UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA

Participação dos neurônios noradrenérgicos do *Locus Coeruleus* na geração central das atividades inspiratória e expiratória em resposta à ativação dos quimiorreceptores centrais de ratos.

Karolyne Silva Magalhães

Ribeirão Preto
2018

KAROLYNE SILVA MAGALHÃES

Participação dos neurônios noradrenérgicos do *Locus Coeruleus* na geração central das atividades inspiratória e expiratória em resposta à ativação dos quimiorreceptores centrais de ratos.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Davi J. A. Moraes

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Magalhães, Karolyne Silva

Participação dos neurônios noradrenérgicos do *Locus Coeruleus* na geração central das atividades inspiratória e expiratória em resposta à ativação dos quimiorreceptores centrais de ratos. Ribeirão Preto – São Paulo, 2018.

93 f. 30 cm

Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de concentração: Fisiologia) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Orientador: Moraes, Davi J. A.

1. *Locus Coeruleus*, 2. hipercapnia/acidose, 3. padrão respiratório, 4. expiração ativa, 5. Resistência das vias aéreas superiores, 6. Farmacogenética.

AGRADECIMENTOS

Gratidão é uma palavra pequena para descrever meus sentimentos sobre a realização deste trabalho. A trajetória foi árdua e com imprevistos, mas extremamente importante para o meu crescimento pessoal e profissional. Muitas pessoas me acompanharam durante este período e gostaria de agradecer-las pela contribuição na construção deste trabalho e pelo suporte neste momento importante:

A minha mãe, Regina Célia Magalhães, que sempre me apoiou incansavelmente nos momentos em que eu mais precisei. Eu não teria chegado até aqui sem o seu suporte e admiração. Literalmente, sem os seus cuidados durante os últimos dois anos desse curso de Mestrado, eu não o teria finalizado. Obrigada pela compreensão durante os meus momentos de ausência e pelo colo nos momentos difíceis.

Ao Professor Davi Moraes, por me dar a oportunidade de desenvolver este e trabalho, por enxergar competência em mim, pelo suporte e cuidado durante todo este período e pelos sábios conselhos, para além da vida acadêmica. Serei eternamente grata a tudo que fez por mim!

As minhas mais do que amigas, Aline, Amanda e Thaís, que como uma família, me apoiaram incansavelmente durante a construção deste trabalho neste último ano. Obrigada por todos os momentos divertidos, mas também, obrigada pela rica troca de experiências acadêmico-científicas. Obrigada por me tornarem um ser humano melhor!

Aos meus colegas de laboratório, Alan, Pedro, Júlia, Luciana, Daniel, Viviane, Nilton e Melina, que contribuíram direta ou indiretamente para a construção deste trabalho com discussões e troca de experiências, ou simplesmente com a presença divertida e acolhedora. Muito obrigada por deixarem essa experiência melhor ainda!

A outros amigos que estavam perto, ajudando nesta caminhada, como minha irmã de vida Mayara... muito obrigada por trilhar esse caminho comigo! Agradeço ainda aos amigos mais antigos, que de longe continuaram me apoiando: Gabriela, Juliana, Luizianna, entre outros... obrigada pela admiração e suporte! Agradeço aos meus familiares que me admiram e incentivam há muito tempo, como meu irmão Henry Jr. e meu padrasto Luís. Muito obrigada!

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da FMRP, obrigada pelo conhecimento transmitido a mim durante este período. Obrigada aos funcionários do Departamento de Fisiologia e aos alunos do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia por participarem da história do meu Mestrado. Agradeço especialmente ao professor Benedito Machado, e aos membros do seu laboratório, por oferecer espaço e contribuir com seu conhecimento para realização deste trabalho. Muito obrigada!

A CAPES e da FAPESP, que contribuíram financeiramente para a construção deste trabalho.

RESUMO

MAGALHÃES, K. S. **Participação dos neurônios noradrenérgicos do *Locus Coeruleus* na geração central das atividades inspiratória e expiratória em resposta à ativação dos quimiorreceptores centrais de ratos.** 93 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2018.

Em condições basais a inspiração é um fenômeno ativo enquanto a expiração é um fenômeno passivo. Em condições de desafios metabólicos, como aumento da pressão parcial de CO₂ e da [H⁺] no sangue arterial (hipercapnia/acidose), ocorre aumento da atividade inspiratória, a expiração passa a ser ativa, produzindo aumentos da atividade dos músculos abdominais, e a resistência das vias aéreas superiores reduz. O *Locus Coeruleus* (LC) contém neurônios noradrenérgicos (NE) que aumentam sua frequência de potenciais de ação quando expostos a elevados níveis de CO₂/[H⁺] e se comunicam com os neurônios respiratórios do tronco encefálico para fazer ajustes compensatórios na ventilação pulmonar durante a hipercapnia/acidose. Utilizando preparações *in situ* de ratos avaliamos a contribuição dos neurônios NE do LC na geração central das atividades inspiratória e expiratória e no controle da resistência das vias aéreas superiores em condições basais e em resposta a hipercapnia/acidose. Neurônios NE do LC foram seletivamente silenciados de maneira aguda e reversível pela aplicação do peptídeo de inseto alatostatina (Alst) após a transfecção celular utilizando um vetor lentiviral para expressão de receptores de *Drosophila* para a Alst acoplados a proteína G inibitória (AlstR). Dez a doze dias após, realizamos a abordagem dorsal da preparação *in situ* de ratos. Os nervos frênico (PN), abdominal (AbN), hipoglosso (HN) e vago cervical (cVN) foram registrados e analisados em diferentes fases do ciclo respiratório. Registros extracelulares *single unit* dos neurônios do LC também foram realizados. A frequência respiratória (fR), a duração da inspiração (DI) e da expiração (DE), a expiração ativa, a magnitude da modulação respiratória e a frequência de potenciais de ação dos neurônios do LC também foram avaliadas. A inibição seletiva dos neurônios NE do LC usando Alst não provocou alterações significativas na atividade dos motores nervos respiratórios, na fR, DI e DE em normocapnia. A inibição desses neurônios antes e/ou durante a hipercapnia/acidose reduziu significativamente a amplitude do AbN e em alguns momentos, eliminou a expiração ativa, além de reduzir as respostas inspiratórias do PN e HN (amplitude) e a atividade pós-inspiratória (adução da glote) do cVN. Quando

da ausência da expiração ativa após a inibição dos neurônios NE do LC, a DI, DE e a duração da atividade pré-inspiratória do cVN (abdução da glote) e HN (protusão da língua) foram normalizadas. A adição de Alst em preparações *in situ* de ratos que não expressavam o AsItR durante a hipercapnia/acidose não causou alterações no padrão dos nervos motores respiratórios registrados, na incidência da expiração ativa e na fR, DI e DE. Entre os neurônios do LC registrados, encontramos três populações com diferentes padrões de modulação pela respiração e uma com atividade tônica. A hipercapnia/acidose aumentou a magnitude da modulação respiratória e a frequência de potenciais de ação destas populações neuronais. Esses dados demonstram que os neurônios NE do LC exercem importante papel modulatório excitatório na geração central da inspiração, expiração ativa e no controle da resistência das vias aéreas superiores evocados pela hipercapnia/acidose em preparações *in situ* de ratos.

Palavras-chaves: *Locus Coeruleus*. Hipercapnia/acidose. Padrão respiratório. Expiração ativa. Resistência das vias aéreas superiores. Farmacogenética.

ABSTRACT

MAGALHÃES, K. S. **Participation of the noradrenergic neurons of Locus Coeruleus in the central generation of inspiratory and expiratory activities in response to the activation of the central chemoreceptors of rats.** 93 p. Dissertation (Masters) – School of Medicine of Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2018.

In basal conditions, inspiration is an active phenomenon while expiration is a passive phenomenon. Under conditions of high metabolic demands, such as increased in partial pressure of CO₂ and [H⁺] in arterial blood (hypercapnia/acidosis), there is an increase in inspiratory activity, expiration becomes active, producing increases in abdominal muscle activity, and the resistance of the upper airways reduces. The *Locus Coeruleus* (LC) contains noradrenergic (NE) neurons that increase their firing frequency when exposed to elevated CO₂/[H⁺] levels and communicate with respiratory brainstem neurons to make compensatory adjustments in lung ventilation during hypercapnia/acidosis. Using *in situ* preparations of rats, we evaluated the contribution of LC NE neurons in the central generation of inspiratory and expiratory activities, as well as in the control of upper airway resistance in basal conditions and in response to hypercapnia/acidosis. LC NE neurons were selectively acutely and reversibly silenced by application of the insect allatostatin peptide (Alst) after cellular transfection using a lentiviral vector for expression of Alst *Drosophila* receptors coupled to inhibitory G protein (AlstR). Ten to twelve days after, we performed the dorsal approach of the *in situ* preparation of rats. The phrenic (PN), abdominal (AbN), hypoglossal (HN) and cervical vagus (cVN) nerves were recorded and analyzed in different phases of the respiratory cycle. Single unit extracellular records of LC neurons were also performed. Respiratory frequency (fR), duration of inspiration (DI) and expiration (DE), active expiration, the magnitude of respiratory modulation and the firing frequency of LC neurons were also evaluated. Selective inhibition of LC NE neurons using Alst did not produce significant changes in the activity of respiratory motor nerves, fR, DI and DE in normocapnia. Inhibition of these neurons before and/or during hypercapnia/acidosis significantly reduced AbN amplitude and its incidence, as well as the inspiratory responses of PN and HN (amplitude) and post-inspiratory activity (glottal adduction) of the cVN. In the absence of active expiration after the inhibition of LC NE neurons, the DI, DE and the pre-inspiratory activity of cVN (glottal abduction) and HN (tongue protrusion) were normalized. The perfusion of Alst in *in situ* preparations of rats without

the expression of the AsItR during hypercapnia/acidosis did not change the pattern of the recorded respiratory motor nerves, the incidence of active expiration, fR, DI and DE. Among the registered LC neurons, we found three populations with different patterns of respiratory modulation and one with tonic activity. Hypercapnia/acidosis increased the magnitude of the respiratory modulation and their firing frequency. These data demonstrate that LC NE neurons exert an important excitatory modulatory role in the central generation of inspiration, active expiration and in the control of upper airway resistance evoked by hypercapnia/acidosis in *in situ* preparations of rats.

Keywords: *Locus Coeruleus*. Hypercapnia. Respiratory pattern. Active expiration; Control of upper airway resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Padrão respiratório motor de três fases.....	18
Figura 2. Representação esquemática da abordagem dorsal da preparação <i>in situ</i> de ratos.	28
Figura 3. Fotomicrografia da superfície dorsal do bulbo e da ponte da preparação <i>in situ</i> de rato.....	30
Figura 4. Expressão seletiva do AlstR em neurônios NE do LC de ratos.	35
Figura 5. Efeitos da inibição aguda dos neurônios NE do LC na atividade dos nervos respiratórios em preparações <i>in situ</i> de ratos durante normocapnia.....	37
Figura 6. Dados agrupados dos efeitos da inibição aguda dos neurônios NE do LC em preparações <i>in situ</i> de ratos durante normocapnia.	39
Figura 7. Efeitos da inibição aguda dos neurônios NE do LC na atividade dos nervos respiratórios em preparações <i>in situ</i> de ratos antes da hipercapnia/acidose.	41
Figura 8. Dados agrupados dos efeitos da inibição aguda dos neurônios NE do LC em preparações <i>in situ</i> de ratos antes da hipercapnia/acidose.....	43
Figura 9. Efeitos da inibição aguda dos neurônios NE do LC na atividade dos nervos respiratórios em preparações <i>in situ</i> de ratos durante a hipercapnia/acidose.....	45
Figura 10. Dados agrupados dos efeitos da inibição aguda dos neurônios NE do LC em preparações <i>in situ</i> de ratos durante a hipercapnia/acidose.	47
Figura 11. Efeitos da adição de Alst, na ausência da expressão do AlstR em neurônios NE do LC, na atividade dos nervos respiratórios em preparações <i>in situ</i> de ratos durante hipercapnia/acidose.	49

Figura 12. Dados agrupados dos efeitos da adição de Alst, na ausência da expressão do AlstR em neurônios NE do LC, em preparações <i>in situ</i> de ratos durante hipercapnia/acidose.	50
Figura 13. Registro extracelular <i>single unit</i> de um neurônio do LC, modulado pela inspiração, em preparação <i>in situ</i> de rato durante condições basais e na hipercapnia/acidose.	52
Figura 14. Registro extracelular <i>single unit</i> de um neurônio do LC, inibido pela inspiração, em preparação <i>in situ</i> de rato durante condições basais e na hipercapnia/acidose.	54
Figura 15. Registro extracelular <i>single unit</i> de um neurônio do LC, modulado pela pós-inspiração, em preparação <i>in situ</i> de rato durante condições basais e na hipercapnia/acidose.	56
Figura 16. Registro extracelular <i>single unit</i> de um neurônio do LC, não modulado pela respiração (tônico), em preparação <i>in situ</i> de rato durante condições basais e na hipercapnia/acidose.	57
Figura 17. Circuito hipotético da modulação dos neurônios NE do LC no controle central da inspiração e na atividade pós-inspiratória durante a hipercapnia/acidose.	64
Figura 18. Circuito hipotético da modulação dos neurônios NE do LC na geração central da expiração ativa e no controle da resistência das vias aéreas superiores durante a hipercapnia/acidose.	66

LISTA DE ABREVIATURAS

AbN	Nervo abdominal
Alst	Alatostatina
AlstR	Receptor para alatostatina
AOS	Apnéia obstrutiva do sono
BötC	Complexo Bötzing
CO ₂	Dióxido de carbono
cVN	Nervo vago cervical
cVRG	Grupo respiratório ventrolateral caudal
DE	Duração da expiração
DI	Duração da inspiração
E2	Segunda metade da expiração
fR	Frequência respiratória
GIRK	Canais para potássio retificadores de entrada
H ⁺	Hidrogênio iônico
HBR	Reflexo de Hering-Breuer
HN	Nervo hipoglosso
KF	Kölliker-Fuse
LC	<i>Locus Coeruleus</i>
LVV	Vetor lentiviral
NE	Noradrenérgicos
NTS	Núcleo do Trato Solitário
PBS	Tampão fosfato-salino
PFA	Paraformaldeído
pFRG	Grupo respiratório parafacial
PN	Nervo frênico
post-I	Pós-inspiração
pre-BötC	Complexo pré-Bötzing
pre-I	Componente pré-inspiratório
RLN	Nervo laringeo recorrente
RTN	Núcleo Retrotrapezóide
SLN	Nervo laringeo superior
rVRG	Grupo respiratório ventrolateral rostral
$\dot{V}_E$	Ventilação pulmonar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS.....	24
2.1. Objetivo geral	24
2.2. Objetivos específicos	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1. Animais	26
3.2. Transfecção neuronal.....	26
3.3. Transferência dos genes <i>in vivo</i>	26
3.4. Procedimentos <i>in situ</i> – abordagem dorsal da preparação <i>in situ</i> de ratos	27
3.4.1. Solução de perfusão.....	27
3.4.2. Procedimento cirúrgico	27
3.4.3. Registro e aquisição dos sinais dos nervos hipoglosso, abdominal, frênico, vago cervical e dos neurônios do <i>Locus Coeruleus</i>	29
3.4.4. Ativação de quimiorreceptores centrais.....	31
3.4.5. Histologia.....	31
3.4.6. Análises estatísticas	32
4. RESULTADOS	34
4.1. Eficácia na transfecção dos neurônios NE do LC	34
4.2. Alterações do padrão respiratório induzidas pela inibição dos neurônios NE do LC com Alst em condições basais (normocapnia).....	36
4.3. Alterações do padrão respiratório induzidas pela inibição dos neurônios NE do LC com Alst antes da hipercapnia/acidose (10% CO ₂).	40
4.4. Alterações do padrão respiratório induzidas pela inibição dos neurônios NE do LC com Alst durante hipercapnia/acidose (10% CO ₂)......	44

4.5.	Alterações do padrão respiratório após adição de Alst durante hipercapnia/acidose (10% CO ₂) - experimento controle.	48
4.6.	Atividade dos neurônios do LC em condições de normocapnia e hipercapnia.	51
5.	DISCUSSÃO	59
6.	CONCLUSÃO	70
7.	REFERENCIAS	72
8.	APÊNDICE.....	80
8.1.	APÊNDICE A – Artigo publicado na revista <i>Scientific Reports</i>	80

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Os quimiorreceptores centrais detectam alterações na pressão parcial de dióxido de carbono (CO_2) e/ou na concentração de hidrogênio iônico $[\text{H}^+]$ durante condições de hipercapnia e/ou acidose no sangue arterial, alteram a sua atividade (despolarização e/ou aumento da frequência de potenciais de ação) e subsequentemente influenciam a rede neuronal respiratória (neurônios respiratórios no tronco encefálico) para ajustar adequadamente a ventilação pulmonar ($\dot{V}_E$) (GUYENET, 2014). Os quimiorreceptores centrais foram inicialmente descritos em diferentes grupos neuronais na superfície ventral do bulbo ou próximos a ela (FUKUDA; HONDA, 1975; MITCHELL, R.A., LOESCHCKE, H.H., MASSION, W.H., SEVERINGHAUS, 1963; SCHLAEFKE; SEE; LOESCHCKE, 1970). No entanto, está bem estabelecido que diferentes neurônios distribuídos ao longo do tronco encefálico aumentam sua frequência de potenciais de ação em resposta à hipercapnia/acidose (LEE COATES; LI; NATTIE, 1993; NATTIE; LI, 2009), incluindo os neurônios nos Núcleos da Rafe (RICHERSON, 1995; WANG; PIZZONIA; RICHERSON, 1998), no Complexo pré-Bötzing (pre-BötC) (KOIZUMI et al., 2010), no Núcleo Retrotrapezóide (RTN) (GUYENET, 2014; LI; NATTIE, 2002), no Núcleo do Trato Solitário (NTS) (DEAN; LAWING; MILLHORN, 1989; LOPES et al., 2016) e no *Locus Coeruleus* (LC) (FILOSA; DEAN; PUTNAM, 2002; JOHNSON; HAXHIU; RICHERSON, 2008; OYAMADA et al., 1998; PINEDA; AGHAJANIAN, 1997; QUINTERO; PUTNAM; CORDOVEZ, 2017; STUNDEN et al., 2001). Foi proposto que todos estes grupos de neurônios sensíveis às alterações de $\text{CO}_2/[\text{H}^+]$ são quimiorreceptores centrais, contribuindo cada um para o aumento da $\dot{V}_E$ para assegurar que o pH do sangue arterial e do líquido cefalorraquidiano esteja restrito a limites fisiológicos normais (NATTIE; LI, 2009). A importância relativa de cada um destes sensores para as alterações respiratórias (inspiratórias e expiratórias) em condições de desafios metabólicos produzidos pela hipercapnia/acidose não é totalmente conhecida, e as condições em que cada um contribui têm sido intensamente discutidas na literatura, embora os critérios usados para definir a quimiossensibilidade neuronal variem de autor para autor e as condições nas quais a sensibilidade ao $\text{CO}_2/[\text{H}^+]$ é medida (fatia, cultura neuronal, preparações *in situ* e animal intacto, etc.) obviamente importam.

