo estral dos animais tratados com a dose 2,5µg/0,1ml/animal

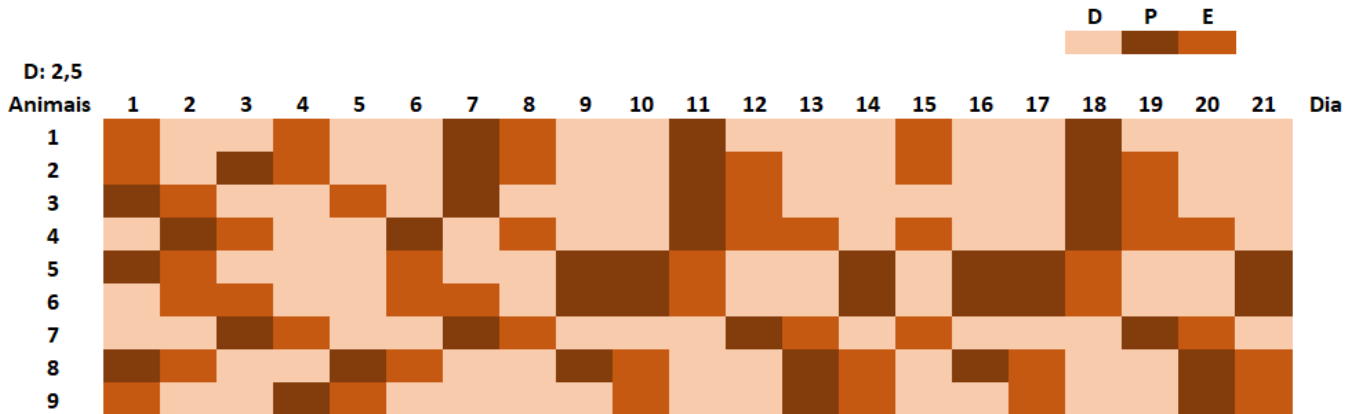


Tabela 5. Fases do ciclo estral das ratas Wistar durante 21 dias. Cada linha horizontal representa um animal. Cada linha vertical representa um dia. Cada fase do ciclo foi representada por uma cor: Diestro (D); Proestro (P); Estro (E). D: 2,5: ETO 2,5µg/0,1 mL/ animal.

Tabela 6. Tabela esquemática da variação do ciclo estral dos animais tratados com a dose 25µg/0,1ml/animal

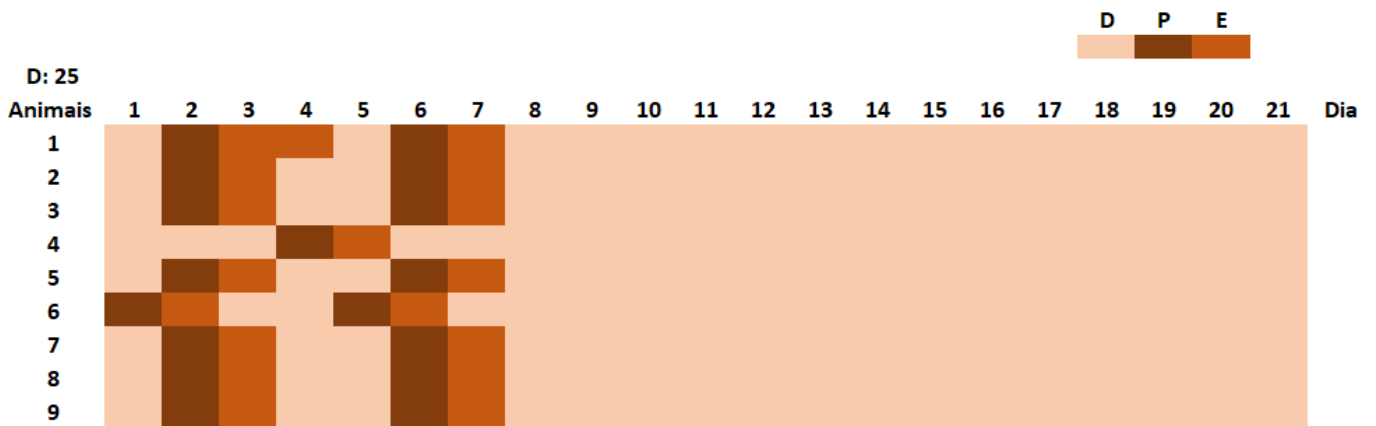


Tabela 6. Fases do ciclo estral das ratas Wistar durante 21 dias. Cada linha horizontal representa um animal. Cada linha vertical representa um dia. Cada fase do ciclo foi representada por uma cor: Diestro (D); Proestro (P); Estro (E). D: 25: ETO 25µg/0,1 mL/ animal.

5.6 ETOngestrel e estradiol aumentam a resposta ventilatória de fêmeas Wistar à hipercapnia

Os animais de todos os grupos apresentaram resposta ventilatória à hipercapnia, ou seja, houve aumento da \dot{V}_E quando expostos a 7% de CO_2 (Gráfico 15). Entretanto, o aumento da resposta ventilatória à hipercapnia em porcentagem foi maior para as fêmeas tratadas com ETO e estradiol ($\text{P+E } \% \dot{V}_E 294,3 \pm 9,02\%$) comparadas com os outros grupos, como pode ser observado no Gráfico 15.

