

Efeito dos extratos de *Panax ginseng*, *Turnera diffusa* e *Heteropterys tomentosa* sobre a apoptose no hipocampo de ratos idosos

Effects of *Panax ginseng*, *Turnera diffusa* and *Heteropterys tomentosa* extracts on hippocampal apoptosis of aged rats

Andréia Gomes Bezerra¹, Soraya Soubhi Smaili¹, Guiomar Silva Lopes¹, Elisaldo Araújo Carlini¹

RESUMO

Objetivo: Plantas medicinais, como *Panax ginseng* C.A. Mey, *Turnera diffusa* Willd. Ex Schult. e *Heteropterys tomentosa* O. Mach. são amplamente utilizadas pela população como tônicas e para melhora da cognição. O presente estudo verificou se essas plantas poderiam ter algum efeito protetor na morte celular por apoptose, podendo este ser um dos mecanismos de ação dessas substâncias. **Métodos:** Ratos machos Wistar idosos (n=24) foram divididos em quatro grupos. Durante 30 dias, três grupos receberam tratamento com extratos hidroalcoólicos das plantas e um grupo recebeu solução salina. Um quinto grupo com ratos machos Wistar adultos jovens (n=4) recebeu solução salina durante o mesmo período. Utilizando-se a técnica de TUNEL, avaliou-se a porcentagem de apoptose no hipocampo desses animais. **Resultados:** Não foram observadas diferenças entre a porcentagem de células apoptóticas no hipocampo de animais idosos e de animais jovens controles. A porcentagem de apoptose no hipocampo dos animais idosos tratados cronicamente com os extratos das três plantas também não diferiu da porcentagem de apoptose do hipocampo dos animais idosos do grupo controle. **Conclusão:** O tratamento com os extratos hidroalcoólicos de *Panax ginseng*, *Turnera diffusa* e *Heteropterys tomentosa* não influenciou a apoptose das células hipocâmpais de ratos idosos.

Descritores: Plantas medicinais; Apoptose; Envelhecimento; Hipocampo

ABSTRACT

Objective: To verify if the medicinal plants *Panax ginseng* C.A. Mey, *Turnera diffusa* Willd. ex Schult., and *Heteropterys tomentosa*

O. Mach., which are amply used by the population as tonics and cognition enhancers, could have a protective effect on cell death by apoptosis, since this could be one of the mechanisms of action of these substances. **Methods:** Aged male Wistar rats (n=24) were divided into four groups. Over 30 days, three groups received treatments with hydroalcoholic extracts of the plants, and one group received saline solution. A fifth group with young adult male Wistar rats (n=4) received saline solution during the same period. Using the TUNEL technique, the percentage of apoptosis in the hippocampus of these animals was evaluated. **Results:** No differences were observed between the percentage of apoptotic cells in the hippocampus of aged animals and of young control animals. The percentage of apoptosis in the hippocampus of aged animals treated chronically with the extracts from the three plants also did not differ from the percentage of apoptosis in the hippocampus of the control group of aged animals. **Conclusion:** Treatment with the hydroalcoholic extracts of *Panax ginseng*, *Turnera diffusa*, and *Heteropterys tomentosa* did not influence the apoptosis of the hippocampal cells of aged rats.

Keywords: Plants, medicinal; Apoptosis; Aging; Hippocampus

INTRODUÇÃO

O processo de envelhecimento provoca uma série de alterações fisiológicas e anatômicas⁽¹⁾. Dentre essas alterações, destaca-se a perda gradativa de diversas funções cognitivas, como atenção, raciocínio, orientação,

Trabalho realizado na Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

¹ Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Autor correspondente: Andréia Gomes Bezerra – Rua Botucatu, 862 – Vila Clementino – CEP: 04023-006 – São Paulo, SP, Brasil – Tel.: (11) 2149-0155 – E-mail: andreia.bzr@gmail.com

Data de submissão: 7/9/2012 – Data de aceite: 2/4/2013

Conflito de interesse: não há.

linguagem e, principalmente, memória⁽²⁾. Nesse caso, o hipocampo, uma estrutura cerebral intimamente ligada à memória, estaria especialmente comprometida⁽³⁾.