Evidências consideráveis sugerem que o LC contém neurônios quimiossensíveis que participam da resposta ventilatória ao $\text{CO}_2/[\text{H}^+]$ (GARGAGLIONI; HARTZLER; PUTNAM, 2010; LEE COATES; LI; NATTIE, 1993; MAGALHÃES et al., 2018; OYAMADA et al., 1998). De fato, os neurônios do LC têm sido extensivamente estudados em relação aos mecanismos celulares envolvidos na sensibilidade intrínseca ao $\text{CO}_2/[\text{H}^+]$ (PUTNAM; FILOSA; RITUCCI, 2004). Esta região pontina dorsal, situada bilateralmente no assoalho do quarto ventrículo, contém uma elevada concentração de neurônios noradrenérgicos (NE) no sistema nervoso central (neurônios A6) (BERRIDGE; WATERHOUSE, 2003) e é conhecida por participar do controle de diversas funções homeostáticas, como na manutenção do estado de vigília, a consolidação da memória diária, a modulação no processamento da informação sensorial, excitação e vigilância, nocicepção, controle cardiovascular (ASTON-JONES, 1986; HICKEY et al., 2014; HOBSON; MCCARLEY; WYZINSKI, 1975; MARTINS; FROEMKE, 2015; SAMUELS; SZABADI, 2008; SARA; BOURET, 2012; SVED; FELSTEN, 1987; TAKEUCHI et al., 2016) e inclusive, participa do controle quimiossensorial da respiração (GARGAGLIONI; HARTZLER; PUTNAM, 2010; PINEDA; AGHAJANIAN, 1997; PUTNAM; FILOSA; RITUCCI, 2004). A acidose focal do LC causa um aumento na frequência respiratória e na atividade inspiratória (LEE COATES; LI; NATTIE, 1993). Além disso, o LC parece desempenhar um papel essencial no desenvolvimento adequado da rede neuronal do tronco encefálico responsável pela geração central da respiração e exibe uma ação modulatória excitatória sobre a mesma (BOLME; FUXE, 1973; HILAIRE et al., 2004; WANG et al., 2004). A eliminação seletiva dos neurônios NE do LC com 6-hidroxidopamina resultou em redução de 64% da $\dot{V}_E$ em condições de hipercapnia/acidose, por meio da redução do volume corrente causado provavelmente por alterações na inspiração, mas não afetou a $\dot{V}_E$ em condições de repouso (BIANCARDI et al., 2008, 2010). Entretanto, estes resultados podem estar superestimados ou subestimados, uma vez que ao longo do tempo, após o silenciamento (eliminação) dos neurônios NE do LC, outras populações de neurônios quimiossensíveis no tronco encefálico podem efetivamente compensar a perda gradual, mas permanente, dos neurônios do LC. Adicionalmente, em um estudo recente realizado no nosso laboratório, demonstramos que a inibição aguda e reversível dos neurônios NE do LC, utilizando seletiva transfecção viral e manipulação farmacogenética destes neurônios, não foi capaz de provocar alterações na inspiração, expiração e $\dot{V}_E$ em ratos acordados durante condições de repouso

(MAGALHÃES et al., 2018). Por outro lado, a inibição aguda destes neurônios durante a hipercapnia/acidose reduziu significativamente a magnitude e incidência da expiração ativa e a frequência e amplitude da inspiração, reduzindo, portanto, a $\dot{V}_E$ durante este desafio metabólico. Esses dados demonstram que os neurônios NE do LC fazem parte de um centro de vigilância para controle da respiração em condições de alta demanda metabólica (MAGALHÃES et al., 2018).

Durante o repouso, ou seja, em condições basais, a respiração é caracterizada por três fases: inspiração, pós-inspiração (post-I) e segunda metade da expiração (E2) (RICHTER; SMITH, 2014). O registro de nervos motores respiratórios permite a análise destas três fases. Como ilustrado na, o registro do nervo frênico (PN), responsável pelo controle motor do músculo diafragma, revela aumento da sua atividade em formato de “rampa”, ou gradual, durante a inspiração seguida de um rápido declínio e um período silente, que caracteriza o fim desta fase. Concomitante a essa atividade gradual do nervo PN, durante a fase inspiratória é possível observar a atividade do nervo laringeo recorrente (RLN, ramo do nervo vago cervical - cVN) para promover abdução da glote, por meio da contração do músculo cricoaritenóideo posterior, reduzindo a resistência das vias aéreas superiores para a passagem do ar para os pulmões (BRANCATISANO; DODD; ENGEL, 1991). Por outro lado, durante esse período silente do nervo PN que sucede a inspiração, é possível observar aumento da atividade do RLN, que neste caso é responsável pela contração de músculos adutores da glote (cricoaritenóideo lateral e tireoaritenóideo) para controlar a taxa de esvaziamento pulmonar e a capacidade residual funcional, permitindo que o tempo de troca gasosa seja ideal durante a post-I (PATON; DUTSCHMANN, 2002; RICHTER; SMITH, 2014; SCHWARZACHER; WILHELM; RICHTER, 1991). A fase E2 é caracterizada pela atividade silente de ambos os nervos motores respiratórios e é importante para a transição para um novo ciclo respiratório (RICHTER; SMITH, 2014; SMITH et al., 2013).

Figura 1. Padrão respiratório motor de três fases. Registros das atividades integradas dos nervos frênico (PNA), laringeo recorrente (RLN) e da pressão sub-glotal, realizados em uma preparação *in situ* de ratos permitindo a análise do padrão respiratório motor trifásico (inspiração, *Insp*; pós-inspiração, *Post-inspiration*; E2, *Exp*). É possível observar a atividade inspiratória em “rampa”, ou gradual, do PNA, que termina abruptamente, representando a fase inspiratória. Nesta mesma fase, observa-se atividade no RLN e dilatação da glote, neste caso, por ativação de músculo abductor da glote para permitir a passagem do ar para os pulmões durante a inspiração. Em seguida, em conjunto com o declínio na atividade do PN, observa-se aumento da atividade do RLN, que representa o controle neural dos músculos adutores da glote, e conseqüentemente, constrição transitória da glote, caracterizando a post-I. Em seguida, observa-se a fase onde ambos os nervos estão silentes, caracterizando a E2. Figura adaptada de Abdala *et al.* (2009a).

O pre-BötC, uma região na superfície ventral do bulbo que foi descrita no início dos anos 90, contém neurônios inspiratórios com propriedades intrínsecas ritmogênicas responsáveis pela geração do ritmo respiratório (RICHTER; SMITH, 2014; SMITH et al., 1991). A interação desta importante região com outras estruturas localizadas no tronco encefálico, como o Complexo Bötzing (BötC), o NTS e o Grupo Respiratório Pontino, permite a geração do padrão respiratório motor de três fases (SMITH et al., 2013). Em relação a geração da post-I, outros mecanismos neurais envolvendo mecanorreceptores pulmonares, o Grupo Respiratório Pontino e um oscilador condicional bulbar denominado “Complexo Pós-inspiratório” também participam da geração desta fase respiratória (ANDERSON et al., 2016; DUTSCHMANN; DICK, 2012; POON; SONG, 2014).

Normalmente, os músculos expiratórios abdominais são recrutados fisicamente para respirar somente quando é necessário um alto nível de $\dot{V}_E$ (expiração ativa), como durante o exercício físico (ABRAHAM et al., 2002) ou durante condições de desafios metabólicos, tais como quando os quimiorreceptores são intensamente ativados (ABDALA et al., 2009b; HUCKSTEPP et al., 2015; MORAES et al., 2012). Por meio da contração fásica dos músculos abdominais é possível forçar a exalação do ar, o que provoca diminuição da duração da expiração, e aumento do volume corrente, para aumentar a $\dot{V}_E$ (VJENKIN; MILSOM, 2014). Essa atividade expiratória fásica dos músculos abdominais parece operar sob o controle de uma rede especializada denominada oscilador expiratório que é distinta da rede inspiratória (ABDALA et al., 2009b; HUCKSTEPP et al., 2015; MOLKOV et al., 2011). Os componentes essenciais deste oscilador expiratório parecem residir na superfície ventral do bulbo, na vizinhança imediata do Núcleo Motor Facial, em uma região que se sobrepõe parcialmente aos neurônios quimiossensíveis do RTN (HUCKSTEPP et al., 2015). Esta região é chamada de Grupo Respiratório parafacial (pFRG) (ABDALA et al., 2009b; HUCKSTEPP et al., 2015; PAGLIARDINI et al., 2011). Resultados recentes sugerem que este oscilador expiratório contém neurônios com atividade rítmica expiratória em condições de desafios metabólicos, chamados de neurônios *late-expiratory* (*late-E*), que recrutam os músculos abdominais expiratórios por meio dos motoneurônios expiratórios localizados na medula espinhal (DE BRITTO; MORAES, 2017; PISANSKI; PAGLIARDINI, 2018). A hipercapnia/acidose produz desinibição destes neurônios não-quimiossensíveis para gerar a expiração ativa e as respostas respiratórias motoras craniais concomitantes que controlam a resistência da orofaringe e das vias aéreas superiores em ratos durante a expiração (DE BRITTO; MORAES, 2017). Ou seja, além da geração da expiração ativa durante a hipercapnia/acidose, ocorre simultaneamente aumentos da atividade eferente dos nervos hipoglosso (HN) e laringeo superior (SLN; ABDALA et al., 2009). Isso sugere que a atividade destes três nervos motores no final da expiração originam-se de um mesmo gerador, o pFRG (MOLKOV et al., 2010). A possível implicação funcional da ativação de nervos motores que controlam a resistência da orofaringe (protusão da língua pelo HN - FREGOSI; LUDLOW, 2014) e da laringe (dilatação da glote pelos SLN e RLN) na fase final da expiração, durante este desafio metabólico, é para diminuir a resistência

das vias aéreas superiores durante a geração da expiração ativa, ou seja, do recrutamento da musculatura abdominal, permitindo que o ar seja exalado adequadamente a fim de promover ajustes compensatórios para correção da alteração da pressão parcial dos gases e/ou do pH sanguíneo. Apesar disto, os mecanismos celulares e as vias neurais no tronco encefálico envolvidas na geração central da expiração ativa em condições de desafios metabólicos, tais como durante a hipercapnia/acidose, não são totalmente conhecidas.

Situações de desafio metabólico também são capazes de provocar alterações comportamentais. Por exemplo, não só a hipercapnia/acidose, mas também a apneia obstrutiva do sono (AOS) em adultos, é capaz de provocar aumento da atividade de músculos que controlam a resistência das vias aéreas superiores para reabri-las e, em paralelo, este desafio também é capaz de provocar diferentes graus de “sobressalto” e “despertar” (WULBRAND et al., 2008). Neste caso, não só a incidência, mas também a intensidade dessas respostas comportamentais e/ou respiratórias são importantes para recuperação de situações que ameaçam a vida durante o sono. Existem evidências de que este comportamento está associado à ativação neuronal da região A6, ou seja, dos neurônios NE do LC, uma vez que a estimulação provoca transição imediata do sono para o estado acordado, além de aumentar a locomoção (CARTER et al., 2010a). Adicionalmente, situações de desafios metabólicos, como exemplo a inalação de CO₂, são capazes de provocar ansiedade (preocupação, tensão), excitação autonômica (aumento da frequência cardíaca e pressão arterial) e estado de alerta (GARNER et al., 2012). Essas alterações comportamentais e autonômicas podem ser mediadas pelo controle do sistema noradrenalina-LC (GARNER et al., 2012; NEUFANG et al., 2018).

Estudos prévios demonstraram que a ponte desempenha um papel importante na geração central da expiração ativa em condições de hipercapnia/acidose em ratos (ABDALA et al., 2009b; JENKIN; MILSOM; ZOCCAL, 2017; MOLKOV et al., 2010). Em ratos anestesiados, os neurônios do LC são variadamente modulados pela respiração, apresentando padrões de disparo de potenciais de ação sincronizados com as diferentes fases da respiração (GUYENET et al., 1993). Estes neurônios adquirem uma modulação expiratória ainda mais intensa em condições de desafios metabólicos produzidos por reduções da pressão parcial de oxigênio (hipóxia) ou aumentos de CO₂/[H⁺] (GUYENET et al., 1993; OYAMADA et al., 1998). Esta multiplicidade de padrões de disparo de potenciais de ação sugere que podem existir

classes separadas de neurônios quimiossensíveis no LC. Tais células poderiam ser concebidas como especializadas na regulação da frequência da respiração versus na amplitude das respostas motoras inspiratórias e expiratórias. Embora estudos anatômicos tenham indicado conexões entre os neurônios NE do LC e as áreas da superfície ventral do bulbo (SZABADI, 2013), onde se localizam os neurônios responsáveis pela geração da inspiração e expiração (RICHTER; SMITH, 2014), bem como a sua participação na geração da respiração (HILAIRE et al., 2004) e controle respiratório das vias aéreas superiores (YAMANISHI et al., 2008), não está totalmente estabelecido a contribuição funcional dos neurônios NE do LC na regulação da atividade central motora inspiratória e expiratória e no controle das vias aéreas superiores em condições basais ou na geração da transição de um padrão expiratório passivo para um padrão expiratório ativo em condições de desafios metabólicos. Portanto, torna-se importante investigar a contribuição dos neurônios NE do LC no controle da atividade abdominal expiratória e no controle das vias aéreas superiores, para ampliar nosso conhecimento sobre os circuitos neurais necessários à geração da expiração ativa e ao processamento das respostas respiratórias à hipercapnia/acidose.

Grande parte da importância da quimiossensibilidade dos neurônios do LC depende da maneira como ela influencia a geração central da respiração, mas esse tipo de informação é difícil ou impossível de obter na maioria das preparações reduzidas (superfusão do tronco encefálico isolado e de fatias transversais da ponte). Dessa forma, a atividade respiratória gerada a partir destas preparações não é eupneica (OYAMADA et al., 1998), pois não apresenta as três fases da respiração (inspiração, post-I e E2 - RICHTER; SMITH, 2014), em parte porque algumas estruturas do tronco encefálico envolvidas na geração central da respiração, como por exemplo, a ponte, não são funcionalmente ativas ou perfundidas adequadamente. Contudo, podemos utilizar preparações menos reduzidas *in situ* do tronco encefálico-medula espinhal de ratos jovens (PATON, 1996), uma vez que esta retém circuitos sinápticos necessários para a geração central das três fases da respiração, por conta da integridade do tronco encefálico (arterialmente perfundido e não superfundido), e sem o efeito depressor do anestésico. Por esse motivo, utilizamos esta abordagem experimental para determinar a modulação das atividades inspiratórias e expiratórias, bem como o controle da resistência das vias aéreas superiores, pelos neurônios NE do LC durante situação de hipercapnia/acidose e, ainda, para identificar as

características eletrofisiológicas desta população neuronal durante este desafio metabólico.

No presente Projeto de Pesquisa, os neurônios NE do LC foram seletivamente silenciados de forma aguda e reversível pela aplicação do peptídeo de inseto alatostatina (Alst) após a transfecção celular seletiva destes neurônios em ratos com um vetor lentiviral (LVV) para expressar receptores acoplados à proteína G inibitórios de *Drosophila* para Alst (AltsR) (Lechner e cols., 2002). Utilizando preparações *in situ* de ratos, investigamos a contribuição dos neurônios NE do LC na geração central das atividades inspiratória e expiratória, bem como no controle da resistência das vias aéreas superiores, em condições basais e em resposta à ativação dos quimiorreceptores centrais usando hipercapnia/acidose, e ainda, caracterizamos as alterações eletrofisiológicas e na magnitude da modulação respiratória dos neurônios NE do LC em condições de hipercapnia/acidose.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a participação dos neurônios NE do LC na geração central das atividades inspiratória e expiratória e do controle das vias aéreas superiores em condições basais e em resposta à ativação dos quimiorreceptores centrais de ratos.