Não houve diferença estatística para a f_R entre os grupos. Quando comparados, o grupo P+E apresentou um aumento da resposta ventilatória mais pronunciada com relação às doses 2,5 e 250, o que refletiu na diferença estatística dos valores para o V_T ($\text{P+E } \%V_T 220,07 \pm 12,52\%$). Não houve diferença estatística entre os grupos para o metabolismo dos animais, nem para a temperatura.

O conjunto de dados referente ao experimento 4 demonstra que o estradiol foi capaz de promover aumento da resposta ventilatória em porcentagem à hipercapnia de animais Wistar em uso da progestina.

Gráfico 15. Resposta ventilatória de ratas Wistar tratadas com ETO

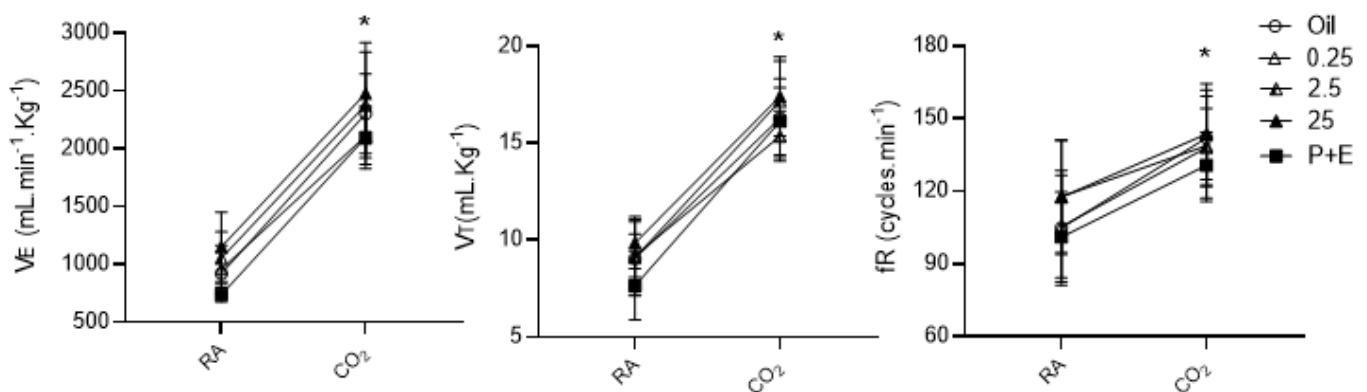


Gráfico 15. Resposta ventilatória (\dot{V}_E em mL/min/Kg) de ratas Wistar tratadas com ETO em ar ambiente e em resposta à hipercapnia (7% CO_2). óleo (Oil); com ETO 0,25 $\mu\text{g}/0,1$ mL/ animal (0,25); com ETO 2,5 $\mu\text{g}/0,1$ mL/ animal (2,5); com ETO 25 $\mu\text{g}/0,1$ mL/ animal s.c (25); com ETO 250 $\mu\text{g}/0,1$ mL/ animal combinado com estradiol (P+E). RA: ar ambiente; CO_2 : hipercapnia.

Gráfico 16. Resposta ventilatória em porcentagem durante a hipercapnia de ratas Wistar tratadas com ETO

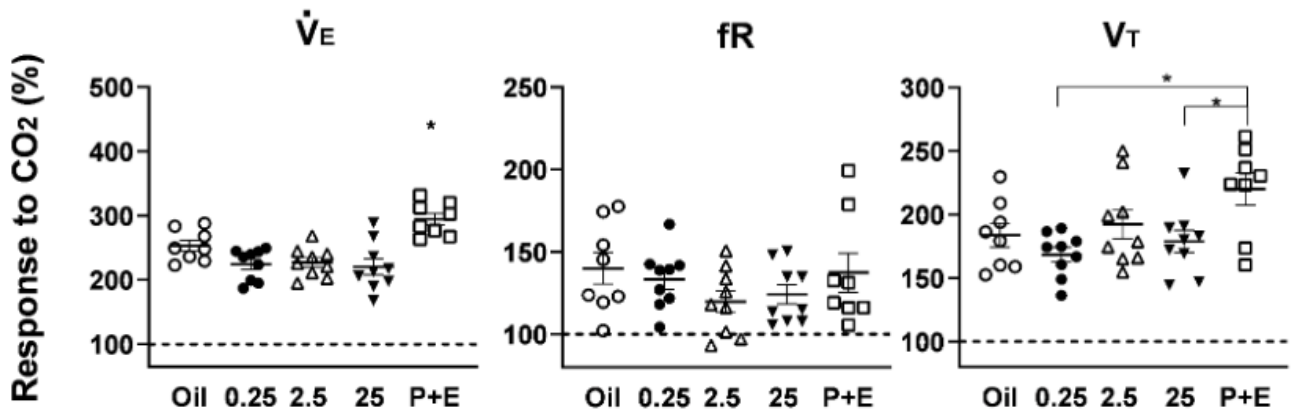


Gráfico 16. Resposta ventilatória ao CO_2 (7%) em porcentagem de ratas Wistar tratadas com óleo (Oil); com ETO 0,25 $\mu\text{g}/0,1$ mL/ animal (0.25); com ETO 2,5 $\mu\text{g}/0,1$ mL/ animal (2.5); com ETO 250 $\mu\text{g}/0,1$ mL/ animal s.c (25); com ETO 250 $\mu\text{g}/0,1$ mL/ animal combinado com estradiol (P+E). \dot{V}_E : ventilação; fR: frequência respiratória; V_T : volume corrente.