Sabe-se que a perda neuronal é um processo que não ocorre em grande escala e de forma homogênea em todas as regiões do cérebro, porém sugere-se que ela esteja envolvida com os declínios cognitivos decorrentes do envelhecimento⁽⁴⁾. Dentre os mecanismos biológicos de perda neuronal, destaca-se a apoptose, a qual pode estar relacionada a processos patogênicos diversos. O excesso nas taxas de apoptose está relacionado à degeneração celular ocasionada graças ao estresse oxidativo^(5,6), frequentemente associado ao envelhecimento^(7,8). A apoptose também está relacionada à patogênese de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer⁽⁹⁾, a doença de Huntington⁽¹⁰⁾ ou o Parkinsonismo⁽¹¹⁾. Por fim, a apoptose também pode estar envolvida no déficit de memória e na função hipocampal⁽¹²⁾.

As plantas estudadas no presente trabalho, *Panax ginseng*, *Turnera diffusa* (popularmente conhecida como “damiana”) e *Heteropterys tomentosa* (popularmente conhecida como “nó-de-cachorro”), têm um uso popular muito disseminado e que coincide com uma possível ação nootrópica ou adaptógena. Os nootrópicos são drogas caracterizadas por melhorar o desempenho cognitivo do indivíduo e não possuem uma classe química ou mecanismo de ação específico⁽¹³⁾. Já as substâncias adaptógenas promovem um aumento do desempenho físico ou da resistência ao estresse⁽¹⁴⁾.

O *Panax ginseng* foi escolhido por possuir diversos trabalhos na literatura que confirmam sua ação adaptógena e mostram efeitos positivos sobre a memória, avaliada por meio da melhora do desempenho de ratos submetidos à esquivas⁽¹⁵⁾. Também foi verificado que o extrato de ginseng apresenta efeito protetor na morte por apoptose em células neuronais SK-N-MC⁽¹⁶⁾ e em astrócitos⁽¹⁷⁾.

Um levantamento bibliográfico aponta que a *Turnera diffusa* e a *Heteropterys tomentosa* possuem usos que se enquadram no conceito de adaptógeno e estão entre as mais usadas pela população brasileira⁽¹⁸⁾, porém não há muitos estudos científicos comprovando tais efeitos benéficos. A *Turnera diffusa* é descrita como estimulante, tônica e afrodisíaca⁽¹⁹⁾. Sua possível ação afrodisíaca, principal uso popular, foi alvo de investigação farmacológica⁽²⁰⁾. Nesse estudo, extratos fluidos hidroalcoólicos de *Turnera diffusa* e *Pfaffia paniculata* melhoraram o desempenho copulatório de ratos sexualmente incapitados. Em um teste de esquivas passiva, um extrato padronizado da *Heteropterys tomentosa* foi eficaz em reverter o déficit de memória de animais idosos⁽²¹⁾. A

planta também apresentou um bom índice antioxidante sobre a lipoperoxidação *in vitro*⁽²²⁾.

OBJETIVO

Considerando o declínio cognitivo decorrente do envelhecimento, a importância do hipocampo para esse processo e o potencial efeito neuroprotetor das plantas consideradas, o presente trabalho buscou avaliar o efeito dos extratos hidroalcoólicos (EH) das raízes de *Panax ginseng*, das partes aéreas de *Turnera diffusa* e das raízes de *Heteropterys tomentosa* sobre a taxa de apoptose das células hipocâmpais de ratos idosos.

MÉTODOS

Material botânico

Partes aéreas de *Turnera diffusa* foram obtidas comercialmente, da fornecedora Quimer Ltda. (lote 011, com validade até novembro de 2006), enquanto as raízes de *Panax ginseng* (lote GINP04/02, com validade até junho de 2008) e *Heteropterys tomentosa* (lote NOC06/02, com validade até agosto de 2008), sob a forma de pó, foram obtidas comercialmente da fornecedora Santos Flora®, todas providas de laudo de identificação botânica das espécies. Os EHs foram obtidos por meio da técnica de turbólise⁽²³⁾. Posteriormente, foram liofilizados (liofilizador EDWARDS Pirani 501) para obtenção dos extratos secos, os quais foram armazenados dentro de um dessecador em geladeira.