2.2. Objetivos específicos

- a) Avaliar o efeito da inibição aguda e seletiva dos neurônios NE do LC na geração central do padrão motor respiratório de três fases em preparações *in situ* de ratos durante condições basais.
- b) Avaliar o efeito da inibição aguda e seletiva dos neurônios NE do LC na geração central do padrão motor respiratório de três fases em preparações *in situ* de ratos durante condições de hipercapnia/acidose.
- c) Investigar as alterações eletrofisiológicas dos neurônios NE do LC durante condições de hipercapnia/acidose em preparações *in situ* de ratos.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (protocolo #122/2016). Utilizamos ratos Wistar (50-55g) provenientes do Serviço de Biotério do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os animais foram alojados com ciclo de luz/escurecimento de 12 h a uma temperatura constante (22 ± 1 °C) com acesso à comida de rato padrão e água *ad libitum*.

3.2. Transfecção neuronal

Os neurônios catecolaminérgicos do tronco cerebral expressam o fator de transcrição Phox2 e podem ser seletivamente transfectados utilizando vetores virais para expressar um gene de interesse sob o controle de um promotor artificial - PRSx8 (TESCHEMACHER et al., 2008). O LVV utilizado foi derivado de HIV-1 e pseudo-tipificado com o envelope VSV-G (COLEMAN et al., 2003). O plasmídeo pTYF-PRSx8-AlstR-IRES2-GFP e o seu controle pTYF-PRSx8-IRES2-GFP foram clonados no LVV (doação do Professor Julian F. R. Paton – Universidade de Auckland, NZ). A titulação do PRSx8-AlstR-GFP-LVV e do vírus controle (PRSx8-GFP-LVV – não contém o AlstR) estavam entre 1×10^9 e 1×10^{10} pfu. A concentração viral e a titulação foram realizadas como descrito em detalhe anteriormente (COLEMAN et al., 2003) no Laboratório Nacional de Biociências do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (<http://lnbio.cnpem.br/facilities/viral-vector-2/contact/>).

3.3. Transferência dos genes *in vivo*

Os ratos foram anestesiados com uma mistura de Cetamina (75 mg kg⁻¹ i.p.; Agener União, Brasil) / Xilazina (5 mg kg⁻¹ i.p.; Vetbrands, Brasil). O grau de anestesia foi constantemente verificado por meio do pinçamento da cauda para análise de possíveis respostas reflexas. Os animais foram colocados em um aparelho estereotáxico (David Kopf, EUA) e duas microinjeções (níveis dorso-ventrais separados por 1 mm) por lado de PRSx8-AlstR-GFP-LVV ou PRSx8-GFP-LVV (50 nL cada, durante 5 min) foram administradas bilateralmente no LC (Picospritzer II; Parker Instruments, USA). As injeções foram feitas -1 mm do Lambda, $\pm 1,7$ mm lateral da

linha média e 4.5-5.5 mm ventral à superfície do cérebro. Após a cirurgia, os ratos foram tratados com uma dose profilática do analgésico e antipirético flunixinina meglumina (1 mg kg⁻¹; Schering-Plough, Brasil) e 0,1 ml de antibiótico veterinário (1,2 milhão de iu; Fort Dodge, Brasil).

3.4. Procedimentos *in situ* – abordagem dorsal da preparação *in situ* de ratos

3.4.1. Solução de perfusão

Dez a doze dias após a transfecção celular dos neurônios NE do LC utilizando PRSx8-AlstR-GFP-LVV ou PRSx8-GFP-LVV, os animais foram preparados para a preparação *in situ* de ratos (PATON, 1996). A solução de perfusão foi composta por em mM: 125 de NaCl; 25 de NaHCO₃; 3 de KCl; 2.5 de CaCl₂; 1.25 de MgSO₄; 1.25 de KH₂PO₄ e 10 de glicose, diluídos em água deionizada (nível 1). Outras substâncias foram adicionadas à solução de perfusão como um agente oncótico (polietileno glicol - PEG, 16.000 ≤ Mr ≤ 24.000, 1.25%; Sigma, EUA) e um bloqueador da transmissão neuromuscular (brometo de vecurônio - 4 µg/ml, Cristália, Brasil). A ativação do AlstR foi realizada pela adição da Alst (1 µM; Phoenix Pharmaceuticals, INC, EUA) no perfusato (MARINA et al., 2011; MORAES et al., 2017).

3.4.2. Procedimento cirúrgico

Inicialmente, os animais foram profundamente anestesiados com anestésico inalatório - halotano (100%; Cristália, Brasil) e seccionados sub-diafragmaticamente. Após a exsanguinação, os animais tiveram a cabeça e o tórax submersos em uma cuba contendo solução de perfusão resfriada (2 – 4 °C), seguido da descerebração ao nível pré-colicular, eliminando a influência do córtex sobre a atividade motora e sensorial, e remoção total da pele para evitar que os pelos contaminassem a solução de perfusão e obstruíssem o sistema de perfusão. Depois da descerebração, a abordagem dorsal da preparação *in situ* foi utilizada para a exposição da superfície dorsal do tronco encefálico por meio da remoção do cerebelo, até a visualização dos colículos, para a realização de registros extracelulares da atividade dos neurônios do LC. Após esses procedimentos, a preparação foi então transferida para uma câmara de registro e a aorta descendente canulada e perfundida retrogradamente com a solução de perfusão, acompanhada do agente oncótico, utilizando uma bomba

peristáltica (Watson-Marlow 502S, EUA) a um fluxo de 21 – 25 mL/min (Figura 2). Para aumento adicional da pressão de perfusão foi adicionado 70µl de vasopressina (4µM; Sigma, EUA) na solução de perfusão. A solução de perfusão foi constantemente aerada com mistura carbogênica de 95% O₂ e 5% CO₂, para o fornecimento de O₂ à preparação e manutenção do pH da solução em torno de 7.4, filtrada com uma malha de náilon (tamanho do poro: 0.22 µm; Millipore, EUA) e aquecida por meio de um trocador de calor a uma temperatura de aproximadamente 31 °C, conforme descrito previamente (Figura 2 - PATON, 1996).

Figura 2. Representação esquemática da abordagem dorsal da preparação *in situ* de ratos. Nesta preparação, o animal é seccionado abaixo do diafragma e descerebrado. Além disso, perfundido retrogradamente por meio da aorta abdominal. A solução de perfusão é constantemente aerada com mistura carbogênica de 95% O₂ e 5% CO₂, aquecida por um trocador de calor, filtrada e livre de bolhas (armadilha de bolhas no sistema). Os nervos frênico (PN), abdominal (AbN), hipoglosso (HN) e vago cervical (cVN) foram registrados usando eletrodos de vidro bipolares de sucção. Registros extracelulares *single unit* dos neurônios do LC (Neu) foram feitos às cegas (pipetas de vidro com 10–30 MΩ de resistência). Para ativação dos quimiorreceptores centrais, foi utilizada mistura carbogênica de 10% CO₂-90% O₂. Já para inibição dos neurônios NE do LC, foi adicionado à solução 1 µM de Alst. Figura adaptada de Zoccal *et al.* (2009).

3.4.3. Registro e aquisição dos sinais dos nervos hipoglosso, abdominal, frênico, vago cervical e dos neurônios do *Locus Coeruleus*

Todos os registros dos nervos motores (AM-Systems amplifier 1700, EUA) foram obtidos utilizando eletrodos de vidro bipolares de sucção, os quais foram conectados a micromanipuladores (YOU-1; Narishige, Japão). O HN e cVN foram dissecados ao nível cervical, seccionados e suas atividades eferentes registradas. O nervo abdominal (AbN) foi isolado da musculatura retro-abdominal ao nível torácico (T12), seccionado distalmente e sua atividade registrada, enquanto que o PN foi registrado no lado esquerdo da caixa torácica. Os nervos motores respiratórios foram registrados em unidades absolutas (μV).

Registros extracelulares *single unit* dos neurônios do LC foram feitos às cegas (Axopatch-200B; Molecular Devices, EUA) com eletrodos de vidros (10-30 M Ω). Analisamos as alterações na frequência de potenciais de ação e na magnitude da modulação respiratória dos neurônios do LC antes e após a ativação dos quimiorreceptores centrais usando hipercapnia/acidose (ver abaixo). Nesta abordagem experimental, foi possível registrar alterações do campo elétrico decorrentes das correntes iônicas envolvidas na gênese do potencial de ação. Os eletrodos foram conectados a um micromanipulador (PatchStar; Scientifica, UK) e em seguida foram posicionados em direção a região correspondente ao LC na superfície dorsal da ponte sob controle visual (microscópio; Seiler, EUA) utilizando como base em referências anatômicas (quarto ventrículo, *calamus scriptorius* e os colículos – Figura 3).

Figura 3. Fotomicrografia da superfície dorsal do bulbo e da ponte da preparação *in situ* de rato. Para os registros extracelulares *single unit* de neurônios, a pipeta de registro foi conectada a um micromanipulador e posicionada na direção correspondente ao *Locus Coeruleus* (LC), utilizando como referência anatômica o quarto ventrículo, *calamus scriptorius* e os colículos.

Todos os sinais foram amplificados, filtrados (0.3 – 5 KHz) e adquiridos (10KHz), por meio de um conversor analógico/digital (CED 1401; Cambridge Electronic Design, UK), em um computador, utilizando o software Spike 2 (Cambridge Electronic Design). As análises das atividades dos nervos motores respiratórios registrados foram feitas em sinais retificados e integrados (constante de tempo de 50 ms), utilizando o software Spike 2, nas diferentes fases do ciclo respiratório (DE BRITTO; MORAES, 2017). A atividade do PN basal foi avaliada pela sua frequência (fR) e duração (duração da inspiração - DI). Os intervalos de tempo entre as atividades do PN foram considerados como duração da expiração (DE). A duração do componente pré-inspiratório (pre-I) do cVN e do HN foi analisada pela sua relação com o início da atividade do PN. A duração da atividade pós-inspiratória do cVN também foi quantificada. As alterações nas amplitudes inspiratórias do PN e do HN foram expressas como valores percentuais em relação aos valores basais. A expiração ativa foi determinada quando a atividade do AbN na fase final da expiração for maior (μV) do que a atividade pós-inspiratória do AbN. A magnitude da modulação respiratória dos histogramas de frequência determinados pelo PN (2 minutos; largura

da caixa/bin de 200 ms) dos neurônios do LC foi quantificada como a variação percentual da atividade da menor para a maior frequência durante o ciclo respiratório em normocapnia e hipercapnia/acidose: porcentagem de modulação = [(maior contagem de atividade - menor contagem de atividade)/menor contagem de atividade] x 100.

3.4.4. Ativação de quimiorreceptores centrais

Usando um misturador de gases (Gas mixer pegas 4000; Columbus Instruments, USA), a proporção dos gases no perfusato foi alterada para aumento do CO₂ e consequente ativação dos quimiorreceptores centrais. Para o estímulo de hipercapnia/acidose, as concentrações utilizadas foram 10% CO₂-90% O₂.

3.4.5. Histologia

No final dos experimentos, o tronco encefálico dos animais foi removido e pós-fixado em paraformaldeído (PFA – Sigma, EUA) a 4% durante 24 h. Em seguida, o tronco foi transferido para solução de sacarose a 30%. Cortes transversais (50 µm de espessura) foram realizados ao longo de todo o LC. Imunofluorescência foi realizada com cortes flutuantes. Os cortes foram bloqueados e permeabilizados em tampão fosfato-salino (PBS – 0,1M) contendo 5% de albumina de soro fetal bovino (Sigma, EUA) e 0.1% de Triton X-100 durante 1 h à temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS, as secções foram incubadas em anticorpos primários anti-tirosina hidroxilase de camundongo (TH; 1:1000; Millipore) e anti-GFP de galinha (1:500; Abcam, EUA) durante 24 h a 4 °C. Depois de três lavagens com PBS, as secções foram incubadas em anticorpos secundários: Alexa 647 anti-camundongo feito em cabra (1:500; Molecular Probes, EUA) e Alexa 488 anti-galinha feito em cabra (1:500; Molecular Probes) durante 4 h em temperatura ambiente. Os cortes foram lavados três vezes em PBS e montados em Fluoromount (Sigma). As imagens foram capturadas num microscópio confocal Leica TCS SP5 (EUA) equipado com lasers de 488 e 633 nm e detecção de comprimento de onda de emissão sintonizável. A quantificação dos neurônios NE que expressavam o constructo Alst-GFP foi feita ao longo de todo o comprimento do LC de cada rato (de 9.20 a 10.50 mm caudal ao Bregma), utilizando um sistema de análise de dados (Software Image, J NIH System, EUA).

3.4.6. Análises estatísticas

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Os dados obtidos foram analisados pela análise pareada do teste-t de *Student*. O nível de significância adotado foi de $p < 0.05$.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Eficácia na transfecção dos neurônios NE do LC

A injeção estereotáxica de PRSx8-AlstR-GFP-LVV bilateralmente no LC produziu expressão seletiva do constructo AlstR-GFP nos neurônios NE do LC revelados por imunofluorescência (Figura 4). Os neurônios transfectados apresentaram fluorescência característica delimitada pela membrana com forte sinal nos dendritos e axônios, como esperado para o constructo receptor-fluoróforo (AlstR-GFP). A expressão foi limitada aos neurônios NE com base na imunofluorescência para TH. O constructo AltsR-GFP foi expresso em 88 ± 1.44 % dos neurônios NE em todo o LC, demonstrando a especificidade da transfecção viral desses neurônios.

Figura 4. Expressão seletiva do AlstR em neurônios NE do LC de ratos. Dez a doze dias após a injeção bilateral de PRSx8-AlstR-GFP-LVV no LC, observamos intensa expressão seletiva no soma e processos neuronais nos neurônios NE do constructo AlstR-GFP. Expressão de GFP (verde), marcação para TH (vermelho), e sobreposição das imagens (amarelo). 4thV: quarto ventrículo.

4.2. Alterações do padrão respiratório induzidas pela inibição dos neurônios NE do LC com Alst em condições basais (normocapnia).

Inicialmente investigamos se a inibição aguda e seletiva dos neurônios NE do LC poderia gerar alterações nas atividades dos nervos motores respiratórios em condições basais (n=6). A Figura 5, painel A mostra registros brutos e tratados das atividades dos AbN, cVN, HN e PN de uma preparação *in situ* de rato transfectado bilateralmente com o constructo PRSx8-AlstR-GFP-LVV no LC, antes e após a inibição aguda e seletiva dos neurônios NE do LC (Alst). Não observamos a geração da expiração ativa durante condições basais em todas as preparações registradas (Figura 5, painéis A e Bi). Após a adição de Alst na solução de perfusão não observamos alterações significativas na atividade de nenhum dos nervos motores respiratórios registrados (Figura 5, painéis A-Bii).

Figura 5. Efeitos da inibição aguda dos neurônios NE do LC na atividade dos nervos respiratórios em preparações *in situ* de ratos durante normocapnia. (A) Registros brutos e tratados da atividade dos AbN, cVN, HN e PN de uma preparação *in situ* de rato transfectado bilateralmente no LC com PRSx8-AlstR-GFP-LVV antes e após a aplicação de Alst no perfusato. Observe a ausência de alterações na atividade dos nervos respiratórios após a inibição dos neurônios NE do LC. I: Inspiração; post-I: pós-inspiração; E2: segunda metade da expiração.

Os dados agrupados mostram que a inibição aguda e seletiva dos neurônios NE do LC, por meio da Alst adicionada à solução de perfusão, não alterou a fR ($0,33 \pm 0,03$ vs $0,33 \pm 0,02$ Hz), a DE ($3,49 \pm 0,13$ vs $3,44 \pm 0,15$ s) e a DI ($1,25 \pm 0,08$ vs $1,26 \pm 0,11$ s). Além disso, também não observamos alterações significativas na duração do pre-I do HN ($0,20 \pm 0,01$ vs $0,20 \pm 0,01$ s) e do cVN ($0,19 \pm 0,01$ vs $0,18 \pm 0,01$ s), bem como na duração da atividade pós-inspiratória do cVN (2.99 ± 0.09 vs. 3.04 ± 0.08) após inibição aguda e seletiva desses neurônios (Figura 6, painéis A-D). Esses dados demonstram que os neurônios NE do LC não estão envolvidos na geração central do padrão respiratório motor trifásico em preparações *in situ* de ratos durante condições basais.

Figura 6. Dados agrupados dos efeitos da inibição aguda dos neurônios NE do LC em preparações *in situ* de ratos durante normocapnia. fR (A), DI e DE (B), duração do pre-I do HN (C) e do cVN (D) antes e após aplicação de Alst no perfusato em preparações *in situ* de ratos transfectados bilateralmente com PRSx8-AlstR-GFP-LVV em neurônios NE do LC durante normocapnia.

4.3. Alterações do padrão respiratório induzidas pela inibição dos neurônios NE do LC com Alst antes da hipercapnia/acidose (10% CO₂).

Durante a hipercapnia/acidose (10 min - 10% CO₂; n=6) foi possível observar aumento da amplitude do AbN (expiração ativa), caracterizado pela presença do evento *late-E*, na fase final da E2, em preparações *in situ* de ratos transfectados com PRSx8-AlstR-GFP-LVV (Figura 7, painéis A e Bii). Além disso, nesta fase também observamos aumento da duração do pre-I do cVN (0.37 ± 0.03 vs 0.23 ± 0.03 s; $p < 0.0001$; Figura 7, painéis A e Bi). A hipercapnia/acidose também aumentou a amplitude do PN (123.6 ± 4.77 %) e a DE (4.06 ± 0.15 vs 3.35 ± 0.18 s; $p < 0.0001$), mas reduziu a DI (0.58 ± 0.06 vs 1.2 ± 0.08 s; $p < 0.0001$) e a duração da atividade pós-inspiratória do cVN (2.64 ± 0.06 vs 3.07 ± 0.09 ; $p < 0.0001$), sem alterações na fR (0.34 ± 0.02 vs 0.33 ± 0.04 s; Figura 7, painel A e Bi).