Gráfico 17. Relação ventilação/consumo de O_2 , metabolismo e temperatura de ratas Wistar durante a hipercapnia em diferentes concentrações do ETO

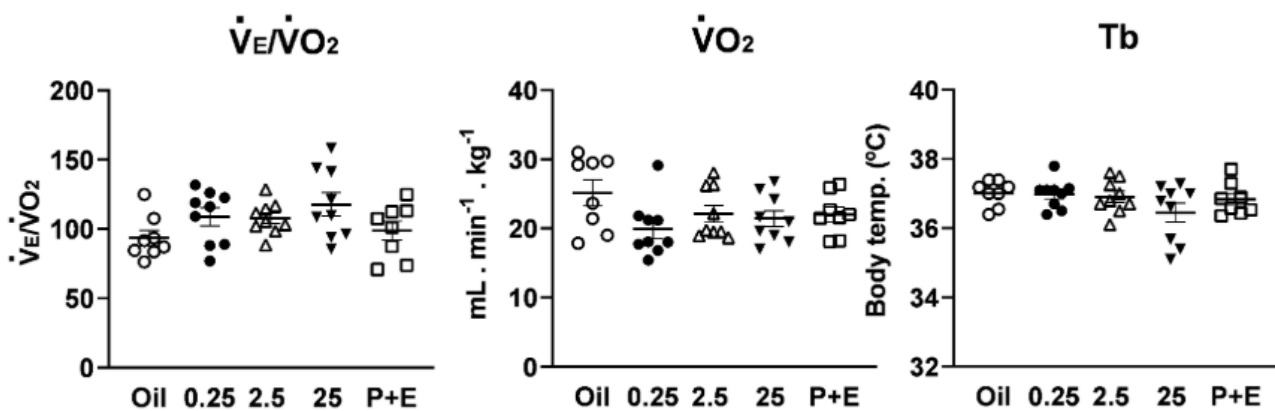


Gráfico 17. Consumo de O_2 e temperatura de ratas Wistar tratadas com óleo (Oil); com ETO 0,25 $\mu\text{g}/0,1$ mL/ animal (0.25); com ETO 2,5 $\mu\text{g}/0,1$ mL/ animal (2.5); com ETO 250 $\mu\text{g}/0,1$ mL/ animal s.c (25); com ETO 250 $\mu\text{g}/0,1$ mL/ animal combinado com estradiol (P+E).

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, nós demonstramos que o aumento da concentração endógena da P4 não foi capaz de promover um aumento da resposta ventilatória à hipercapnia. Além disso, o E2 foi necessário para induzir o aumento da resposta ventilatória à hipercapnia, em animais tratados com progesterona e progestina. Não foram reportadas alterações significativas na temperatura e no consumo de oxigênio dos animais quando expostos à hipercapnia e nem frente às diferentes situações de concentração de P4.

O ciclo estral foi acompanhado durante 12 dias antes da realização da cirurgia para garantir que os animais utilizados estavam com ciclo estral regular. Dessa maneira, conseguimos garantir que qualquer alteração que ocorreu posterior às medidas ventilatórias e ou aos procedimentos cirúrgicos não ocorreram em prol de qualquer alteração hormonal prévia nos animais utilizados.

Todos os animais utilizados tiveram aumento da resposta ventilatória quando expostos à hipercapnia. Durante a hipercapnia ocorre alterações da PaCO₂ e do pH interno resultando em alterações na ventilação alveolar na tentativa de retornar aos valores basais (Georgopoulos et al., 2024). O aumento inspirado do CO₂ gera, através de um mecanismo de feedback, um aumento da resposta ventilatória, portanto, as alterações da ventilação representam a atividade adequada dos quimiorreceptores centrais e periféricos, sensores capazes de detectar variação dos gases que levam informações aferentes para ajustar de maneira adequada a ventilação alveolar (Del Negro; Funk; Feldman, 2018). Os nossos resultados demonstraram que os animais tiveram aumento da resposta ventilatória frente ao estímulo hipercápnico. Essa resposta demonstra a presença e ativação dos quimiorreceptores em todos os animais.

6.1 Ciclo estral e pseudoprenhez: ventilação, temperatura corporal e metabolismo em normocapnia e hipercapnia

Foi reportada na literatura a relação da hiperventilação com as alterações hormonais durante a fase lútea e a gravidez (Lyons, 1976; Schoene et al., 1981). Todavia, contrário à nossa expectativa, não houve variação da resposta ventilatória em ar ambiente e em resposta ao CO₂ durante as fases do ciclo estral avaliadas neste estudo. Marques et al., 2015 demonstraram que não haviam variações das respostas ventilatórias à hipercapnia durante as fases do ciclo estral e complementar a isso o nosso estudo demonstrou que essas variações não ocorrem especificamente nos períodos caracterizados pelo aumento dos níveis de progesterona endógena, sugerindo pouca (ou nenhuma) influência das variações cíclicas dos hormônios sexuais endógenos no controle respiratório. Considerando que a progesterona já se mostrou

eficaz na potencialização da resposta ventilatória, é possível que esses resultados se devam à menor concentração de progesterona circulante em ratas, comparado com a maioria dos outros mamíferos ou que exista algum mecanismo compensatório que mantém a resposta ventilatória estável ao longo do ciclo (Marques et al., 2017).