Animais

Foram utilizados 24 ratos idosos (20 meses de idade) e 4 ratos adultos jovens (3 meses de idade), machos, da linhagem Wistar, provenientes do biotério do Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Todos os animais foram mantidos em salas com controle de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e comida *ad libitum*. Os animais foram eutanasiados por decapitação. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética da UNIFESP (protocolo número 0464/05).

Tratamento dos animais

Os ratos idosos foram divididos em quatro grupos e receberam os tratamentos, por via oral, durante 30 dias. Os grupos receberam 100mg/kg do extrato de *Panax ginseng*, dose eficaz na aprendizagem e memória de ratos⁽¹⁵⁾, 50mg/kg de *Heteropterys tomentosa*, dose que reverteu o prejuízo de memória em ratos idosos⁽²¹⁾,

500mg/kg de *Turnera diffusa*. Ambos os grupos controle (grupo controle idoso e grupo controle jovem) receberam salina por via oral durante 30 dias.

No 30º dia de tratamento, 1 hora após a administração, os animais foram anestesiados com ketamina (0,8mL/kg) e xilazina (0,5mL/kg) e submetidos à perfusão transcardíaca com solução de formaldeído 4%. A seguir, os animais foram decapitados e os cérebros foram retirados cuidadosamente e armazenados em formaldeído 4% por 48 horas, para posterior inclusão em parafina.

Análise de apoptose pelo método de imuno-histoquímica do TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling)

Para utilização do método TUNEL, foi adquirido um kit (ApopTag Plus-peroxidase da ONCOR, Inc., EUA), seguindo-se o protocolo do fabricante e conforme descrito por Lopes et al.⁽⁸⁾.

Os cérebros dos animais incluídos em parafina foram cortados em micrótomo. As secções do tecido foram desparafinadas com etanol de 95 a 70% e lavadas em PBS. Após uma sequência de reações de imuno-histoquímica, a revelação da cor das células positivas para a reação ocorreu com a diaminobenzidina (DAB) e utilizando Hematoxilina de Carrazi para contra-coloração.

As lâminas foram observadas em microscópio de luz. Calculou-se a porcentagem de células positivas para a reação de TUNEL nas regiões do hipocampo (CA1, CA3 e giro denteado dorsal e ventral). A porcentagem foi obtida contando-se o número de células marcadas pela reação em relação ao número total de células presentes nas camadas granulares das referidas regiões [(células apoptóticas/total de células) X 100].

Análise estatística

Para análise dos dados, utilizou-se ANOVA de uma via. Os resultados foram expressos como média±erro padrão da média (EPM) e adotou-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Na tabela 1, observa-se que a porcentagem de morte nas regiões hipocampais analisadas pela reação de TUNEL não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de animais idosos e jovens. Além disso, os ratos idosos tratados com os três diferentes extratos de plantas não diferiram dos animais idosos sem tratamento.

Tabela 1. Porcentagem de células TUNEL positivas nas diferentes regiões do hipocampo (CA1, CA3, giro denteado dorsal e giro denteado ventral) de três grupos de animais idosos tratados com extratos hidroalcoólicos de *Panax ginseng*, extratos hidroalcoólicos de *Heteropterys tomentosa* e extratos hidroalcoólicos de *Turnera diffusa*, além dos controles, sem tratamento. Os resultados representam a média±EPM. ANOVA. Não foram encontrados resultados estatisticamente significativos

Grupo/tratamento (n)	% de células TUNEL-positivas			
	CA1	CA3	GDd	GDv
Idoso CTL (7)	0,03±0,03	0±0	0,02±0,02	0±0
Jovem CTL (4)	0±0	0,11±0,11	0,05±0,03	0,06±0,06
Idoso PG (6)	0,10±0,06	0,05±0,05	0±0	0,03±0,03
Idoso HT (6)	0,07±0,04	0,12±0,08	0±0	0±0
Idoso TD (5)	0,10±0,07	0,07±0,07	0±0	0,03±0,03

GDd: Giro denteado dorsal; GDv: Giro denteado ventral; PG: *Panax ginseng*; HT: *Heteropterys tomentosa*; TD: *Turnera diffusa*; CTL: Controle.