Após dez minutos de hipercapnia/acidose, os animais foram novamente expostos a normocapnia para retomar as condições basais. Tendo a atividade dos nervos motores respiratórios normalizada, a Alst foi adicionada a solução de perfusão para inibição aguda e seletiva dos neurônios NE do LC. Dez minutos após, as preparações foram novamente submetidas à hipercapnia/acidose durante dez minutos adicionais. Nesta condição, observamos redução da amplitude ($8,07 \pm 0,33$ vs $11,9 \pm 0,71$ μ V; $p < 0,0001$), bem como da incidência do evento *late-E* do AbN, ou seja, da geração da expiração ativa durante este desafio metabólico (Figura 7, painel A, Bi e Bii). Também observamos redução da resposta inspiratória do PN (amplitude; 107.33 ± 3.1 vs 123.6 ± 4.77 %; $p < 0.0001$) à hipercapnia/acidose, bem como da duração da duração da atividade pós-inspiratória do cVN (2.12 ± 0.05 vs 2.64 ± 0.06 ; $p < 0.0001$) após inibição destes neurônios (Figura 7, painel A, Bi e Bii).

Figura 7. Efeitos da inibição aguda dos neurônios NE do LC na atividade dos nervos respiratórios em preparações *in situ* de ratos antes da hipercapnia/acidose. (A) Registros brutos e tratados da atividade dos AbN, cVN e PN de uma preparação *in situ* de rato transfectado bilateralmente com PRSx8-AlstR-GFP-LVV em neurônios NE do LC. Os animais foram submetidos a uma primeira exposição à hipercapnia/acidose por 10 minutos. Em seguida, foram submetidos novamente a normocapnia e, tendo a atividade dos nervos motores respiratórios normalizada, a Alst foi adicionada a solução de perfusão. Dez minutos após a inibição aguda e seletiva dos neurônios NE do LC, os ratos foram expostos a uma segunda hipercapnia/acidose. Observe a atenuação do aumento da amplitude do AbN, durante a segunda exposição à hipercapnia/acidose, após a inibição aguda e seletiva dos neurônios NE do LC. (Bi) Nota-se a incidência dos eventos *late-E* nos AbN e cVN, antecedendo o início da atividade do PN em todos os ciclos respiratórios, durante a exposição à primeira hipercapnia/acidose. (Bii) Após inibição dos neurônios NE do LC, observa-se redução da incidência do evento *late-E* nos AbN (expiração ativa) e cVN, bem como de suas amplitudes. I: Inspiração; post-I: pós-inspiração; E2: segunda metade da expiração.

Na análise do efeito da inibição aguda e seletiva dos neurônios NE do LC, antes da segunda exposição à hipercapnia/acidose, nas respostas dos nervos motores respiratórios na presença e na ausência do evento *late-E* do AbN, observamos que nos ciclos em que ocorreram este fenômeno (Figura 8, painéis A e B) a inibição destes neurônios não provocou alterações significativas na DI (0.57 ± 0.06 vs 0.58 ± 0.06 s), DE (4.06 ± 0.21 vs 4.06 ± 0.15 s) e na duração do componente pre-I do cVN (0.38 ± 0.02 vs 0.37 ± 0.03 s) em comparação as respostas a hipercapnia/acidose sem a inibição destes neurônios (Figura 7, painéis A, Bi e Bii). Por outro lado, quando da ausência do evento *late-E* do AbN, ou seja, da geração da expiração ativa, a inibição dos neurônios NE do LC, antes da segunda exposição à hipercapnia/acidose, reduziu a DI (1.17 ± 0.09 vs 0.58 ± 0.06 s; $p < 0.0001$), DE (3.5 ± 0.22 vs 4.06 ± 0.15 s; $p = 0.003$) e a duração do pre-I do cVN (0.21 ± 0.02 vs 0.37 ± 0.03 s; $p < 0.0001$; Figura 8, painel C e D), as quais não foram diferentes dos valores observados nas condições basais [(DI: 1.17 ± 0.09 vs 1.2 ± 0.08 s) (DE: 3.5 ± 0.22 vs 3.35 ± 0.18 s) (pre-I cVN: 0.21 ± 0.02 vs 0.23 ± 0.03 s) (Figura 7, painéis A, Bi e Bii)].

Figura 8. Dados agrupados dos efeitos da inibição aguda dos neurônios NE do LC em preparações *in situ* de ratos antes da hipercapnia/acidose. DI/DE e duração do pre-I do cVN na presença (A e B, respectivamente) e na ausência (C e D) do evento *late-E* do AbN em resposta a hipercapnia/acidose antes e após aplicação de Alst no perfusato em preparações *in situ* de ratos transfectados bilateralmente com PRSx8-AlstR-GFP-LVV em neurônios NE do LC.

4.4. Alterações do padrão respiratório induzidas pela inibição dos neurônios NE do LC com Alst durante hipercapnia/acidose (10% CO₂).

Em outro grupo de animais (n=7), investigamos os efeitos da inibição aguda e seletiva dos neurônios NE do LC durante a exposição à hipercapnia/acidose (10 min - 10% CO₂). Como descrito na seção anterior, a hipercapnia/acidose também aumentou a amplitude do AbN (expiração ativa - evento *late-E*), na fase final da E2, em preparações *in situ* de ratos transfectados com PRSx8-AlstR-GFP-LVV (Figura 9, painéis A e Bi). Além disso, nesta fase também observamos aumento da duração do pre-I do cVN (0.39 ± 0.02 vs 0.24 ± 0.02 s; $p < 0.0001$) e do HN (0.39 ± 0.01 vs 0.21 ± 0.04 s; $p < 0.0001$; Figura 9, painéis A e Bi). A hipercapnia/acidose também aumentou a amplitude do PN (125.7 ± 3.2 %) e do HN (155 ± 4.21 %) e a DE (4.04 ± 0.11 vs 3.31 ± 0.13 s; $p < 0.0001$), mas reduziu a DI (0.56 ± 0.04 vs 1.3 ± 0.09 s; $p < 0.0001$) e a duração da atividade pós-inspiratória do cVN (2.6 ± 0.03 vs 3 ± 0.08 ; $p < 0.0001$), sem alterar a fR (0.36 ± 0.04 vs 0.33 ± 0.07 s; Figura 9, painéis A e Bi). Após a adição da Alst, observamos reduções na amplitude do AbN ($7,02 \pm 0,46$ vs $11,71 \pm 0,96$ μ V; $p < 0,0001$) e em alguns momentos, a ausência da expiração ativa (evento *late-E* do AbN), bem como reduções nas respostas inspiratórias do PN (110 ± 2.45 vs 125.7 ± 3.2 %; $p < 0.0001$) e HN (119 ± 3.9 vs 155 ± 4.21 %; $p < 0.0001$) e na duração da atividade pós-inspiratória do cVN (2.09 ± 0.06 vs 2.6 ± 0.03 ; $p < 0.0001$; Figura 9, painéis A, Bi e Bii).

Figura 9. Efeitos da inibição aguda dos neurônios NE do LC na atividade dos nervos respiratórios em preparações *in situ* de ratos durante a hipercapnia/acidose. (A) Registros brutos e tratados da atividade dos AbN, cVN, HN e PN de uma preparação *in situ* de rato transfectado bilateralmente com PRSx8-AlstR-GFP-LVV em neurônios NE do LC, antes e após a aplicação de Alst durante a hipercapnia/acidose. Observe alterações na amplitude do AbN após a inibição aguda e seletiva dos neurônios NE do LC. (Bi) Nota-se a incidência do evento *late-E* nos AbN, cVN e HN, antecedendo início da atividade do PN, em todos os ciclos respiratórios. (Bii) Após a inibição dos neurônios NE do LC, observa-se redução da incidência do evento *late-E* nos AbN, cVN e HN (expiração ativa), bem como de suas amplitudes. I: Inspiração; post-I: pós-inspiração; E2: segunda metade da expiração.

A análise do efeito da inibição aguda e seletiva dos neurônios NE do LC, durante a exposição à hipercapnia/acidose, nas respostas dos nervos motores respiratórios na presença e na ausência do evento *late-E* do AbN, revelou que nos ciclos em que ocorreram este fenômeno (Figura 10, painel A e B) a DI (0.56 ± 0.04 vs 0.56 ± 0.04 s), DE (4.06 ± 0.11 vs 4.04 ± 0.11 s) e a duração do pre-I do cVN (0.38 ± 0.02 vs 0.39 ± 0.02 s) e do HN (0.39 ± 0.02 vs 0.39 ± 0.01 s) não foram diferentes daquelas observadas durante a hipercapnia/acidose antes da inibição destes neurônios (Figura 9, painéis A, Bi e Bii). Por outro lado, quando na ausência do evento *late-E* do AbN, ou seja, da geração da expiração ativa, durante a inibição dos neurônios NE do LC, observamos reduções da DI (1.18 ± 0.04 vs 0.56 ± 0.04 s; $p < 0.0001$), DE (3.65 ± 0.18 vs 4.04 ± 0.11 s; $p = 0.001$) e da duração do pre-I do cVN (0.21 ± 0.03 vs 0.39 ± 0.02 s) e do HN (0.22 ± 0.03 vs 0.39 ± 0.01 s; $p < 0.0001$; Figura 10, painel C e D), as quais não foram diferentes dos valores observados nas condições basais [(DI: 1.18 ± 0.04 vs 1.3 ± 0.09 s) (DE: 3.65 ± 0.18 vs 3.31 ± 0.13 s) (pre-I cVN: 0.21 ± 0.03 vs 0.24 ± 0.02 s) (pre-I HN: 0.22 ± 0.03 vs 0.21 ± 0.04) (Figura 9, painéis A, Bi e Bii)].

Figura 10. Dados agrupados dos efeitos da inibição aguda dos neurônios NE do LC em preparações *in situ* de ratos durante a hipercapnia/acidose. Duração do pre-I do HN e do cVN, e a DI e DE na presença (A, B, e C, respectivamente) e na ausência do evento *late-E* (D, E, e F, respectivamente), antes e após aplicação de Alst no perfusato em preparações *in situ* de ratos transfectados bilateralmente com PRSx8-AlstR-GFP-LVV em neurônios NE do LC durante a hipercapnia/acidose.

4.5. Alterações do padrão respiratório após adição de Alst durante hipercapnia/acidose (10% CO₂) - experimento controle.

Para confirmar os efeitos da inibição aguda e seletiva dos neurônios NE do LC usando o constructo PRSx8-AlstR-GFP-LVV, realizamos também a perfusão de Alst em preparações *in situ* de ratos durante a hipercapnia/acidose, porém, após a transfecção dos neurônios NE do LC de ratos com o vírus controle PRSx8-GFP-LVV, os quais não induziram a expressão do AlstR (n=5). Em condições de hipercapnia/acidose, observamos alterações na atividade dos AbN, cVN, HN e PN (Figura 11, painel A), com presença dos eventos *late-E* no registro destes nervos motores, observados na magnificação dos dados (Figura 11, painéis A e Bi). Após a aplicação de Alst em condições de hipercapnia/acidose, mas em preparações *in situ* de ratos que não expressavam o AlstR, não observamos alterações significativas no padrão da atividade dos nervos respiratórios registrados (Figura 11, painel A) e nem alteração na incidência dos eventos *late-E* e/ou expiração ativa (Figura 11, painéis Bi e Bii).

Figura 11. Efeitos da adição de Alst, na ausência da expressão do AlstR em neurônios NE do LC, na atividade dos nervos respiratórios em preparações *in situ* de ratos durante hipercapnia/acidose. (A) Registros brutos e tratados da atividade dos AbN, cVN, HN e PN de uma preparação *in situ* de rato transfectado bilateralmente com PRSx8-GFP-LVV em neurônios NE do LC antes e após a aplicação de Alst durante hipercapnia/acidose. (Bi) Nota-se a incidência dos eventos *late-E* nos AbN, cVN e HN, antecedendo o início da atividade do PN. (Bii) Observe ausência de alterações nas respostas desses nervos à hipercapnia/acidose, e nos eventos *late-E*, após a adição de Alst em ratos que não expressavam o AlstR. I: Inspiração; post-I: pós-inspiração; E2: segunda metade da expiração.

Os dados agrupados mostram que a adição de Alst durante a hipercapnia/acidose, em preparações *in situ* de ratos que não expressavam o AlstR, não provocou alterações na fR ($0,32 \pm 0,03$ vs $0,32 \pm 0,02$ Hz), DE ($4 \pm 0,21$ vs $3,99 \pm 0,11$ s) e DI ($0,55 \pm 0,05$ vs $0,58 \pm 0,03$ s) induzidas pela hipercapnia/acidose. Além disso, não observamos alterações significativas na duração do pre-I do HN ($0,4 \pm 0,02$ vs $0,4 \pm 0,01$ s) e do cVN ($0,42 \pm 0,03$ vs $0,41 \pm 0,02$ s) após adição da Alst (Figura 12, painéis A-D). Esses dados sugerem que os efeitos observados em ratos transfectados com PRSx8-AlstR-GFP-LVV durante a hipercapnia/acidose foram provocados pela ativação do AlstR e consequente inibição dos neurônios NE do LC.

Figura 12. Dados agrupados dos efeitos da adição de Alst, na ausência da expressão do AlstR em neurônios NE do LC, em preparações *in situ* de ratos durante hipercapnia/acidose. fR (A), DI e DE (B), duração da atividade pre-I do HN (C) e do cVN (D) antes e após adição de Alst no perfusato em preparações *in situ* de ratos transfectados bilateralmente com PRSx8-GFP-LVV (vírus controle) em neurônios NE do LC durante hipercapnia/acidose.

4.6. Atividade dos neurônios do LC em condições de normocapnia e hipercapnia.

Para investigar as alterações na frequência de potenciais de ação e na magnitude da modulação respiratória dos neurônios do LC em condições basais e frente à ativação dos quimiorreceptores centrais (hipercapnia/acidose), realizamos registros extracelulares *single unit* às cegas desta população neuronal em preparações *in situ* de ratos. Todos os neurônios foram registrados em condições basais e, em seguida, expostos a condições de hipercapnia/acidose (10 minutos). Nós encontramos na região correspondente ao LC de preparações *in situ* de ratos 16 neurônios que apresentaram três diferentes padrões de modulação pela respiração (Figuras 13 a 15) ou que não apresentavam modulação respiratória (tônicos - Figura 16).

O padrão mais encontrado no LC de preparações *in situ* de ratos foi o de neurônios modulados pela inspiração (6 de 16 neurônios– Figura 13). Esse padrão foi caracterizado pelo aumento da frequência de potenciais de ação durante a atividade do PN (inspiração), seguido de redução da frequência nas fases pós-inspiratória e E2. Observamos que a frequência de potencial de ação desses neurônios aumentou quando os mesmos foram expostos à hipercapnia/acidose (16.65 ± 2.08 vs. 7.79 ± 0.89 Hz; $p < 0,0001$; Figura 13, painéis A, B e C). Observamos também que a magnitude da modulação respiratória destes neurônios também aumentou quando expostos a este desafio metabólico (37.87 ± 4.23 vs. 20.29 ± 3.32 %; $p = 0,0004$; Figura 13, painéis A, B e D), sugerindo que estes neurônios são ativados pela hipercapnia/acidose por meio do aumento da modulação inspiratória.

Figura 13. Registro extracelular *single unit* de um neurônio do LC, modulado pela inspiração, em preparação *in situ* de rato durante condições basais e na hipercapnia/acidose. Registro bruto da atividade do PN e extracelular de um neurônio do LC modulado pela inspiração, bem como sua frequência instantânea, de uma preparação *in situ* de rato em condições basais (A) e durante a hipercapnia/acidose (B). Dados agrupados comparando a frequência de disparo – Spikes/s (C) e a magnitude da modulação respiratória - % (D) de neurônios do LC modulados pela inspiração em preparações *in situ* de ratos antes e após a hipercapnia/acidose. Note que os neurônios do LC registrados aumentam a frequência de potenciais de ação simultaneamente com a atividade do PN e que a exposição a hipercapnia/acidose aumentou a sua frequência, bem como a magnitude da modulação respiratória.

Encontramos também alguns neurônios que apresentavam inibição da sua frequência de potenciais de ação durante a inspiração, seguido de aumento nas fases pós-inspiratória e E2 (3 de 16 neurônios – Figura 14). Observamos que a transição de normocapnia para a hipercapnia/acidose não alterou o seu padrão de modulação respiratória, porém este desafio metabólico aumentou a frequência de potenciais de ação (19.7 ± 2.48 vs. 10.43 ± 0.87 Hz; $p=0,0344$; Figura 14, painéis A, B e C) e a magnitude da modulação respiratória (75.70 ± 5.23 vs. 52.53 ± 3.5 %; $p=0,0076$; Figura 14, painéis A, B e D). Esses resultados indicam que os neurônios do LC registrados com este padrão de modulação respiratória são ativados pela hipercapnia/acidose por meio do aumento da sua atividade durante as fases pós-inspiratória e E2.