A temperatura no ar ambiente foi atenuada na fase AP do ciclo estral em comparação a fase MD. Todavia, essa variação não alterou os parâmetros ventilatórios dos animais nas diferentes fases do ciclo. Durante a hipercapnia não houve alteração da temperatura durante as diferentes fases do ciclo analisadas, além disso, o metabolismo dos animais foi pouco influenciado pela hipercapnia. Outros estudos demonstraram o aumento da temperatura durante a fase estro (Kent; Hurd; Satinoff, 1991; Marques et al., 2015). Entretanto, nosso estudo não englobou a avaliação da temperatura na fase estro.

No presente estudo, não foram realizadas dosagens de progesterona plasmática para confirmar a sua elevação ao longo do ciclo estral. Este pode ser um aspecto importante a ser considerado. Entretanto, vale mencionar que as oscilações hormonais ao longo do ciclo são um processo fisiológico bem descrito e bastante consistente na literatura (Smith; Freeman; Neill, 1975). Durante o diestro 1 ou metaestro os níveis de estradiol começam a aumentar de valores basais 7 pg/mL para aproximadamente 15–20 pg/mL e permanecem neste valor até atingir um pico, alcançando seu nível máximo de 40–50 pg/mL às 09:00 no proestro. Posterior a isso os níveis de estradiol começam a diminuir enquanto que ocorre um aumento da secreção de LH, assim, os níveis de estradiol retornam ao seu nível basal durante a fase estro. A secreção de progesterona pelo corpo lúteo aumenta na tarde do diestro 1 ou metaestro atingindo valores de 25–30 ng/mL no início da manhã do diestro 2. Após, ocorre uma queda acentuada nos níveis de progesterona, retornando aos valores basais de 5–10 ng/mL até as 07h00 do diestro 2, significando a regressão do corpo lúteo. A progesterona permanece baixa até a tarde do proestro onde ocorre pico de prolactina, LH, FSH e progesterona (Smith; Freeman; Neill, 1975).

Diferente do que ocorre durante o ciclo estral, no qual o corpo lúteo secreta progesterona por apenas 2 a 3 dias antes de regredir. A estimulação cervical promove a secreção contínua de progesterona por cerca de 12 dias induzindo aumentos hormonais (Pepe; Rothchild, 1974). A pseudoprenhez permite a modificação de um corpo lúteo e é determinada por fatores hormonais, principalmente devido ao padrão de secreção de prolactina (Smith; Freeman; Neill, 1975). O neuro hormônio, ocitocina, também tem seus níveis aumentados na estimulação cervical. Estudos anteriores demonstraram o aumento da ocitocina durante a pseudoprenhez (McKee et al., 2007) e segundo Mack et al., uma subpopulação de neurônios magnocelulares ocitocinérgicos forneceriam entradas mono sinápticas para a região do pré-BötC estimulando a

resposta ventilatória (Mack et al., 2002). Dessa maneira, nossa hipótese foi de que esse aumento endógeno das concentrações de progesterona poderiam promover um aumento da resposta ventilatória. Entretanto, contrária a nossa perspectiva na condição de pseudoprenhez que leva à alteração hormonal, também não houve diferença nas respostas ventilatórias em ar ambiente e em hipercapnia.

Os animais incluídos no estudo, após a estimulação mecânica do cérvix uterino, foram apenas os que não continuaram com o ciclo estral, sendo as células do esfregaço caracterizadas pela presença de leucócitos, determinando a fase diestro durante todo o período da pseudoprenhez. Os dados da alta concentração plasmática de progesterona durante o PP9 confirmam a efetiva indução da pseudoprenhez. Devido à variação das concentrações de progesterona plasmática entre os animais no PP9, realizamos avaliação da resposta ventilatória retirando os quatro animais com valores mais baixos de progesterona, devido à ausência de alteração estatística, os dados dos animais foram mantidos. Dessa maneira, mesmo com aumento expressivo da progesterona de maneira endógena os parâmetros ventilatórios não foram alterados.

Os nossos resultados demonstraram que o aumento dos níveis de progesterona endógena, em duas condições distintas, ou seja, durante o ciclo estral ou durante a pseudoprenhez estimulada não foram capazes de alterar a resposta ventilatória dos animais Wistar. Portanto, decidimos investigar possíveis alterações com a aplicação exógena de progesterona.

6.2 Ovariectomia, reposição hormonal e ETOnogestrel: ventilação, temperatura corporal e metabolismo em normocapnia e hipercapnia

Nossos resultados mostraram que mesmo em ratas ovariectomizadas com a reposição exógena de progesterona, esta isoladamente, não foi capaz de alterar a resposta ventilatória dos animais Wistar. Na literatura foi possível identificar estudos sobre o efeito da progesterona na ventilação desde 1905. As alterações ventilatória reportadas causadas pelo aumento da concentração plasmática de progesterona foi de redução da PaCO₂ e consequente hiperventilação, tanto para mulheres, quanto para outras espécies animais (Bayliss; Cidlowski; Millhorn, 1990; Machida, 1981; Schoene et al., 1981). É importante ressaltar que existem receptores para progesterona em áreas responsáveis pela modulação da respiração no SNC e inclusive em quimiorreceptores periféricos que atuam como sensores e participam também da modulação do padrão ventilatório (Bayliss; Millhorn, 1992; Hannhart; Pickett; Moore, 1990).

Entretanto, ao avaliarmos as ratas OVX, a progesterona isoladamente não gerou efeito no padrão da resposta ventilatória desses animais.