DISCUSSÃO

O presente trabalho buscou avaliar o possível efeito antiapoptótico dos três EHs (de *Panax ginseng*, *Turnera diffusa* e *Heteropterys tomentosa*), durante o envelhecimento. Os animais foram tratados por 30 dias com os EHs das plantas em estudo. Os cérebros desses animais foram retirados para posterior reação do TUNEL. Analisaram-se as regiões CA1, CA3 e giro denteado dorsal e ventral do hipocampo quanto à porcentagem de morte neuronal. As regiões analisadas pela reação de TUNEL não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de animais idosos tratados com os três diferentes extratos de plantas.

Diversos são os estudos de substâncias de origem vegetal que buscam um efeito antiapoptótico nas células do sistema nervoso central⁽²⁴⁻²⁶⁾. Os extratos metanólicos de *Acori graminei* e *Uncariae ramulus et uncius* protegeram o hipocampo da morte celular induzida por isquemia⁽²⁴⁾. Um preparado da medicina chinesa denominado Toki-shakuyaku-san teve um efeito neuroprotetor contra a proteína beta-amiloide, efeito atribuído à sua ação antioxidante⁽²⁶⁾. A injeção de extrato de *Carthamus tinctorius* em ratos diminuiu a área de infarto cerebral e a expressão da caspase-3 (proteína pró-apoptótica)⁽²⁵⁾. Esses estudos provam que extratos provenientes de espécies vegetais podem apresentar efeito protetor contra a morte neuronal em diversos modelos animais. Contudo, apesar da plausibilidade da afirmação acima, no presente estudo não foi observada proteção contra morte neuronal por apoptose.

Além disso, neste estudo, não houve diferenças entre a porcentagem de células apoptóticas do grupo de animais idosos e do grupo de animais jovens, ambos sem tratamento. Este dado questiona a afirmação de que o envelhecimento e a perda neuronal são eventos concomitantes. De fato, a perda neuronal, no envelhecimento, é discutida por muitos autores. Parte dos au-

tores demonstra que o envelhecimento está associado a uma diminuição fisiológica no número total de células em algumas regiões do cérebro. Nesse sentido, Ishimaru et al.⁽²⁷⁾ observaram que o número de células no hipocampo dos ratos idosos é de 10 a 30% menor do que dos ratos jovens. Um aumento da apoptose foi encontrado no estriado de ratos adultos e idosos, por meio da reação de TUNEL, o que pode estar relacionado a essa diminuição celular no sistema nervoso central⁽²⁸⁾. Entretanto, outros estudos sugerem que essa perda neuronal, durante o envelhecimento, é menor do que no recém-nascido, ao serem comparados os cérebros de ratos recém-nascidos aos de ratos adultos e idosos⁽²⁹⁾. Esses autores notaram que no neocórtex, tronco encefálico, hipocampo e cerebelo, havia um menor número de células apoptóticas nos animais idosos do que nos animais recém-nascidos. Nos recém-nascidos, essa alta taxa de apoptose está intimamente ligada ao desenvolvimento, à proliferação e à migração celular⁽²⁹⁾. Outros autores também analisaram o bulbo, o cerebelo e o corpo caloso de animais idosos e verificaram aumento das células danificadas na região do cerebelo e bulbo nos animais idosos⁽³⁰⁾. Portanto, a relação entre envelhecimento e apoptose ainda não está totalmente definida.