Figura 14. Registro extracelular *single unit* de um neurônio do LC, inibido pela inspiração, em preparação *in situ* de rato durante condições basais e na hipercapnia/acidose. Registro bruto da atividade do PN e extracelular de um neurônio do LC inibido pela inspiração, bem como de sua frequência instantânea, de uma preparação *in situ* de rato em condições basais (A) e durante a hipercapnia/acidose (B). Dados agrupados comparando a frequência de potenciais de ação – Spikes/s (C) e a magnitude da modulação respiratória - % (D) dos neurônios do LC inibidos pela inspiração de preparações *in situ* de ratos antes e após a hipercapnia/acidose. Note que o neurônio do LC registrado é inibido durante a atividade do PN e a hipercapnia/acidose aumentou sua frequência de disparo e a magnitude de modulação respiratória durante as fases post-inspiratória e E2.

Adicionalmente, entre os registros extracelulares realizados em preparações *in situ* de ratos, encontramos também células que exibiam modulação pela post-I (3 de 16 neurônios – Figura 15). Estes neurônios apresentavam aumento da frequência de potenciais de ação durante a post-I, e na fase E2 e inspiração a sua frequência foi menor. Quando estas preparações *in situ* de ratos foram submetidas a hipercapnia/acidose, observamos que a magnitude da modulação respiratória destes neurônios do LC durante a post-I foi mais evidente em comparação às condições basais (13.33 ± 3.21 vs. 7.43 ± 1.66 %; $p=0,0280$; Figura 15, painéis A, B e D). Além disso, a exposição a este desafio metabólico provocou aumento da sua frequência de potenciais de ação (6.04 ± 1 vs. 4.4 ± 0.62 Hz; $p=0,0274$; Figura 15, painéis A, B e D). Os dados encontrados sugerem que estes neurônios do LC, modulados pela post-I, são ativados frente ao aumento do $\text{CO}_2/[\text{H}^+]$, por meio do aumento da sua atividade durante a fase pós-inspiratória.

Figura 15. Registro extracelular *single unit* de um neurônio do LC, modulado pela pós-inspiração, em preparação *in situ* de rato durante condições basais e na hipercapnia/acidose. Registro bruto da atividade do PN e extracelular de um neurônio do LC modulado pela pós-inspiração, bem como da sua frequência instantânea, de uma preparação *in situ* de rato em condições basais (A) e durante a hipercapnia/acidose (B). Dados agrupados comparando a frequência de potenciais de ação – Spikes/s (C) e magnitude da modulação respiratória - % (D) de neurônios do LC modulados pela pós-inspiração de preparações *in situ* de ratos antes e após a hipercapnia/acidose. Note que o neurônio do LC registrado aumenta a atividade imediatamente após a atividade do PN (post-I) e que a exposição a hipercapnia/acidose aumenta a magnitude desta modulação.

Observamos em alguns registros extracelulares realizados em neurônios do LC de preparações *in situ* de ratos que algumas células não apresentaram modulação pela respiração (atividade tônica; 4 de 16 neurônios – Figura 16). Também submetemos estes neurônios à hipercapnia/acidose e observamos que seu padrão de disparo não se alterou em comparação com a condição basal (Figura 16, painéis A e B). Entretanto, observamos aumento na sua frequência de potenciais de ação (16.43 ± 4 vs. 7.53 ± 0.71 Hz; $p=0,0146$; Figura 16, painéis A, B e C). Esses resultados indicam que apesar desses neurônios do LC não exibirem modulação pela respiração, eles são ativados e aumentam a sua frequência de potenciais de ação quando expostos a altos níveis de $\text{CO}_2/[\text{H}^+]$.

Figura 16. Registro extracelular *single unit* de um neurônio do LC, não modulado pela respiração (tônico), em preparação *in situ* de rato durante condições basais e na hipercapnia/acidose. Registro bruto da atividade do PN e extracelular de um neurônio do LC não modulado pela respiração, bem como da sua frequência instantânea, de uma preparação *in situ* de rato em condições basais (A) e na hipercapnia/acidose (B). Dados agrupados comparando a frequência de disparo – Spikes/s (C) dos neurônios do LC não-modulados pela respiração de preparações *in situ* de ratos antes e após a hipercapnia/acidose. Note que o neurônio do LC registrado não apresenta modulação pela respiração, mas aumenta a sua frequência de potenciais de ação durante a hipercapnia/acidose.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com o presente trabalho ajudaram a ampliar o nosso conhecimento sobre o papel funcional dos neurônios NE do LC no controle quimiossensorial da geração central do padrão respiratório de três fases de preparações *in situ* de ratos durante condições de hipercapnia/acidose. A inibição aguda e seletiva dos neurônios NE do LC reduziu a amplitude do AbN e a incidência do evento *late-E* do mesmo (expiração ativa) evocada pela hipercapnia/acidose. Observamos também que a inibição desta população neuronal durante este desafio metabólico, provocou redução das respostas inspiratórias observadas no PN e HN, bem como a duração do pre-I dos nervos HN e cVN, relacionados com o controle da resistência das vias aéreas superiores (orofaringe e laringe). Porém, a inibição desses neurônios não provocou alterações significativas na atividade dos nervos motores respiratórios registrados em condições basais. Além disso, em ratos nos quais os neurônios NE do LC não expressavam o AlstR, a adição de Alst não provocou alterações significativas nas respostas dos nervos motores respiratórios frente à hipercapnia/acidose. Os registros extracelulares dos neurônios NE do LC em preparações *in situ* de ratos durante condições basais e em hipercapnia/acidose revelaram diferentes padrões de modulação pela respiração. Apesar das populações neuronais localizadas no LC apresentarem padrão distinto, todas apresentaram aumento da frequência de potenciais de ação durante a exposição a este desafio metabólico. Portanto, esses dados indicam que neurônios NE do LC exercem um importante papel modulatório excitatório na geração central da inspiração, expiração ativa e no controle central da resistência das vias aéreas superiores evocados pela hipercapnia/acidose.

A inibição aguda e seletiva utilizando a Alst foi previamente relatada em neurônios transfectados expressando o AlstR (LECHNER; LEIN; CALLAWAY, 2002; MAGALHÃES et al., 2018; MORAES et al., 2017). O AlstR de *Drosophila*, cuja ativação permite a inibição neuronal reversível em um curto período de tempo, é um receptor acoplado a proteína G que provoca ativação de canais para potássio retificadores de entrada (GIRK), hiperpolarizando a célula e silenciando a atividade neuronal (BIRGÜL et al., 1999). Este receptor é ativado pela ligação do peptídeo Alst, mas não pode ser ativado por ligantes endógenos de mamíferos (BIRGÜL et al., 1999). No presente estudo, nós confirmamos a expressão de AlstR, associada ao

GFP, o que permitiu revelar a seletividade em ~ 90 % dos neurônios TH-positivos (neurônios A6) do LC, por meio da técnica de imunofluorescência. Assim, esta marcação sugere que a adição de Alst inibiu efetivamente uma proporção significativa dos neurônios NE do LC durante a realização da preparação *in situ* de ratos em condições basais e na hipercapnia/acidose.

O presente estudo também demonstrou, por meio da análise da atividade dos nervos motores respiratórios, que a inibição aguda e seletiva dos neurônios NE do LC não provocou alterações significativas na atividade inspiratória, pós-inspiratória e na fase E2 de preparações *in situ* de ratos durante condições basais. Resultados semelhantes sobre parâmetros ventilatórios (BANCARDI et al., 2008, 2010), bem como nas atividades inspiratórias e expiratórias de ratos não anestesiados (MAGALHÃES et al., 2018) durante condições de eupneia foram demonstrados em estudos anteriores utilizando lesão química e permanente dos neurônios ou a inibição aguda e seletiva (farmacogenética) dos neurônios NE do LC. Dessa forma, propomos que os neurônios NE do LC atuam como um centro de vigilância que modula a respiração sob condições de desafio metabólico, como na hipercapnia/acidose, mas não em condições basais.

Está bem estabelecido que o LC participa da quimiorrecepção central na detecção das alterações de $\text{CO}_2/[\text{H}^+]$ (GARGAGLIONI; HARTZLER; PUTNAM, 2010). A hipercapnia/acidose aumenta a frequência de disparo desses neurônios tanto *in vivo* quanto em preparações *in vitro* de ratos (ELAM et al., 1981; PINEDA; AGHAJANIAN, 1997). Estudos prévios utilizaram lesões química e permanente para estudar o papel dos neurônios NE do LC na regulação da respiração evocada por alterações no CO_2 , (BANCARDI et al., 2008; DE CARVALHO et al., 2010; LI; NATTIE, 2006). Entretanto, este método pode apresentar resultados subestimados ou superestimados por um possível efeito compensatório de outras populações neuronais devido à perda gradual e permanente dos neurônios NE do LC. Nossos achados mostram o envolvimento crucial dos neurônios NE do LC no controle central da inspiração (amplitude do PN e HN), da geração central da expiração ativa (amplitude do AbN e incidência do evento *late-E*) e do controle das vias aéreas superiores (pre-I do HN e cVN) em preparações *in situ* de ratos durante a ativação dos quimiorreceptores centrais com hipercapnia/acidose. Obtivemos dados semelhantes utilizando ratos acordados, nos quais foi possível observar envolvimento desta população neuronal com o controle

central da inspiração e da geração da expiração ativa, por meio do uso da técnica de eletromiografia de músculos respiratórios e farmacogenética durante a ativação de quimiorreceptores centrais com hipercapnia/acidose (MAGALHÃES et al., 2018).

Neurônios sensíveis à $\text{CO}_2/[\text{H}^+]$ identificados no LC *in vivo* são tonicamente ativos em situações de aumentos nos níveis de CO_2 (ELAM et al., 1981) ou apresentam diferentes padrões de modulação pela respiração, incluindo a modulação expiratória (GUYENET et al., 1993). Os padrões de atividade dos neurônios do LC registrados no presente estudo são semelhantes àqueles descritos em trabalhos anteriores: neurônios modulados pela inspiração, neurônios inibidos pela inspiração, neurônios modulados pela pós-inspiração e neurônios não modulados (tônico - ELAM et al., 1981; GUYENET et al., 1993). Apesar de apresentarem padrão de modulação respiratória distintas, todos os neurônios registrados no presente estudo aumentaram a sua frequência de potencial de ação e o percentual de modulação respiratória quando expostos à hipercapnia/acidose. Portanto, os nossos dados sugerem que o LC possui neurônios sensíveis à $\text{CO}_2/[\text{H}^+]$ modulados pela respiração.

Existem evidências que os neurônios NE do LC projetam-se para o pre-BötC e regulam a geração da inspiração por meio de modulação excitatória (HILAIRE et al., 2004; VIEMARI et al., 2011). Ao analisar os nossos resultados, não observamos alterações na fR após a inibição aguda e seletiva dos neurônios NE do LC durante condições de hipercapnia/acidose. Em animais intactos, a respiração espontânea provoca ativação de receptores de estiramento pulmonar devido a insuflação dos pulmões. Esse movimento respiratório gera o reflexo de Hering-Breuer (HBR), que é responsável pela transição da inspiração para expiração, e prolongamento da expiração (fase post-I - CLARK; VON EULER, 1972; DHINGRA et al., 2017; KUBIN et al., 2006; LUCK, 1970) e aumento da frequência respiratória (GUZ et al., 1964; SAMMON; BRUCE, 1991). As terminações nervosas presentes no músculo liso dos brônquios e da traquéia (SCHELEGLE; GREEN, 2001), enviam as informações de estiramento para o NTS por meio de seus axônios (BONHAM; COLES; MCCRIMMON, 1993). Sendo assim, os neurônios do NTS que recebem essas informações, projetam-se para os neurônios do Kölliker-Fuse (KF), um núcleo pontino importante para a geração da fase pós-inspiratória (DHINGRA et al., 2017), e para o BötC e pre-BötC (SMITH et al., 2013). Em ratos acordados, observamos que a exposição à hipercapnia/acidose provocou aumento da frequência respiratória (MAGALHÃES et

al., 2018). Entretanto, no presente trabalho, a exposição à hipercapnia/acidose não provocou alterações na fR, provavelmente devido à ausência dos pulmões, e consequentemente da ativação do HBR. Os dados encontrados no presente estudo estão de acordo com outros trabalhos em que preparações *in situ* de ratos foram expostas a hipercapnia/acidose, mas não apresentaram alterações da fR (DE BRITTO; MORAES, 2017; ZOCCAL et al., 2018).

Por outro lado, a inibição aguda e seletiva dos neurônios NE do LC durante este desafio metabólico reduziu a amplitude do PN e HN, sugerindo que estes neurônios modulam a respostas inspiratórias de aumento da amplitude destes nervos, mas não a sua frequência. É possível que a hipercapnia/acidose estimule neurônios NE do LC, que aumentam a atividade dos neurônios inspiratórios do pre-BötC por meio da ativação de receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos (VIEMARI; RAMIREZ, 2006). Dessa forma, propomos que a estimulação dos neurônios inspiratórios excitatórios do pre-BötC, que se projetam para os neurônios pré-motores inspiratórios bulbo-espinhais do grupo respiratório ventrolateral rostral (rVRG), promoveria o aumento da amplitude do PN, por meio dos motoneurônios inspiratórios da medula espinhal (Figura 17 - SMITH et al., 2013). Além de se projetarem para o rVRG, os neurônios inspiratórios excitatórios do pre-BötC também se projetam para o Núcleo Motor do Hipoglosso (XII) onde estão localizados os motoneurônios do HN, explicando o aumento concomitante deste nervo durante a inspiração (Figura 17 - SMITH et al., 2013).

Como citado anteriormente, evidências experimentais sugerem que os neurônios do KF se projetam para os neurônios pós-inspiratórios localizados no BötC para interromper a inspiração, regular a atividade pós-inspiratória no cVN e controlar a transição da inspiração para a expiração (SMITH et al., 2013), além de estimular a contração dos músculos que controlam a resistência das vias aéreas superiores durante a post-I (DUTSCHMANN; HERBERT, 2006). No presente estudo, observamos que as preparações *in situ* de ratos expostas a hipercapnia/acidose apresentaram redução da duração da atividade pós-inspiratória do cVN quando comparadas as condições basais. Além disso, a inibição aguda e seletiva dos neurônios NE do LC durante este desafio metabólico reduziu ainda mais a duração dessa fase nestes animais. Propomos que, além do KF, o LC também seja uma estrutura importante para regular a atividade pós-inspiratória, uma vez que também é um núcleo pontino e que ao ser inibido, alterou a duração desta fase (Figura 17). Entre

os neurônios NE do LC registrados no presente trabalho, encontramos neurônios que apresentavam modulação durante a fase pós-inspiratória e a exposição a hipercapnia/acidose aumentou esta modulação, suportando a hipótese de que o LC é importante para esta fase, principalmente durante este desafio metabólico.

Figura 17. Circuito hipotético da modulação dos neurônios NE do LC no controle central da inspiração e na atividade pós-inspiratória durante a hipercapnia/acidose. Propomos que os neurônios NE do LC participam do controle central da inspiração durante a hipercapnia/acidose por meio de projeções para neurônios inspiratórios excitatórios do Complexo pre-Bötzing (pre-BötC), que por sua vez estimulam neurônios bulbo-espinhais pré-motores inspiratórios do Grupo Respiratório Ventral Rostral (rVRG), promovendo aumento da amplitude do nervo frênico (PN) por aumento da atividade de motoneurônios inspiratórios da medula espinhal. Além disso, propomos que os neurônios NE do LC controlam a resistência das vias aéreas superiores durante a inspiração pois estimulam os neurônios inspiratórios excitatórios do pre-BötC que também enviam projeções para o Núcleo Motor do Hipoglosso (XII) onde localizam-se motoneurônios inspiratórios que controlam a atividade do nervo hipoglosso (HN). Propomos ainda que além do Kölliker-Fuse (KF), o LC também é uma estrutura importante para a geração da atividade pós-inspiratória, modulando esta fase por meio de projeções para o Complexo Bötzing (BötC), onde localizam-se neurônios pós-inspiratórios (post-I), responsáveis pela transição da inspiração para expiração.

Apesar de não termos registrado neurônios que apresentam modulação no final da expiração, propomos que neurônios NE do LC que disparam na fase E2 podem mediar a expiração ativa do AbN, durante aumentos de $\text{CO}_2/[\text{H}^+]$, por meio da excitação do oscilador expiratório localizado no pFRG ou diretamente via o grupo respiratório ventrolateral caudal (cVRG) no bulbo, onde localizam-se neurônios bulbo-espinhais pré-motores expiratórios, que controlam a atividade dos músculos abdominais (Figura 18). Propomos ainda, que quando ocorre aumento do $\text{CO}_2/[\text{H}^+]$, os neurônios NE do LC podem liberar noradrenalina tonicamente, provocando oscilações do potencial de membrana dos neurônios expiratórios do pFRG, alterando sua frequência de potenciais de ação, para regular tanto a incidência do evento *late-E* como a amplitude do AbN (Figura 18 - MOLKOV et al., 2010). Existe uma densa inervação catecolaminérgica para a região mais medial ao pFRG, que possui neurônios sensíveis ao CO_2 , o RTN (ROSIN; CHANG; GUYENET, 2006). Apesar de dados recentes terem demonstrado que a noradrenalina no RTN não contribui para as respostas respiratórias evocadas pela ativação dos quimiorreceptores centrais em ratos não-anestesiados (OLIVEIRA et al., 2016), experimentos eletrofisiológicos adicionais são necessários para avaliar mecanismos sinápticos e o papel dos receptores adrenérgicos no pFRG na geração da expiração ativa evocada pela hipercapnia/acidose.