O E2 promoveu aumento do peso do útero. O estradiol e a progesterona controlam a função do trato reprodutivo nas mulheres e o estradiol-17 β exerce hipertrofia celular e hiperplasia no útero por meio de uma série de alterações bioquímicas para preparar as células uterinas para a possibilidade de gravidez (Nephew et al., 2000). Os receptores nucleares de estrogênio (ER) são responsáveis pelas ações de E2, onde as proteínas reguladoras atuam como dímeros em genes-alvo específicos contendo sequências de DNA definidas. A maior parte do efeito do estrogênio no útero é dependente do ER, onde o resultado é a indução ou supressão de genes responsivos (MK, 2002).

Apesar dos efeitos ausentes no metabolismo e na temperatura, a combinação de progesterona com estradiol aumentou a ventilação em resposta à hipercapnia. Nossos resultados mostraram um aumento na fR no tratamento agudo com P4 de 1 dia, mas que não foi capaz de alterar a ventilação. Enquanto isso, após 3 dias-P4, a ventilação aumentou como resultado de uma combinação de estradiol e progesterona de maneira crônica. Foi reportado na literatura o aumento expressivo da atividade do nervo frênico para gatas ovariectomizadas com reposição de progesterona combinada com estradiol (Bayliss; Millhorn, 1992), entretanto, essa foi a primeira vez que observamos o aumento da resposta ventilatória frente a hipercapnia em modelo in vivo com a combinação da progesterona e estradiol.

Ademais, a progesterona pode exercer seu efeito através dos receptores de membrana ou nucleares. O aumento da resposta ventilatória à hipercapnia em camundongos parece ser mediado pelos receptores nucleares de progesterona (nPR) (Marcouiller et al., 2014). Os nPRs pertencem a uma superfamília de receptores esteroidais e pode ser encontrado em diversas áreas do sistema nervoso central e periférico que estão envolvidas no controle da ventilação, incluindo o NTS (Brinton et al., 2008). Os efeitos da P4 são mediados principalmente pelo receptor clássico, nPR, mas também pelo mPR (Loiseau et al., 2014). Os efeitos no receptor nuclear têm início lento de minutos a horas e são duradouros. Por outro lado, os receptores de membrana têm início rápido, em segundos, e seus efeitos são de curta duração. O aumento da ventilação no tratamento P4 de 3 dias sugere que o hormônio provavelmente está ativando o nRP. Essas conclusões são apoiadas por trabalhos que mostraram que o tratamento com P4 melhorou a ventilação em ratos do tipo selvagem, mas não em ratos que não tinham o nPR (Marcouiller et al., 2014).

Nossos resultados também demonstraram que a progesterina sozinha não é capaz de alterar a resposta ventilatória de ratas Wistar. Nós realizamos a aplicação do ETO por 21 dias através da injeção subcutânea. Existem outros métodos de administração da progesterina no animal, como exemplo por implante de cápsulas também capazes de liberar a progesterina na quantidade adequada. Entretanto, através das injeções, foi possível a utilização e teste das diferentes doses definidas para este experimento. O que podemos garantir, é que o estresse gerado pelas aplicações nos animais tratados foi o mesmo dos animais controle que receberam a injeção contendo óleo.

Evidências anteriores em mulheres mostraram que a progesterina seria capaz de alterar a ventilação (Straus et al., 2010). No entanto, em nosso experimento, as doses utilizadas e o tempo do experimento não foram suficientes para causar alterações na ventilação em normocapnia, como demonstrado por Cardani et al., (Cardani et al., 2022). As diferentes doses escolhidas para este trabalho foram importantes pois permitiram avaliar possíveis efeitos adversos com relação às diferentes dosagens. Foi possível reportar que a maior dose utilizada foi a única capaz de parar o ciclo estral, permitindo chegar ao efeito desejado com o uso de um contraceptivo. Esse efeito permitiu a escolha da dose adequada para realizar a combinação com o estradiol. Foi demonstrado na literatura que a progesterina poderia atuar reduzindo o número de receptores de progesterona, assim, sua redução causada pela progesterina sozinha poderia influenciar na ausência do efeito estimulatório sobre a ventilação em baixas doses (Brodeur et al., 1986).

O aumento da porcentagem da ventilação ocorreu pelo ajuste tanto do VT quanto da fR em conjunto, entretanto, para alguns grupos, ocorreu maior redução do volume corrente quando comparado aos animais tratados com estradiol. Não foram reportadas outras alterações como no consumo de oxigênio, temperatura e peso dos animais.

6.3 Limitações e pontos fortes

Nosso trabalho tem limitações. Primeiro, não registramos o estado de sono-vigília do animal. Dependendo do estado de sono, há alterações respiratórias significativas, por exemplo, no sono sem o movimento rápido dos olhos (REM), a respiração é altamente dependente de quimiossensores específicos. Além disso, não medimos os níveis séricos de progesterona para dar mais explicações sobre as diferenças entre o tratamento com progesterona de 1 e 3 dias. Como lado negativo dessa abordagem, a coleta de sangue estressa os ratos, induzindo a produção de esteróides, que se ligam a receptores de esteróides que pertencem à mesma classe do nRP e podem interferir em nossos dados.