Os dados do presente trabalho estão de acordo com alguns achados na literatura que descrevem ausência de um grande número de células apoptóticas no cérebro de animais idosos. Os resultados do presente estudo também sugerem que as plantas medicinais avaliadas não possuem efeito antiapoptótico no sistema nervoso central. Contudo, para correta interpretação dos dados, algumas ressalvas metodológicas e limitações devem ser consideradas. Primeiramente, dado que não houve altas taxas de apoptose nos animais idosos, quaisquer efeitos anti-apoptóticos das plantas analisadas podem ter sido mascarados. Nesse sentido, seria útil empregar, em estudos futuros, metodologias de indução de apoptose e morte neuronal. Além disso, foi abordada apenas a morte neuronal por apoptose, desconsiderando-se mecanismos como os de necrose e autofagia. Desse modo, não se pode concluir que essas plantas não apresentam efeito protetor contra a morte neuronal de modo geral. Por fim, deve-se considerar que a apoptose induzida pelo envelhecimento não é restrita ao hipocampo. Sendo assim, estudos que verificam os efeitos das plantas analisadas sobre outras estruturas cerebrais podem ser de grande valia.

É importante lembrar que as plantas estudadas são bastante utilizadas pela população em geral, que reconhece seus efeitos como adaptógenas ou nootrópicas. Estudos científicos com substâncias vegetais, que apresentam efeito neuroprotetor e antiapoptótico, são escassos diante da quantidade de plantas descritas com

essa finalidade, seja popularmente ou por dados da literatura científica. Nesse sentido, é importante aprofundar esses estudos para esclarecer o mecanismo de ação dessas plantas, tão utilizadas pela população.

CONCLUSÃO

Os extratos *Panax ginseng*, *Turnera diffusa* e *Heteropterys tomentosa* não apresentam efeito sobre as taxas de apoptose no hipocampo de ratos idosos. Esses resultados são específicos às condições experimentais empregadas, sendo necessário avaliar o efeito das plantas em questão por meio de estudos que induzam apoptose ou que avaliem o declínio cognitivo próprio do envelhecimento por meio de outros mecanismos neurobiológicos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem Luciane de Souza pelo auxílio técnico e à Associação Fundo de Incentivo à Pesquisa (AFIP), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Knox CA. Neuroanatomical changes associated with aging in the peripheral nervous system. In: Albert ML, Koefel JE. Clinical neurology of aging. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 1994. p. 68-78.
2. Albert MS. Age-related changes in cognitive function. In: Albert ML, Koefel JE. Clinical neurology of aging. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 1994. p. 314-28.
3. Lister JP, Barnes CA. Neurobiological changes in the hippocampus during normative aging. Arch Neurol. 2009;66(7):829-33.
4. Shankar SK. Biology of aging brain. Indian J Pathol Microbiol. 2010;53(4):595-604.
5. Whittemore ER, Loo DT, Cotman CW. Exposure to hydrogen peroxide induces cell death via apoptosis in cultured rat cortical neurons. Neuroreport. 1994;5(12):1485-8.
6. Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. Free Radic Biol Med. 2000;29(3-4):323-33.
7. Floyd RA. Oxidative damage to behavior during aging. Science. 1991;254(5038):1597.
8. Lopes GS, Mora OA, Cerri P, Faria FP, Jurkiewicz NH, Jurkiewicz A, et al. Mitochondrial alterations and apoptosis in smooth muscle from aged rats. Biochim Biophys Acta. 2004;1658(3):187-94.
9. Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. Nature. 2004;430(7000):631-9.
10. Rosenstock TR, Carvalho AC, Jurkiewicz A, Frussa-Filho R, Smaili SS. Mitochondrial calcium, oxidative stress and apoptosis in a neurodegenerative disease model induced by 3-nitropropionic acid. J Neurochem. 2004;88(5):1220-8.
11. Ziv I, Melamed E, Nardi N, Luria D, Achiron A, Offen D, et al. Dopamine induces apoptosis-like cell death in cultured chick sympathetic neurons – a possible novel pathogenetic mechanism in Parkinson's disease. Neurosci Lett. 1994;170(1):136-40.