Figura 18. Circuito hipotético da modulação dos neurônios NE do LC na geração central da expiração ativa e no controle da resistência das vias aéreas superiores durante a hipercapnia/acidose. Propomos que os neurônios do LC podem excitar os neurônios expiratórios do Grupo Respiratório parafacial (pFRG), ou diretamente o Grupo Respiratório Ventral Caudal (cVRG), onde localizam-se neurônios bulbo-espinhais pré-motores expiratórios, que modulam a atividade do músculo abdominal, em resposta à hipercapnia/acidose ($\uparrow \text{CO}_2/\text{[H}^+]$). Propomos ainda que a liberação tônica de noradrenalina pelo LC pode provocar oscilações do potencial de membrana dos neurônios expiratórios do pFRG alterando sua frequência de potenciais de ação durante a hipercapnia/acidose, regulando assim, tanto a amplitude quanto a incidência da atividade do nervo abdominal (AbN). Além disso, propomos que o LC modula a resistência das vias aéreas superiores via projeções para o Núcleo Ambíguo caudal (cNA) e Núcleo Motor do Hipoglosso (XII), que controlam a atividade dos nervos vago cervical (cVN) e hipoglosso (HN), respectivamente.

Os neurônios expiratórios do pFRG parecem exercer modulação excitatória para motoneurônios inspiratórios craniais que controlam a orofaringe e laringe (HN e cVN). Portanto, simultaneamente com a expiração ativa observada no AbN, os neurônios expiratórios do pFRG promovem aumentos da atividade do HN e SLN, no final da fase E2, para controlar a resistência das vias aéreas superiores (protusão da língua e abdução da glote) em situação de alta demanda metabólica (DE BRITTO; MORAES, 2017). Os nossos resultados mostraram que durante condições de hipercapnia/acidose, houve aumento da duração do pre-I do HN e cVN, que tiveram o seu início antecipado à atividade inspiratória observada no PN, para controlar a resistência das vias aéreas superiores simultaneamente com a expiração ativa. A inibição aguda e seletiva dos neurônios NE do LC normalizou a duração do pre-I, normalizou a DI e eliminou a expiração ativa no AbN, mesmo em condições de hipercapnia/acidose. Dessa forma, propomos que além da participação na geração da expiração ativa, o LC também desempenha um importante papel no controle da resistência das vias aéreas superiores durante situações de desafio metabólico. Nossa hipótese é de que a possível modulação do LC nos neurônios expiratórios do pFRG, contribui para o controle das vias aéreas superiores por meio de projeções para o Núcleo Ambíguo caudal (cNA) e para o XII, que controlam a atividade do cVN e HN, respectivamente, a fim de provocar abdução da glote e protusão da língua (BRANCATISANO; DODD; ENGEL, 1991; FREGOSI; LUDLOW, 2014). Por outro lado, existem evidências de que o LC controla a resistência das vias aéreas superiores por meio de modulação direta para o XII, independente da participação do pFRG (LUI et al., 2018).

Evidências experimentais demonstraram que a hipercapnia/acidose é capaz de produzir diferentes intensidades de estado de alerta e de despertar (WULBRAND et al., 2008), e o aumento deste comportamento está associado com ativação dos neurônios NE do LC (CARTER et al., 2010b). Durante outras situações de desafio metabólico, como na apneia obstrutiva do sono (AOS), ocorre o aumento da atividade dos músculos que controlam a resistência das vias aéreas superiores para promover ajustes compensatórios na $\dot{V}_E$ (WULBRAND et al., 2008). Sendo assim, com base nos dados referentes as alterações dos nervos motores respiratórios observadas em função da inibição aguda e seletiva de neurônios NE do LC, nós propomos que o papel desta população neuronal na geração da expiração ativa, no aumento da atividade inspiratória e no controle das vias aéreas superiores é importante para manter o

estado de vigilância durante situações de desafio metabólico, como a hipercapnia/acidose ou em episódios de AOS, mas não em situação basal.

O LC também está envolvido com comportamentos aversivos, como estresse, ansiedade e depressão (ALBA-DELGADO et al., 2013; MCCALL et al., 2015), uma vez que essa estrutura apresenta subgrupos específicos de neurônios NE que projetam-se para o córtex pré-frontal (LOPES et al., 2016). Dados recentes mostram que a inalação de ar enriquecido com CO₂ pode produzir comportamentos como ansiedade e medo (WINTER et al., 2017). Entretanto, em relação aos dados encontrados no nosso estudo, nós não podemos definir se os neurônios NE do LC que participam das respostas inspiratória, expiratória e da resistência das vias aéreas superiores frente à hipercapnia/acidose também controlam as alterações comportamentais em resposta a este desafio metabólico em ratos.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Os neurônios NE do LC desempenham um papel modulatório importante na geração central do padrão motor respiratório de três fases em preparações *in situ* de ratos frente à ativação dos quimiorreceptores centrais. Durante este desafio metabólico, esta população neuronal é importante para geração central da atividade inspiratória, para a geração central da expiração ativa e para controlar a resistência das vias aéreas superiores.

Os diferentes padrões de modulação respiratória encontrados nos registros dos neurônios do LC no presente estudo suportam a ideia de que esta estrutura possui subpopulações neuronais, que podem ser modulados por diferentes fases da respiração. Além disso, essas subpopulações poderiam projetar-se para diferentes estruturas do sistema nervoso central, atuando independentemente na modulação da respiração ou atuando em conjunto para controlar respostas comportamentais.

Apesar dos dados obtidos no presente estudo referentes a modulação dos neurônios NE do LC sobre a geração central da respiração durante hipercapnia/acidose serem claros, os circuitos envolvendo o LC e outras estruturas importantes para gerar estas respostas ainda não estão bem estabelecidos. Dessa forma, estes dados abrem perspectivas para estudos adicionais que ajudem a compreender a participação desta estrutura com a geração central da respiração e alterações comportamentais frente à ativação dos quimiorreceptores centrais de ratos.

Referências

7. REFERENCIAS

ABDALA, A. P. L. et al. Multiple pontomedullary mechanisms of respiratory rhythmogenesis. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 168, n. 1–2, p. 19–25, 2009a.

ABDALA, A. P. L. et al. Abdominal expiratory activity in the rat brainstem-spinal cord in situ: Patterns, origins and implications for respiratory rhythm generation. **Journal of Physiology**, v. 587, n. 14, p. 3539–3559, 2009b.

ABRAHAM, K. A. et al. Respiratory-related activation of human abdominal muscles during exercise. **The Journal of Physiology**, v. 541, n. 2, p. 653–663, jun. 2002.

ALBA-DELGADO, C. et al. Chronic pain leads to concomitant noradrenergic impairment and mood disorders. **Biological Psychiatry**, v. 73, n. 1, p. 54–62, 2013.

ANDERSON, T. M. et al. A novel excitatory network for the control of breathing. **Nature**, v. 536, n. 7614, p. 76–80, 27 ago. 2016.

ASTON-JONES, G. Behavioral functions of locus coeruleus derived from cellular attributes. **Physiological Psychology**, v. 13, n. 3, p. 118–126, 1986.

BERRIDGE, C. W.; WATERHOUSE, B. D. The locus coeruleus–noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. **Brain Research Reviews**, v. 42, n. 1, p. 33–84, abr. 2003.

BIANCARDI, V. et al. Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO₂ drive to breathing. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 455, n. 6, p. 1119–1128, 13 mar. 2008.

BIANCARDI, V. et al. Role of Locus coeruleus noradrenergic neurons in cardiorespiratory and thermal control during hypoxia. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 170, n. 2, p. 150–156, fev. 2010.

BIRGÜL, N. et al. Reverse physiology in Drosophila: Identification of a novel allatostatin-like neuropeptide and its cognate receptor structurally related to the mammalian somatostatin/galanin/opioid receptor family. **EMBO Journal**, v. 18, n. 21, p. 5892–5900, 1999.

BOLME, P.; FUXE, K. Pharmacological studies on a possible role of central noradrenaline neurons in respiratory control. **Journal Pharmacy Pharmacology**, v. 25, n. 4, p. 351–352, 1973.

BONHAM, A. C.; COLES, S. K.; MCCRIMMON, D. R. Pulmonary stretch receptor afferents activate excitatory amino acid receptors in the nucleus tractus solitarii in rats. **The Journal of Physiology**, v. 464, n. 1, p. 725–745, 1 maio 1993.

BRANCATISANO, A.; DODD, D. S.; ENGEL, L. A. Posterior cricoarytenoid activity and glottic size during hyperpnea in humans. **Journal of Applied Physiology**, v. 71, p. 977–982, 1991.

CARTER, M. E. et al. Tuning arousal with optogenetic modulation of locus coeruleus neurons. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 12, p. 1526–1533, 31 dez. 2010a.

CARTER, M. E. et al. Tuning arousal with optogenetic modulation of locus coeruleus neurons. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 12, p. 1526–1533, 31 dez. 2010b.

CLARK, F. J.; VON EULER, C. On the regulation of depth and rate of breathing. **The Journal of Physiology**, v. 222, n. 2, p. 267–295, 1 abr. 1972.

COLEMAN, J. E. et al. Efficient large-scale production and concentration of HIV-1-based lentiviral vectors for use in vivo. **Physiological Genomics**, v. 12, n. 3, p. 221–228, 6 fev. 2003.

DE BRITTO, A. A.; MORAES, D. J. A. Non-chemosensitive parafacial neurons simultaneously regulate active expiration and airway patency under hypercapnia in rats. **The Journal of Physiology**, v. 595, n. 6, p. 2043–2064, 15 mar. 2017.

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

DEAN, J. B.; LAWING, W. L.; MILLHORN, D. E. CO₂ decreases membrane conductance and depolarizes neurons in the nucleus tractus solitarii. **Experimental Brain Research**, v. 76, n. 3, p. 656–661, 1989.

DHINGRA, R. R. et al. Kölliker-Fuse nuclei regulate respiratory rhythm variability via a gain-control mechanism. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 312, n. 2, p. R172–R188, 2017.

DUTSCHMANN, M.; DICK, T. E. Pontine Mechanisms of Respiratory Control. In: **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2012. v. 2p. 2443–2469.

DUTSCHMANN, M.; HERBERT, H. The Kölliker-Fuse nucleus gates the postinspiratory phase of the respiratory cycle to control inspiratory off-switch and upper airway resistance in rat. **European Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 4, p. 1071–1084, ago. 2006.

ELAM, M. et al. Hypercapnia and hypoxia: Chemoreceptor-mediated control of locus coeruleus neurons and splanchnic, sympathetic nerves. **Brain Research**, v. 222, n. 2, p. 373–381, out. 1981.

FILOSA, J. A.; DEAN, J. B.; PUTNAM, R. W. Role of intracellular and extracellular pH in the chemosensitive response of rat locus coeruleus neurones. **Journal of Physiology**, v. 541, n. Pt 2, p. 493–509, 2002.

FREGOSI, R. F.; LUDLOW, C. L. Activation of upper airway muscles during breathing and swallowing. **Journal of Applied Physiology**, v. 116, n. 3, p. 291–301, 2014.

FUKUDA, Y.; HONDA, Y. pH-sensitive cells at ventro-lateral surface of rat medulla oblongata. **Nature**, v. 256, n. 5515, p. 317–318, 24 jul. 1975.

GARGAGLIONI, L. H.; HARTZLER, L. K.; PUTNAM, R. W. The locus coeruleus and central chemosensitivity. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 173, n. 3, p. 264–273, out. 2010.

GARNER, M. et al. Inhalation of 7.5% carbon dioxide increases alerting and orienting attention network function. **Psychopharmacology**, v. 223, n. 1, p. 67–73, 2012.

GUYENET, P. G. et al. Central respiratory control of A5 and A6 pontine noradrenergic neurons. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 264, n. 3, p. R1035-44, 1993.

GUYENET, P. G. Regulation of breathing and autonomic outflows by chemoreceptors. **Comprehensive Physiology**, v. 4, n. 4, p. 1511–1562, 2014.

GUZ, A. et al. Studies on the vagus nerves in man: their role in respiratory and circulatory control. **Clinical Science**, v. 27, p. 293–304, out. 1964.

HICKEY, L. et al. Optoactivation of Locus Ceruleus Neurons Evokes Bidirectional Changes in Thermal Nociception in Rats. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 12, p. 4148–4160, 2014.

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

HOBSON, J.; MCCARLEY, R.; WYZINSKI, P. Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. **Science**, v. 189, n. 4196, p. 55–58, 1975.

HUCKSTEPP, R. T. R. et al. Role of Parafacial Nuclei in Control of Breathing in Adult Rats. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 3, p. 1052–1067, 21 jan. 2015.

JENKIN, S. E. M.; MILSOM, W. K. Expiration: Breathing's other face. **Progress in Brain Research**, v. 212, n. C, p. 131–147, 2014.

JENKIN, S. E. M.; MILSOM, W. K.; ZOCCAL, D. B. The Kölliker–Fuse nucleus acts as a timekeeper for late-expiratory abdominal activity. **Neuroscience**, v. 348, p. 63–72, 2017.

JOHNSON, S. M.; HAXHIU, M. A.; RICHERSON, G. B. GFP-expressing locus ceruleus neurons from Prp57 transgenic mice exhibit CO₂/H⁺ responses in primary cell culture. **Journal of Applied Physiology**, v. 105, n. 4, p. 1301–1311, 2008.

KOIZUMI, H. et al. TASK Channels Contribute to the K⁺-Dominated Leak Current Regulating Respiratory Rhythm Generation In Vitro. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 12, p. 4273–4284, 24 mar. 2010.

KUBIN, L. et al. Central pathways of pulmonary and lower airway vagal afferents. **Journal of Applied Physiology**, v. 101, n. 2, p. 618–627, ago. 2006.

LECHNER, H. A. E.; LEIN, E. S.; CALLAWAY, E. M. A Genetic Method for Selective and Quickly Reversible Silencing of Mammalian Neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 13, p. 5287–5290, 2002.

LEE COATES, E.; LI, A.; NATTIE, E. E. Widespread sites of brain stem ventilatory chemoreceptors. **Journal of Applied Physiology**, v. 75, n. 1, p. 5–14, 1993.

LI, A.; NATTIE, E. CO₂ dialysis in one chemoreceptor site, the RTN: Stimulus intensity and sensitivity in the awake rat. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 133, n. 1–2, p. 11–22, 2002.

LI, A.; NATTIE, E. Catecholamine neurones in rats modulate sleep, breathing, central chemoreception and breathing variability. **Journal of Physiology**, 2006.

LOPES, L. T. et al. Anatomical and functional connections between the locus coeruleus and the nucleus tractus solitarius in neonatal rats. **Neuroscience**, v. 324, p. 446–468, jun. 2016.

LUCK, J. C. Afferent vagal fibres with an expiratory discharge in the rabbit. **The Journal of Physiology**, v. 211, n. 1, p. 63–71, 1 nov. 1970.

LUI, S. et al. Brainstem Nuclei Associated with Mediating Apnea-Induced Respiratory Motor Plasticity. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 12709, 23 dez. 2018.

MAGALHÃES, K. S. et al. Locus Coeruleus as a vigilance centre for active inspiration and expiration in rats. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 15654, 23 dez. 2018.

MARINA, N. et al. Control of sympathetic vasomotor tone by catecholaminergic C1 neurones of the rostral ventrolateral medulla oblongata. **Cardiovascular Research**, v. 91, n. 4, p. 703–710, 2011.

MARTINS, A. R. O.; FROEMKE, R. C. Coordinated forms of noradrenergic plasticity in the locus coeruleus and primary auditory cortex. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 1483–1492, 24 out. 2015.

MCCALL, J. G. et al. CRH Engagement of the Locus Coeruleus Noradrenergic System Mediates Stress-Induced Anxiety. **Neuron**, v. 87, n. 3, p. 606–621, 2015.

MITCHELL, R.A., LOESCHCKE, H.H., MASSION, W.H., SEVERINGHAUS, J. W. Respiratory responses mediated through superficial chemosensitive areas on the medulla. **Journal of Applied Physiology**, v. 18, p. 523–533, 1963.

MOLKOV, Y. I. et al. Late-expiratory activity: emergence and interactions with the respiratory CpG. **Journal of Neurophysiology**, v. 104, n. 5, p. 2713–2729, 2010.

MOLKOV, Y. I. et al. Intermittent hypoxia-induced sensitization of central chemoreceptors contributes to sympathetic nerve activity during late expiration in rats. **Journal of Neurophysiology**, v. 105, n. 6, p. 3080–91, 2011.

MORAES, D. J. A. et al. Contribution of the retrotrapezoid nucleus/parafacial

respiratory region to the expiratory-sympathetic coupling in response to peripheral chemoreflex in rats. **Journal of Neurophysiology**, v. 108, n. 3, p. 882–890, ago. 2012.

MORAES, D. J. A. et al. Role of ventral medullary catecholaminergic neurons for respiratory modulation of sympathetic outflow in rats. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 16883, 4 dez. 2017.

NATTIE, E.; LI, A. Central chemoreception is a complex system function that involves multiple brain stem sites. **Journal of Applied Physiology**, v. 106, n. 4, p. 1464–1466, abr. 2009.

NEUFANG, S. et al. Cognitive-behavioral therapy effects on alerting network activity and effective connectivity in panic disorder. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 0, n. 0, p. 0, 4 out. 2018.

OLIVEIRA, L. M. et al. α 1- and α 2-adrenergic receptors in the retrotrapezoid nucleus differentially regulate breathing in anesthetized adult rats. **Journal of Neurophysiology**, v. 116, n. 3, p. 1036–1048, set. 2016.

OYAMADA, Y. et al. Respiration-modulated membrane potential and chemosensitivity of locus coeruleus neurones in the in vitro brainstem-spinal cord of the neonatal rat. **The Journal of Physiology**, v. 513.2, p. 381–398, 1998.