Nossos protocolos nos permitiram analisar os efeitos *in vivo* (e em estado não anestesiado) da progesterona, progestina e do estradiol, separadamente, na respiração, bem como seu efeito combinado. Este é o primeiro experimento que conhecemos a mostrar os efeitos da pseudoprenhez na ventilação. Além disso, fornecemos uma série de evidências para estabelecer a rata Wistar como modelo para o estudo da ação da progesterona no controle neural da respiração, testado em diferentes protocolos e tipos de progesterona. Finalmente, até onde sabemos, este é o primeiro experimento a mostrar que a ação do P4 é dependente do tratamento com E2.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A resposta ventilatória à hipercapnia não foi alterada durante as diferentes condições fisiológicas nas quais o aumento da progesterona é bem reportado, ou seja, ao longo do ciclo estral e na pseudoprenhez. Bem como não foram observadas diferenças com a administração exógena de progesterona e em diferentes doses da progestina (Etonogestrel). Demonstramos que tanto a combinação da progesterona exógena e da progestina com o estradiol foram capazes de promover um aumento significativo da resposta ventilatória à hipercapnia.

O presente estudo consiste de uma avaliação sistemática sobre o papel da progesterona no controle respiratório e contribui para elucidação da modulação da progesterona na ventilação, metabolismo e temperatura em fêmeas Wistar. Mais investigações são necessárias para compreensão dos efeitos e mecanismos da progesterona na ventilação que possam desenvolver efeito terapêutico para desordens respiratórias.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALHEID, George F.; MILSOM, William K.; MCCRIMMON, Donald R. Pontine influences on breathing: an overview. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 143, n. 2–3, p. 105–114, 15 nov. 2004.
- AMIEL, Jeanne *et al.* Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. **Nature Genetics**, v. 33, n. 4, p. 459–461, abr. 2003.
- BAYLISS, D. A. *et al.* Progesterone stimulates respiration through a central nervous system steroid receptor-mediated mechanism in cat. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 21, p. 7788–7792, nov. 1987.
- 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**, v. 126, n. 1, p. 519–527, jan. 1990.
- BAYLISS, D. A.; MILLHORN, D. E. Central neural mechanisms of progesterone action: application to the respiratory system. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 73, n. 2, p. 393–404, ago. 1992.
- BEHAN, Mary; KINKEAD, Richard. Neuronal control of breathing: sex and stress hormones. **Comprehensive Physiology**, v. 1, n. 4, p. 2101–2139, out. 2011.
- BIANCHI, A. L.; DENAVIT-SAUBIÉ, M.; CHAMPAGNAT, J. Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. **Physiological Reviews**, v. 75, n. 1, p. 1–45, jan. 1995.
- BIRZNIECE, Vita *et al.* Neuroactive steroid effects on cognitive functions with a focus on the serotonin and GABA systems. **Brain Research Reviews**, v. 51, n. 2, p. 212–239, ago. 2006.
- BOUKARI, Ryma *et al.* Membrane progesterone receptor- β , but not $-\alpha$, in dorsal brain stem establishes sex-specific chemoreflex responses and reduces apnea frequency in adult mice. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 121, n. 3, p. 781–791, 1 set. 2016.
- BOUKARI, Ryma; MARCOUILLER, François; JOSEPH, Vincent. Relative Contribution of Nuclear and Membrane Progesterone Receptors in Respiratory Control. *In*: PEERS, Chris *et al.* (Orgs.). **Arterial Chemoreceptors in Physiology and Pathophysiology**. Cham: Springer International Publishing, 2015. p. 261–267.
- BRINTON, Roberta Diaz *et al.* Progesterone receptors: form and function in brain. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 29, n. 2, p. 313–339, maio 2008.
- BRODEUR, P. *et al.* Progesterone receptors and ventilatory stimulation by progestin. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 60, n. 2, p. 590–595, fev. 1986.
- CARDANI, Silvia *et al.* Etonogestrel Administration Reduces the Expression of PHOX2B and Its Target Genes in the Solitary Tract Nucleus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, p. 4816, 27 abr. 2022.
- DEL NEGRO, Christopher A.; FUNK, Gregory D.; FELDMAN, Jack L. Breathing matters. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 6, p. 351–367, jun. 2018.