12. Zarifkar A, Choopani S, Ghasemi R, Naghdi N, Maghsoudi AH, Maghsoudi N, et al. Agmatine prevents LPS-induced spatial memory impairment and hippocampal apoptosis. *Eur J Pharmacol.* 2010;634(1-3):84-8.
13. Benesová O. Neuropathobiology of senile dementia and mechanism of action of nootropic drugs. *Drugs Aging.* 1994;4(4):285-303.
14. Wagner H, Nörr H, Winterhoff H. Plant adaptogens. *Phytomedicine.* 1994; 1(1):63-76.
15. Petkov VD, Mosharraf AH. Age- and individual-related specificities in the effects of standardized ginseng extract on learning and memory (experiments on rats). *Phytother Res.* 1987;1(2):80-4.
16. Lee J, Kim J, Cho S, Kim Y, Choi K, Joo W, et al. Protective effect of ginseng extract against apoptotic cell death induced by 2,2', 5,5' tetrachlorobiphenyl in neuronal SK-N-MC cells. *Life Sci.* 2004;75(13):1621-34.
17. Naval MV, Gómez-Serranillos ME, Carretero AMV. Neuroprotective effect of a ginseng (*Panax ginseng*) root extract on astrocytes primary culture. *J Ethnopharmacol.* 2007;112(2):262-70.
18. Mendes FR, Carlini EA. Brazilian plants as possible adaptogens: an ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. *J Ethnopharmacol.* 2007;109(3):493-500.
19. Mors WB, Rizzini CT, Pereira NA, DeFilipps RA. Medicinal plants of Brazil. Algonac, Mich.: Reference Publications; 2000. p. 327-8.
20. Arletti R, Benelli A, Cavazzuti E, Scarpetta G, Bertolini A. Stimulating property of *Turnera diffusa* and *Pfaffia paniculata* extracts on the sexual behavior of male rats. *Psychopharmacology.* 1999;143(1):15-9.
21. Galvão SMP, Marques LC, Oliveira MGM, Carlini EA. *Heteropteris tomentosa* (extract BST0298): a Brazilian plant that improves memory in aged rats. *J Ethnopharmacol.* 2002;79(3):305-11.
22. Mattei R, Barros MP, Galvão SMP, Bechara EJH, Carlini EA. *Heteropteris tomentosa* O. Machado: effects of extract BST 0298 on the oxidative stress of young and old rat brains. *Phytother Res.* 2001;15(7):604-7.
23. Franco SL. *Maytenus ilicifolia* martius ex. Reiss. *Celestraceae* – Proposta tecnológica de macerados [tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1990.
24. Lee B, Choi Y, Kim H, Kim SY, Hahm DH, Lee HJ, et al. Protective effects of methanol extract of *Acori graminei* rhizome and *Uncariae ramulus et uncus* on ischemia-induced neuronal death and cognitive impairments in the rat. *Life Sci.* 2003;74(4):435-50.
25. Luo J, Fang ZP, Zhou LM, Lai ST. [Effects of *Carthamus tinctorius* injection on bcl-2, caspase-3 expression related to neurons apoptosis after local cerebral ischemia]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2004;29(10):977-80. Chinese.
26. Egashira N, Iwasaki K, Akiyoshi Y, Takagaki Y, Hatip-Al-Khatib I, Mishima K, et al. Protective effect of Toki-shakuyaku-san on amyloid beta 25-35-induced neuronal damage in cultured rat cortical neurons. *Phytother Res.* 2005; 19(5):450-3.
27. Ishimaru H, Ogawa S, Fuji K, Fukuta T, Kaneyama T, Nabeshima T. Aged-related changes in learning and memory, choline acetyltransferase activity and number of neuronal cells in rats. *J Pharmacobio-Dyn.* 1991;14(6):321-5.
28. Zhang L, Kokkonen G, Roth GS. Identification of neuronal programmed cell death in situ in the striatum of normal adult rat brain and its relationship to neuronal death during aging. *Brain Res.* 1995;677(1):177-9.
29. White LD, Barone Jr S. Qualitative and quantitative estimates of apoptosis from birth to senescence in the rat brain. *Cell Death Differ.* 2001;8(4):345-56.
30. Dorszewska J, Adamczewska-Goncerzewicz Z, Szczech J. Apoptotic proteins in the course of aging of central nervous system in the rat. *Respir Physiol Neurobiol.* 2004;139(2):145-55.