PAGLIARDINI, S. et al. Active Expiration Induced by Excitation of Ventral Medulla in Adult Anesthetized Rats. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 8, p. 2895–2905, 23 fev. 2011.

PATON, J. F. R. A working heart-brainstem preparation of the mouse. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 65, n. 1, p. 63–68, mar. 1996.

PATON, J. F. R.; DUTSCHMANN, M. Central control of upper airway resistance regulating respiratory airflow in mammals. **Journal of Anatomy**, v. 201, n. 4, p. 319–323, 2002.

PINEDA, J.; AGHAJANIAN, G. K. Carbon dioxide regulates the tonic activity of locus coeruleus neurons by modulating a proton- and polyamine-sensitive inward rectifier potassium current. **Neuroscience**, v. 77, n. 3, p. 723–743, 1997.

PISANSKI, A.; PAGLIARDINI, S. The parafacial respiratory group and the control of active expiration. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, n. June, p. 0–1, 2018.

POON, C.-S.; SONG, G. Bidirectional Plasticity of Pontine Pneumotaxic Postinspiratory Drive: Implication for a Pontomedullary Respiratory Central Pattern Generator. In: **Progress in Brain Research**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2014. v. 209p. 235–254.

PUTNAM, R. W.; FILOSA, J. A.; RITUCCI, N. A. Cellular mechanisms involved in CO₂ and acid signaling in chemosensitive neurons. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 287, n. 6, p. C1493–C1526, dez. 2004.

QUINTERO, M. C.; PUTNAM, R. W.; CORDOVEZ, J. M. Theoretical perspectives on central chemosensitivity: CO₂/H⁺-sensitive neurons in the locus coeruleus. **PLoS Computational Biology**, v. 13, n. 12, p. R780–R792, 2017.

RICHERSON, G. B. Response to CO₂ of neurons in the rostral ventral medulla in vitro. **Journal of Neurophysiology**, v. 73, n. 3, p. 933–44, 1995.

RICHTER, D. W.; SMITH, J. C. Respiratory Rhythm Generation In Vivo. **Physiology**, v. 29, n. 1, p. 58–71, jan. 2014.

ROSIN, D. L.; CHANG, D. A.; GUYENET, P. G. Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus. **Journal of Comparative Neurology**, v. 499, n. 1, p. 64–89, 1 nov. 2006.

SAMMON, M. P.; BRUCE, E. N. Vagal afferent activity increases dynamical dimension of respiration in rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 70, n. 4, p. 1748–1762, abr. 1991.

SAMUELS, E.; SZABADI, E. Functional Neuroanatomy of the Noradrenergic Locus Coeruleus: Its Roles in the Regulation of Arousal and Autonomic Function Part I: Principles of Functional Organisation. **Current Neuropharmacology**, v. 6, n. 3, p. 235–253, 2008.

SARA, S. J.; BOURET, S. Orienting and Reorienting: The Locus Coeruleus Mediates Cognition through Arousal. **Neuron**, v. 76, n. 1, p. 130–141, out. 2012.

SCHELEGLE, E. S.; GREEN, J. F. An overview of the anatomy and physiology of slowly adapting pulmonary stretch receptors. **Respiration Physiology**, v. 125, n. 1–2, p. 17–31, mar. 2001.

SCHLAEFKE, M. E.; SEE, W. R.; LOESCHCKE, H. H. Ventilatory response to alterations of H⁺ ion concentration in small areas of the ventral medullary surface. **Respiration Physiology**, v. 10, p. 198–212, 1970.

SCHWARZACHER, S. W.; WILHELM, Z.; RICHTER, D. W. The medullary respiratory network in the rat. **Journal of Physiology**, v. 435, n. 1, p. 631–644, 1991.

SMITH, J. et al. Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. **Science**, v. 254, n. 5032, p. 726–729, 1 nov. 1991.

SMITH, J. C. et al. **Brainstem respiratory networks: Building blocks and microcircuits.** **Trends in Neurosciences**, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2012.11.004>>

STUNDEN, C. E. et al. Development of in vivo ventilatory and single chemosensitive neuron responses to hypercapnia in rats. **Respiration Physiology**, v. 127, n. 2–3, p. 135–155, 2001.

SVED, A. F.; FELSTEN, G. Stimulation of the locus coeruleus decreases arterial pressure. **Brain Research**, v. 414, n. 1, p. 119–132, 1987.

SZABADI, E. Functional neuroanatomy of the central noradrenergic system. **Journal**

of Psychopharmacology, v. 27, n. 8, p. 659–93, 2013.

TAKEUCHI, T. et al. Locus coeruleus and dopaminergic consolidation of everyday memory. **Nature**, v. 537, n. 7620, p. 357–362, 7 set. 2016.

TESCHEMACHER, A. G. et al. Area-specific differences in transmitter release in central catecholaminergic neurons of spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 52, n. 2, p. 351–358, 2008.

VIEMARI, J.-C. et al. Activation of alpha-2 noradrenergic receptors is critical for the generation of fictive eupnea and fictive gasping inspiratory activities in mammals in vitro. **European Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 12, p. 2228–2237, jun. 2011.

VIEMARI, J.-C.; RAMIREZ, J.-M. Norepinephrine Differentially Modulates Different Types of Respiratory Pacemaker and Nonpacemaker Neurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 95, n. 4, p. 2070–2082, abr. 2006.

WANG, G. et al. Modulation of inspiratory inhibition of the Botzinger complex by raphe pallidus and locus coeruleus in rabbits. v. 551, n. 86, p. 127–133, 2004.

WANG, W.; PIZZONIA, J. H.; RICHERSON, G. B. Chemosensitivity of rat medullary raphe neurones in primary tissue culture. **Journal of Physiology**, v. 511, n. 2, p. 433–450, 1998.

WINTER, A. et al. Differential behavioral sensitivity to carbon dioxide (CO₂) inhalation in rats. **Neuroscience**, v. 346, p. 423–433, mar. 2017.

WULBRAND, H. et al. The Role of Arousal Related Brainstem Reflexes in Causing Recovery from Upper Airway Occlusion in Infants. **SLEEP**, v. 31, n. 6, p. 833–840, 2008.

YAMANISHI, T. et al. Possible involvement of neurons in locus coeruleus in inhibitory effect on glossopharyngeal expiratory activity in a neonatal rat brainstem-spinal cord preparation in vitro. **Neuroscience Research**, v. 60, n. 1, p. 2–9, 2008.

ZOCCAL, D. B. et al. Interaction between the retrotrapezoid nucleus and the parafacial respiratory group to regulate active expiration and sympathetic activity in rats. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, p. ajplung.00011.2018, 6 set. 2018.

ZOCCAL, D. B.; PATON, J. F. R.; MACHADO, B. H. Do changes in the coupling between respiratory and sympathetic activities contribute to neurogenic hypertension? **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 36, n. 12, p. 1188–1196, 2009.

8. APÊNDICE

8.1. APÊNDICE A – Artigo publicado na revista *Scientific Reports*

www.nature.com/scientificreports

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Locus Coeruleus as a vigilance centre for active inspiration and expiration in ratsKarolyne S. Magalhães¹, Pedro F. Spiller¹, Melina P. da Silva¹, Luciana B. Kuntze¹, Julian F. R. Paton^{2,3}, Benedito H. Machado¹ & Davi J. A. Moraes¹

Received: 15 June 2018

Accepted: 8 October 2018

Published online: 23 October 2018

At rest, inspiration is an active process while expiration is passive. However, high chemical drive (hypercapnia or hypoxia) activates central and peripheral chemoreceptors triggering reflex increases in inspiration and active expiration. The *Locus Coeruleus* contains noradrenergic neurons (A6 neurons) that increase their firing frequency when exposed to hypercapnia and hypoxia. Using recently developed neuronal hyperpolarising technology in conscious rats, we tested the hypothesis that A6 neurons are a part of a vigilance centre for controlling breathing under high chemical drive and that this includes recruitment of active inspiration and expiration in readiness for flight or fight. Pharmacogenetic inhibition of A6 neurons was without effect on resting and on peripheral chemoreceptors-evoked inspiratory, expiratory and ventilatory responses. On the other hand, the number of sighs evoked by systemic hypoxia was reduced. In the absence of peripheral chemoreceptors, inhibition of A6 neurons during hypercapnia did not affect sighing, but reduced both the magnitude and incidence of active expiration, and the frequency and amplitude of inspiration. These changes reduced pulmonary ventilation. Our data indicated that A6 neurons exert a CO₂-dependent modulation of expiratory drive. The data also demonstrate that A6 neurons contribute to the CO₂-evoked increases in the inspiratory motor output and hypoxia-evoked sighing.

The *Locus Coeruleus* (LC) is the principal noradrenergic nucleus (A6 neurons) in the CNS¹. These neurons send extensive projections throughout the neuraxis and are implicated in the control of many homeostatic functions^{2–5}, including chemosensory control of breathing^{6–8}. In this regard, A6 neurons of rats respond to hypercapnic stimulation of central chemoreceptors *in vivo*⁹ and a large proportion of them are found to be intrinsically sensitive to CO₂/[H⁺] *in vitro*^{8,10–12}. In conscious rats, a permanent chemical lesion of A6 neurons significantly reduced the CO₂-induced ventilatory response¹³.

A6 neurons also respond to activation of peripheral chemoreceptors using hypoxia^{9,14}. However, a permanent chemical lesion of A6 neurons did not affect the ventilatory response to systemic hypoxia in conscious rats¹⁵, suggesting that such neurons play no major role in the respiratory responses evoked by activation of peripheral chemoreceptors. However, experimentally determining a causal role for A6 neurons in promoting and maintaining chemosensory control of breathing has remained elusive using traditional chemical ablation approaches, since a permanent loss of neuronal populations may be compensated for by other parts of the neuronal circuitry.

Breathing at rest is characterized by three phases: inspiration, post-inspiration and passive expiration¹⁶. The pre-Bötzinger Complex (pre-BötC) is responsible for generating inspiratory rhythm¹⁶. The neural mechanisms underlying post-inspiration are attributed to a distributed network involving lung mechanoreceptors, pontine circuits and a medullary conditional oscillator so-called “post-inspiratory complex”^{17–19}. Under conditions of high chemical drive (activation of central and/or peripheral chemoreceptors), abdominal (Abd) motor activity is recruited at the end of expiration (active expiration)^{20–22}. This is a mechanism to contract Abd muscles phasically to force exhalation, which assists in reducing expiratory time to promote enhanced pulmonary ventilation ($\dot{V}_E$)²³. Active expiration depends on a conditional active expiratory oscillator within the ventral medullary parafacial Respiratory Group (pFRG)^{20–22,24}. High chemical drive also produces differing degrees of both alertness and

¹School of Medicine of Ribeirão Preto, Department of Physiology, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.²School of Physiology, Pharmacology and Neuroscience, Biomedical Sciences, University of Bristol, Bristol, UK.³Cardiovascular Autonomic Research Cluster, Department of Physiology, Faculty of Medical and Health Sciences, University of Auckland, Auckland, New Zealand. Karolyne S. Magalhães and Pedro F. Spiller contributed equally. Correspondence and requests for materials should be addressed to D.J.A.M. (email: davimoraes@fmrp.usp.br)

Figure 1. Selective and functional expression of AlstR in rat A6 neurons. Fifteen days after LC injection of PRSx8-AlstR-GFP-LVV, there is robust selective expression in noradrenergic neuronal somata and processes. GFP expression (green), TH immunoreactivity (red), and overlaid images (right). 4thV: fourth ventricle. Scale bar: 50 μ m. (B) One neuron juxtacellularly labelled *in vivo* with biocytin, exhibiting GFP and TH immunofluorescence (noradrenergic LC neuron). Scale bar: 20 μ m. (C) Instantaneous firing frequency (bin width 10 ms) extracellularly recorded from the same labelled A6 neuron during baseline condition and in response to activation of peripheral chemoreceptors using KCN. This neuron also increased its firing frequency to 7% CO₂. Intracerebroventricular application of Alst rapidly and reversibly abolished its firing frequency.

arousal²⁵, which is highly associated with A6 neuronal activation⁵. It has been proposed that the pons modulates central generation of Abd active expiration under high chemical drive²⁰. A6 neurons project to the ventral medulla²⁶, which we propose to modulate the activity of expiratory neurons located in the pFRG or even those determining the activity of spinal Abd motoneurons in the caudal Ventral Respiratory Group (cVRG). Given their role in mediating arousal⁷, we hypothesise that A6 neurons are a part of a vigilance centre (LC) for controlling breathing under high chemical drive and that this will include recruitment of both active inspiration and expiration in readiness for flight or fight.

The development of pharmacogenetic tools provides a neuronal phenotype specific way to acutely and reversibly inhibit the activity of selected neuronal populations²⁷. Therefore, to determine the role of the LC-noradrenaline (NA) system for both resting, inspiratory and the expiratory (active expiration) responses to activation of central and peripheral chemoreceptors in conscious adult rats, we studied the effects of inhibiting A6 neurons using the insect peptide allatostatin (Alst) following their transduction with a lentiviral construct to express the G-protein-coupled *Drosophila* allatostatin receptor (AlstR). Activation of AlstR produces a strong sustained neuronal hyperpolarisation via the opening of inwardly rectifying K⁺ channels^{28,29}, rendering them inactive.

Results

A6 transduction efficacy. Noradrenergic brainstem neurons express the transcriptional factor Phox2 and can be targeted using lentiviral vectors (LVV) to express gene of interest under the control of an artificial promoter - PRSx8^{30,31}. Direct bilateral stereotaxic injection of PRSx8-AlstR-GFP-LVV into the LC produced selective expression of the fluorophore-AlstR construct within immunocytochemically characterized LC neurons (Fig. 1A). These transduced neurons showed characteristic membrane-delimited fluorescence with strong signal from the dendrites and axonal processes, as expected of the receptor-fluorophore construct. The expression was limited to neurons that were identified as noradrenergic (A6 neurons) on the basis of their tyrosine hydroxylase

Single A6 Unit Recording. The effect of AlstR activation on spontaneous electrical activity of A6 neurons was tested in PRSx8-AlstR-GFP-LVV anaesthetised rats (Fig. 1B,C). A6 neurons, expressing GFP, had a mean firing frequency of 3.22 ± 0.41 Hz ($n=4$), which was similar to that observed in previous studies^{32,33}. Acute activation of peripheral (intravenous injection of potassium cyanide - KCN; $p < 0.0001$) or central chemoreceptors (7% CO₂; $p = 0.003$) significantly augmented their basal firing frequency (26.76 ± 2.57 and 8.8 ± 0.81 Hz, respectively). These neurons were then recorded during application of Alst into the lateral ventricle, which reversibly abolished their firing frequency within ~ 1 min of delivery in every cell tested (Fig. 1C).

Respiratory responses to Alst-induced inhibition of A6 neurons. *Spontaneous breathing.* We next investigated whether acute inhibition of A6 neurons would generate changes in inspiratory and expiratory activities, as well as in ventilatory parameters of conscious rats under baseline conditions (room air exposure; $n = 20$). Figure 2A shows representative raw and integrated records of electromyogram (EMG) from diaphragm (Dia_{EMG}) and Abd_{EMG} muscles, barometric respiratory movements, as well as respiratory frequency (fR), tidal volume (V_T) and $\dot{V}_E$ data from one rat in which the LC was transduced with PRSx8-AlstR-GFP-LV. Active expiration was never observed during baseline conditions, i.e. no rhythmic expiratory Abd_{EMG} activity was present. On the other hand, every two to three minutes we observed a sigh (a high-amplitude inspiratory breath; red lines of Fig. 2A) in Dia_{EMG} activity and in barometric respiratory movement. The grouped data show that acute inhibition of A6 neurons using Alst application into the lateral ventricle did not affect Dia_{EMG} amplitude (10.21 ± 0.72 vs $10.23 \pm 0.76 \mu\text{V}$), Abd_{EMG} expiratory activity (2.02 ± 0.35 vs $2 \pm 0.38 \mu\text{V}$), ventilatory parameters ($[\text{fR}: 94.33 \pm 4.37$ vs $93.12 \pm 4.3 \text{ cpm}]$ (V_T : 5.53 ± 0.74 vs $5.41 \pm 0.59 \text{ ml/Kg}$) ($\dot{V}_E$: 519.6 ± 73.67 vs $504.3 \pm 61.9 \text{ ml/Kg/min}$) or sigh-

Figure 3. Acute inhibition of A6 neurons and effect on the inspiratory and expiratory responses to activation of peripheral chemoreceptors of conscious adult rats. (A) Raw and integrated ($\int$) records of Dia_{EMG} and Abd_{EMG} activities from one representative rat in which the LC was transduced with PRSx8-AlstR-GFP-LVV. The inspiratory and expiratory responses to peripheral chemoreceptor activation using KCN, before and after Alst application into lateral ventricle, are shown. Magnification of baseline and reflex inspiratory and expiratory responses from the same rat before (Bi) and after (Bii) Alst application. Note the absence of changes in the peripheral chemoreflex-induced inspiratory and expiratory responses after acute inhibition of A6 neurons. Summary of data showing the changes in the reflex responses of fR (C), Dia_{EMG} amplitude (D) and Abd_{EMG} (E) after application of Alst.

ing (30.97 ± 4.48 vs 30.86 ± 4.48 sighs/hour) of rats exposed to room air (Fig. 2A–E). Thus, A6 neurons are not involved in control of baseline breathing in adult conscious rats.