- DEMPSEY, Jerome A.; OLSON JR., E. Burt; SKATRUD, James B. Hormones and Neurochemicals in the Regulation of Breathing. *In: Comprehensive Physiology*. [S.l.]: John Wiley & Sons, Ltd, 2011. p. 181–221.
- DRIVER, Helen S. *et al.* The influence of the menstrual cycle on upper airway resistance and breathing during sleep. **Sleep**, v. 28, n. 4, p. 449–456, abr. 2005.
- DUBREUIL, Véronique *et al.* A human mutation in Phox2b causes lack of CO₂ chemosensitivity, fatal central apnea, and specific loss of parafacial neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 3, p. 1067–1072, 22 jan. 2008.
- EZURE, Kazuhisa; TANAKA, Ikuko; KONDO, Masahiro. Glycine is used as a transmitter by decrementing expiratory neurons of the ventrolateral medulla in the rat. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 26, p. 8941–8948, 1 out. 2003.
- FELDMAN, Jack L.; DEL NEGRO, Christopher A.; GRAY, Paul A. Understanding the rhythm of breathing: so near yet so far. **Annual review of physiology**, v. 75, p. 423–452, 2013.
- FELDMAN, Jack L.; MITCHELL, Gordon S.; NATTIE, Eugene E. Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. **Annual Review of Neuroscience**, v. 26, p. 239–266, 2003.
- FREEMAN, M. E. *et al.* Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 4, p. 1523–1631, out. 2000.
- GARCIA, Natalia M.; WALKER, Rosemary S.; ZOELLNER, Lori A. Estrogen, progesterone, and the menstrual cycle: A systematic review of fear learning, intrusive memories, and PTSD. **Clinical Psychology Review**, v. 66, p. 80–96, dez. 2018.
- GARG, Deepika *et al.* Progesterone-Mediated Non-Classical Signaling. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 28, n. 9, p. 656–668, set. 2017.
- GARGAGLIONI, Luciane H.; HARTZLER, Lynn K.; PUTNAM, Robert W. The locus coeruleus and central chemosensitivity. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 173, n. 3, p. 264–273, 31 out. 2010.
- GEORGOPOULOS, Dimitrios *et al.* Respiratory drive: a journey from health to disease. **Journal of Intensive Care**, v. 12, n. 1, p. 15, 22 abr. 2024.
- GOROSPE, W. C.; FREEMAN, M. E. The imprint provided by cervical stimulation for the initiation and maintenance of daily prolactin surges: modulation by the uterus and ovaries. **Endocrinology**, v. 110, n. 6, p. 1866–1870, jun. 1982.
- GREER, John J.; FUNK, Gregory D. Respiration. *In: PFAFF, Donald W.; VOLKOW, Nora D. (Orgs.). Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical*. New York, NY: Springer, 2016. p. 1557–1597.
- HANNHART, B.; PICKETT, C. K.; MOORE, L. G. Effects of estrogen and progesterone on carotid body neural output responsiveness to hypoxia. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 68, n. 5, p. 1909–1916, maio 1990.

- HELENA, Cleyde Vanessa Vega *et al.* Changes in alpha-estradiol receptor and progesterone receptor expression in the locus coeruleus and preoptic area throughout the rat estrous cycle. **The Journal of Endocrinology**, v. 188, n. 2, p. 155–165, fev. 2006.
- ICEMAN, Kimberly E.; RICHERSON, George B.; HARRIS, Michael B. Medullary serotonin neurons are CO₂ sensitive in situ. **Journal of Neurophysiology**, v. 110, n. 11, p. 2536–2544, dez. 2013.
- JANCZEWSKI, Wiktor A.; FELDMAN, Jack L. Distinct rhythm generators for inspiration and expiration in the juvenile rat. **The Journal of Physiology**, v. 570, n. Pt 2, p. 407–420, 15 jan. 2006.
- JANES, Tara A. *et al.* Etonogestrel promotes respiratory recovery in an in vivo rat model of central chemoreflex impairment. **Acta Physiologica**, v. 240, n. 4, p. e14093, 2024.
- JIA, Shuping *et al.* Chronic intermittent hypoxia enhances glycinergic inhibition in nucleus tractus solitarius. **Journal of Neurophysiology**, v. 128, n. 6, p. 1383–1394, dez. 2022.
- JOSEPH, V.; NIANE, L. M.; BAIRAM, A. Antagonism of progesterone receptor suppresses carotid body responses to hypoxia and nicotine in rat pups. **Neuroscience**, v. 207, p. 103–109, 5 abr. 2012.
- KENT, S.; HURD, M.; SATINOFF, E. Interactions between body temperature and wheel running over the estrous cycle in rats. **Physiology & Behavior**, v. 49, n. 6, p. 1079–1084, jun. 1991.
- KUBIN, Leszek *et al.* Central pathways of pulmonary and lower airway vagal afferents. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 101, n. 2, p. 618–627, ago. 2006.
- LAHIRI, S. *et al.* Oxygen sensing in the body. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 91, n. 3, p. 249–286, 1 jul. 2006.
- LEIRÃO, Isabela P. *et al.* Hypercapnia-induced active expiration increases in sleep and enhances ventilation in unanaesthetized rats. **The Journal of Physiology**, v. 596, n. 15, p. 3271–3283, ago. 2018.
- LOISEAU, Camille *et al.* The progestin etonogestrel enhances the respiratory response to metabolic acidosis in newborn rats. Evidence for a mechanism involving supramedullary structures. **Neuroscience Letters**, v. 567, p. 63–67, 1 maio 2014.
- LUMB, Andrew B.; HORNER, Deborah. Chapter 25 - Pulmonary Physiology. *In*: HEMMINGGS, Hugh C.; EGAN, Talmage D. (Orgs.). **Pharmacology and Physiology for Anesthesia**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2013. p. 445–457.
- LYONS, Harold A. Centrally acting hormones and respiration. **Pharmacology & Therapeutics. Part B: General and Systematic Pharmacology**, v. 2, n. 4, p. 743–751, 1 jan. 1976.
- MACHIDA, H. Influence of progesterone on arterial blood and CSF acid-base balance in women. **Journal of Applied Physiology**, v. 51, n. 6, p. 1433–1436, dez. 1981.
- MACK, S. O. *et al.* Paraventricular oxytocin neurons are involved in neural modulation of

breathing. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 92, n. 2, p. 826–834, fev. 2002.

MALAN, A. Ventilation measured by body plethysmography in hibernating mammals and in poikilotherms. **Respiration Physiology**, v. 17, n. 1, p. 32–44, jan. 1973.

MALONEY, Melissa A. *et al.* Congenital central hypoventilation syndrome: diagnosis and management. **Expert Review of Respiratory Medicine**, v. 12, n. 4, p. 283–292, abr. 2018.

MARCOUILLER, François *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**, v. 9, n. 6, p. e100421, 19 jun. 2014.

MARQUES, Danuzia A. *et al.* Ventilatory, metabolic, and thermal responses to hypercapnia in female rats: effects of estrous cycle, ovariectomy, and hormonal replacement. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 119, n. 1, p. 61–68, 1 jul. 2015.

MARQUES, Danuzia A. *et al.* Influence of estrous cycle hormonal fluctuations and gonadal hormones on the ventilatory response to hypoxia in female rats. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 469, n. 10, p. 1277–1286, 1 out. 2017.

MCKEE, De'Nise T. *et al.* Oxytocin action at the lactotroph is required for prolactin surges in cervically stimulated ovariectomized rats. **Endocrinology**, v. 148, n. 10, p. 4649–4657, out. 2007.

MK, Lindberg. Estrogen receptor specificity for the effects of estrogen in ovariectomized mice. **Journal of Endocrinology**, v. 174, p. 167–178, 1 ago. 2002.

NATTIE, E. E. Central chemosensitivity, sleep, and wakefulness. **Respiration Physiology**, v. 129, n. 1–2, p. 257–268, dez. 2001.

NEPHEW, Kenneth P. *et al.* Effect of Estradiol on Estrogen Receptor Expression in Rat Uterine Cell Types I. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 1, p. 168–177, 1 jan. 2000.

PADDEU, Erika Maria *et al.* Sleeping problems in mothers and fathers of patients suffering from congenital central hypoventilation syndrome. **Sleep & Breathing = Schlaf & Atmung**, v. 19, n. 3, p. 1057–1064, set. 2015.

PAGLIARDINI, Silvia *et al.* Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult anesthetized rats. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 31, n. 8, p. 2895–2905, 23 fev. 2011.

PEPE, G. J.; ROTHCHILD, I. A comparative study of serum progesterone levels in pregnancy and in various types of pseudopregnancy in the rat. **Endocrinology**, v. 95, n. 1, p. 275–279, jul. 1974.

POPOVIC, R. M.; WHITE, D. P. Upper airway muscle activity in normal women: influence of hormonal status. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 84, n. 3, p. 1055–1062, mar. 1998.

RAMIREZ, Jan-Marino; BAERTSCH, Nathan. Defining the Rhythmogenic Elements of Mammalian Breathing. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 33, n. 5, p. 302–316, 1 set. 2018.

RANDALL, David J. *et al.* **Eckert animal physiology : mechanisms and adaptations.** [S.l.]: New York : W.H. Freeman and Co., 2002.

ROMEO, Russell D.; BELLANI, Rudy; MCEWEN, Bruce S. Stress-induced progesterone secretion and progesterone receptor immunoreactivity in the paraventricular nucleus are modulated by pubertal development in male rats. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, v. 8, n. 4, p. 265–271, dez. 2005.

SCHINDLER, Adolf E. *et al.* Classification and pharmacology of progestins. **Maturitas**, v. 46 Suppl 1, p. S7–S16, 10 dez. 2003.

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

SINGH, Meharvan; SU, Chang; NG, Selena. Non-genomic mechanisms of progesterone action in the brain. **Frontiers in Neuroscience**, v. 7, p. 159, 19 set. 2013.

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: Respiratory, Environmental and Exercise Physiology**, v. 44, n. 6, p. 939–944, jun. 1978.

SMITH, J. C. *et al.* Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. **Science (New York, N.Y.)**, v. 254, n. 5032, p. 726–729, 1 nov. 1991.

SMITH, J. C. *et al.* Spatial and functional architecture of the mammalian brain stem respiratory network: a hierarchy of three oscillatory mechanisms. **Journal of Neurophysiology**, v. 98, n. 6, p. 3370–3387, dez. 2007.

SMITH, Jeffrey C. *et al.* Structural and functional architecture of respiratory networks in the mammalian brainstem. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 364, n. 1529, p. 2577–2587, 12 set. 2009.

SMITH, Jeffrey C. *et al.* Brainstem respiratory networks: building blocks and microcircuits. **Trends in neurosciences**, v. 36, n. 3, p. 152–162, mar. 2013.

SMITH, M. S.; FREEMAN, M. E.; NEILL, J. D. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. **Endocrinology**, v. 96, n. 1, p. 219–226, jan. 1975.

STRAUS, Christian *et al.* Chemosensitivity recovery in Ondine's curse syndrome under treatment with desogestrel. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 171, n. 2, p. 171–174, 30 abr. 2010.

SZAWKA, R. E. *et al.* Ovarian-Steroid Modulation of Locus Coeruleus Activity in Female Rats: Involvement in Luteinising Hormone Regulation. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 21, n. 7, p. 629–639, 2009.

TRANG, Ha *et al.* Guidelines for diagnosis and management of congenital central hypoventilation syndrome. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 15, p. 252, 21 set. 2020.

WEESE-MAYER, Debra E. *et al.* Congenital Central Hypoventilation Syndrome. *In: ADAM, Margaret P. et al. (Orgs.). GeneReviews®.* Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 1993.

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

ZOCCAL, Daniel B. *et al.* The nucleus of the solitary tract and the coordination of respiratory and sympathetic activities. **Frontiers in Physiology**, v. 5, p. 238, 2014.

ZWILLICH, C. W. *et al.* Effects of progesterone on chemosensitivity in normal men. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 92, n. 2, p. 262–269, ago. 1978.