Hypoxic stimulation of peripheral chemoreceptors. In order to investigate whether A6 neurons affect breathing under conditions of high chemical drive, we first activated the peripheral chemoreceptors using intravenous injection of KCN to mimic cytotoxic hypoxia ($n = 6$). Figure 3A shows the peripheral chemoreflex-induced inspiratory and expiratory responses from one rat transduced with PRSx8-AlstR-GFP-LVV into LC. Acute activation of peripheral chemoreceptors increased fR and Dia_{EMG} amplitude, as well as evoked active expiration in Abd_{EMG} (Fig. 3A–Bi). Following inhibition of A6 neurons these responses remained unchanged [(inspiratory = ΔfR : 99.25 ± 5.24 vs 98.54 ± 6.16 cpm; ΔDia_{EMG} amplitude: 136.4 ± 9.76 vs $140.8 \pm 9.81\%$) (expiratory = ΔAbd_{EMG} : 402.2 ± 10 vs $401.5 \pm 9.6\%$); Fig. 3B–E]. However, the sighing rate (red lines of Fig. 4A) was reduced to 7.85 ± 1.06 from 15.57 ± 1.51 ($p < 0.0001$) during 20 min of systemic hypoxic hypoxia (7% O_2 ; $n = 7$), but sigh amplitude was unchanged (15.18 ± 2.08 vs 15.37 ± 1.44 ml/Kg; Figs 4A and 5A,B). Systemic hypoxic hypoxia also increased fR, Dia_{EMG} amplitude, V_T and $\dot{V}_E$, but did not evoke active expiration (data not shown). Alst application did not modify these peripheral chemoreceptor-evoked reflex responses [at 20 minutes; (fR: 153.89 ± 4.11 vs 155.34 ± 4.23 cpm) (Dia_{EMG} amplitude: 147.4 ± 7.4 vs $142.9 \pm 7.59\%$) (V_T : 9.41 ± 0.54 vs 9.33 ± 0.77 ml/Kg) ($\dot{V}_E$: 1428.49 ± 50.89 vs 1400.1 ± 51.24 ml/Kg/min); Figs 4A,B and 5C–F]. Thus, A6 neurons are involved in hypoxia-induced sighing, but not in other to systemic hypoxic hypoxia-evoked respiratory responses in conscious adult rats. Alst produced no effect on sighing rate (15.5 ± 2.08 vs 14.75 ± 3.8 ; $n = 4$) in rats transduced with PRSx8-GFP-LVV (control virus) during systemic hypoxic hypoxia.

Figure 4. Acute inhibition of A6 neurons and effect on the inspiratory and ventilatory responses to systemic hypoxic hypoxia of conscious adult rats. (A) Raw and integrated (I) records of Dia_{EMG} activity from a rat in which the I.C. was transduced with PRSx8-AlstR-GFP-LVV, illustrating the changes in inspiration and in the number of sighs (red lines) induced by systemic hypoxic hypoxia (7% O₂) before and after Alst application into lateral ventricle. (B) Magnification of baseline and reflex inspiratory and ventilatory (barometric respiratory movements) responses from the same rat before and after Alst application. Note the absence of changes in the hypoxia-induced inspiratory and ventilatory responses, but the significant reduction in the number of sighs, after acute inhibition of A6 neurons.

Hypercapnic stimulation of central chemoreceptors. Hypercapnia (20 min of 7% CO₂; n = 7) increased Dia_{EMG} amplitude, the number of sighs, fR (by reducing DI and DE), V_T, $\dot{V}_E$ and evoked active expiration in Abd_{EMG} of PRSx8-AlstR-GFP-LVV transduced rats, in which carotid peripheral chemoreceptors had been denervated (Figs 6A,B and 7A–H). Active expiration was prevalent as noted by the high values of expiratory Abd_{EMG} incidence (Fig. 7H) in response to activation of central chemoreceptors. Alst application reduced the central chemoreceptors-induced responses of fR (at 20 minutes: 122.56 ± 2.31 vs 141.67 ± 2.78 cpm; $p < 0.0001$), V_T (at 20 minutes: 7.18 ± 0.39 vs 8.67 ± 0.53 ml/Kg; $p < 0.0001$), $\dot{V}_E$ (at 20 minutes: 856.79 ± 43.79 vs 1210.68 ± 53.56 ml/Kg/min; $p < 0.0001$) and Dia_{EMG} amplitude (at 20 minutes: 83.42 ± 9.3 vs $120.6 \pm 3.73\%$; $p < 0.0001$), but did not change either the number of sighs (15.86 ± 1.21 vs 16.43 ± 1.13) or their amplitude (16.05 ± 1.64 vs 15.45 ± 2.11 ml/Kg; Figs 6A,B and 7A–F). Alst also reduced both the incidence (0.52 ± 0.09 vs 0.81 ± 0.05 ; $p < 0.0001$) and magnitude of Abd_{EMG} active expiration (375.3 ± 13.64 vs $427.8 \pm 14.76\%$; $p < 0.0001$; Figs 6A,B and 7C,H). On the other hand, Alst application increased duration of expiration (DE; at 20 minutes: 0.30 ± 0.02 vs 0.26 ± 0.03 ; $p = 0.01$) and duration of inspiration (DI; at 20 minutes: 0.20 ± 0.01 vs 0.18 ± 0.02 ; $p = 0.03$; Fig. 6A,B). Alst produced no effect on fR (at 20 minutes: 142.5 ± 3.33 vs 146.44 ± 3.59 cpm), V_T (at 20 minutes: 8.89 ± 0.77 vs 8.19 ± 0.86 ml/Kg), $\dot{V}_E$ (at 20 minutes: 1200.56 ± 67.55 vs 1248.44 ± 59.44 ml/Kg/min) or Abd_{EMG} active expiration magnitude (419.1 ± 15.44 vs $437.55 \pm 22.44\%$) in rats transduced with PRSx8-GFP-LVV (n = 4) during hypercapnia.

To determine the contribution of the reduction in active expiration after acute inhibition of A6 neurons on $\dot{V}_E$, we evaluated the ventilatory parameters at different times after Alst application during hypercapnia in carotid body denervated rats, i.e. in the presence (red arrow - Fig. 6B) and absence (green arrow - Fig. 6B) of Abd_{EMG} active expiration. Alst application reduced fR, V_T and $\dot{V}_E$, but increased DI and DE, regardless of whether Abd_{EMG} active expiration was present. However, reductions in fR, V_T and $\dot{V}_E$, and the increase in DE, were greater in the absence of active expiration than during its presence [(fR: -12.79 ± 3.21 vs $-9.48 \pm 1.32\%$; $p = 0.02$) (DE: 11.25 ± 2.39 vs $8.2 \pm 2.11\%$; $p = 0.02$) (V_T: -15.34 ± 3.61 vs $-10.54 \pm 2.34\%$; $p = 0.01$) ($\dot{V}_E$: -26.39 ± 4.11 vs $-18.67 \pm 3.99\%$; $p = 0.003$), suggesting that the reduction in $\dot{V}_E$ is due to reductions in both active inspiratory and expiration responses.

Figure 5. Acute inhibition of A6 neurons and effect on the respiratory responses to systemic hypoxic hypoxia of conscious adult rats. Summary of data showing the changes in the responses of the number of sighs (A), sigh amplitude (B), fR (C), V_T (D), $\dot{V}_E$ (E) and Δ Dia_{EMG} amplitude (F) to systemic hypoxic hypoxia after application of Alst in rats in which the LC was transduced with PRSx8-AlstR-GFP-LVV.

Discussion

This report reveals a novel and essential functional role of A6 neurons in the chemosensory control of inspiration and expiration in adult conscious rats. In the absence of peripheral chemoreceptors, inhibition of A6 neurons reduced the magnitude and incidence of both the CO₂-evoked Abd_{EMG} active expiration and Dia_{EMG} inspiratory activity (frequency and amplitude). These changes in both inspiratory and expiratory activities were responsible for the observed reduction in $\dot{V}_E$ during hypercapnia when A6 neuronal activity was pharmacologically inhibited. However, inhibition of A6 neurons had no effect on resting or peripheral chemoreflex-evoked respiratory activities and $\dot{V}_E$, although the number of sighs evoked by systemic hypoxic hypoxia was reduced. Together, these data indicate that A6 neurons are a part of a vigilance centre for controlling breathing under high chemical drive and that this includes a CO₂-dependent augmentation of inspiratory and active expiratory drive and hypoxia-evoked sighing.

Rapid inhibitory and reversible effects of Alst were reported previously to be selective for AlstR-transduced neuron^{28,29}. In the present study, we confirmed effective silencing of AlstR-expressing A6 neurons by Alst during single unit extracellular recording in anaesthetised rats. Thus, the physiological data on perturbations of respiratory pattern reported herein, together with our cellular-level electrophysiological evidence provided, suggest that Alst application effectively inhibits a significant proportion of transduced A6 neurons *in vivo*.

The present study also demonstrated that inspiratory and expiratory activities, and $\dot{V}_E$ were unaffected by Alst under eupnoeic breathing, suggesting that A6 neurons play no role in the control of breathing in conscious rats at rest while breathing room air. Similar results regarding ventilatory parameters have been demonstrated in previous studies using permanent chemical lesions of A6 neurons in rats^{13,15}. Likewise, acute silencing of these neurons

Figure 6. Acute inhibition of A6 neurons and effect on the inspiratory, active expiratory and ventilatory responses to stimulation of central chemoreceptors in conscious adult rats. **(A)** Raw and integrated (*I*) records of Dia_{EMG} and Abd_{EMG} activities from one animal in which the LC was transduced with PRSx8-AlstR-GFP-LVV. Note the changes in inspiration, expiration and in the number of sighs (red lines) induced by activation of the central chemoreceptor (7% CO_2), before and after Alst application into lateral ventricle. **(B)** Magnification of baseline and reflex inspiratory, expiratory and ventilatory (barometric respiratory movements) responses from the same rat before and after Alst application. Note that Alst application reduced significantly the fR, Dia_{EMG} amplitude, the Abd_{EMG} active expiration incidence (green arrow: absence of active expiration; red arrow: active expiration) and magnitude, as well as the ventilatory parameters.

did not affect the respiratory responses to activation of peripheral chemoreceptors using either cytotoxic or hypoxic hypoxia. Although previous studies indicate that A6 neurons: (i) receive excitatory synaptic drive from the central respiratory network, (ii) are responsive to activation of peripheral chemoreceptors and (iii) are intrinsically sensitive to low levels of O_2 ^{10,14,34,35}, the present study ruled out a possible contribution of these neurons for the inspiratory and expiratory responses to activation of carotid body chemoreceptors. We propose that A6 neurons are involved in both the behavioural arousal and respiratory-modulated response of the sympathetic outflow to hypoxia, since these neurons are excited, along with sympathetic outflow, during peripheral chemoreceptor stimulation, and exhibit a pronounced respiratory pattern under conditions of strong entrainment of the sympathetic vasomotor outflow by the central respiratory network¹⁴.

Sighing during normal breathing has been hypothesised to prevent lung atelectasis, maintaining lung compliance and improving alveolar oxygenation³⁶. Sighing increases in response to hypoxia and hypercapnia^{37,38}. The data of the present study demonstrate the crucial role of A6 neurons for driving sighs induced by systemic hypoxic hypoxia, but not during hypercapnia or eupnoeic breathing. Recent studies have shown that sighing is controlled by two bombesin-like neuropeptide pathways, neuromedin B and gastrin-releasing peptide, expressed in the pFRG neurons, which mediate signalling with the pre-BötC³⁸. A6 neurons receive a dense network of

Figure 7. Acute inhibition of A6 neurons and effect on respiratory responses to activation of central chemoreceptors of conscious adult rats. Summary of data showing the changes in the reflex responses of the fR (A), V_T (B), V_E (C), ΔDia_{EMG} amplitude (D), number of sighs (E), sigh amplitude (F), active expiration magnitude (G) and active expiration incidence (H; number 1 means that Abd_{EMG} active expiration is at its maximal value established in each animal during hypercapnia – see Methods) after application of Alst in conscious adult rats in which the LC was transduced with PRSx8-AlstR-GFP-LVV. *p < 0.0001.

immunoreactive fibres expressing bombesin-like neuropeptides³⁹. Therefore, it is reasonable to suggest that A6 neurons might be activated by bombesin-like neuropeptides from pFRG during hypoxia to increase the frequency of sighing (Fig. 8A). A6 neurons may also be activated by other sigh-promoting regions responsive to hypoxia,

Figure 8. Schematic depicting proposed neural mechanisms by which A6 neurons regulate inspiratory and expiratory responses to high chemical drive. Parasagittal views of the brainstem showing the location of the medullary ventral respiratory group and C1 catecholaminergic region, as well as the pontine LC A6 neurons (red) and Facial Motor Nucleus (VII). The respiratory rhythmogenic sites of the pre-Bötzinger Complex (pre-BötC, inspiratory neurons) and parafacial Respiratory Group (pFRG, for active expiration and sigh), as well as the expiratory Bötzinger Complex (BötC), rostral Ventral Respiratory Group (rVRG; containing inspiratory bulbo-spinal premotor neurons) and caudal Ventral Respiratory Group (cVRG; containing expiratory bulbo-spinal premotor neurons) are also shown. (A) Sigh response during systemic hypoxia: A6 neurons might be directly activated by systemic hypoxia ($\downarrow O_2$)^{34,35} or by sigh-promoting bombesin-like pFRG³⁸ and C1 catecholaminergic neurons⁴⁰ to increase the frequency of sighing through adrenergic receptor activation of pre-BötC⁴². (B) Active inspiratory and expiratory responses during hypercapnia: A6 neurons, activated by CO_2 ⁷ or C1 catecholaminergic neurons⁵⁹, enhance inspiration and V_E through adrenergic receptor activation of pre-BötC^{52,53}. A6 neurons might also provide either tonic⁹ or expiratory-related¹⁴ excitatory input to the conditional expiratory oscillator located in the pFRG or directly to the cVRG, for onward relay to expiratory spinal motoneurons, enhancing active expiration.

such as the ventral medullary C1 catecholaminergic neurons⁴⁰ (Fig. 8A). This is a group of neurons with dual catecholaminergic/glutamatergic phenotype⁴¹ that modulate the activity of inspiratory pre-BötC neurons during hypoxia by local release of NA. Adrenergic receptor activation of the pre-BötC induces sighs by increasing the frequency of intrinsically bursting pacemaker neurons that rely on a persistent sodium current⁴². The sigh-specific effect of A6 neurons is unique, since no A6 mediated effects were observed on eupnoeic inspiratory activity and $\dot{V}_E$ or for the inspiratory responses to either cytotoxic or systemic hypoxic hypoxia. This is clinically relevant since sighs play a critical role in the sequence of events that lead to arousal^{25,43}. The majority of arousals during high chemical drive, or even during natural sleep, occur as a stereotypic sequence that begins with a sigh, followed by a startle and subsequent cortical arousal^{44–46}; the latter being a well-known function of A6 neurons⁵. Thus, a failure to generate sighs during the hypoxic condition may contribute to the events that lead to Sudden Infant Death Syndrome (SIDS)^{47,48}. This hypothesis is supported by finding that sighs and arousals are disturbed in SIDS patients⁴⁹. On the other hand, inhibition of A6 neurons did not affect sighs induced by hypercapnia, suggesting the existence of at least two separate neural circuits controlling sighing. Whether the activation of other catecholaminergic neurons (e.g. C1 or A5 neurons) mediates the hypercapnic sigh response remains an open question.

It is well established that LC participates in central chemoreception to $CO_2/[H^+]$ ⁷. Hypercapnia/acidosis increases the firing frequency of these neurons both *in vivo* as well as in *in vitro* preparations of adult rats^{8,9}. Previous studies have employed subtractive methods to study the role of the A6 neurons in CO_2 regulation of breathing. These methods using toxins to inhibit the noradrenergic system showed different magnitudes of inhibition of central chemoreception^{13,50,51}. This may, in part, be ascribed to the long-term adaptation to the loss of a population of neurons. Our findings clearly show a crucial involvement of A6 neurons in the control of inspiration (fR and Di_{EMG} amplitude) and in the generation of Abd_{EMG} active expiration (its magnitude and incidence)

during stimulation of central chemoreceptors. A6 neurons project to the pre-BötC and regulate breathing^{52,53}. It is possible that hypercapnia evokes A6 neurons to activate α_1 -adrenoceptors in pre-BötC⁵⁴, thereby enhancing inspiration and $\dot{V}_E$ (Fig. 8B). Several observations also suggest that this metabolic challenge could activate the A6 via C1 neurons (Fig. 8B). The C1 neurons densely innervate the LC^{55,56}, C1 and A6 neurons respond to CO₂⁵⁷ and optogenetic stimulation of the C1 activates A6 neurons^{58,59}. Hypercapnia also produce differing degrees of alertness and arousal²⁵ and increased alertness is highly associated with A6 and C1 neuronal activation^{5,40}. Therefore, excitatory activation transmitted from C1 to A6 neurons under hypercapnia is not hard to rationalize and this neural pathway could facilitate arousal and therefore contribute to the airway defensive responses to hypercapnia^{25,45}; an issue that requires further study.

Our study uncovers for the first time that A6 neurons play a major role in central generation of Abd_{EMG} active expiration to enhance $\dot{V}_E$ during hypercapnia. We observed that reductions in active expiration incidence led to decreases in $\dot{V}_E$. These data agree with the proposal that active expiration enhances $\dot{V}_E$ by increases in both V_T (recruiting expiratory reserve volume) and fR, but decreases in DE and total time of the respiratory cycle²³. Active expiration may be state-dependent being more predominant in sleep than in wakefulness during hypercapnia⁶⁰. Although their inhibition does not affect the duration of sleep, A6 neurons are necessary for long-term wakefulness and arousal⁵. Therefore, we propose that A6 neurons' role in generation of active expiration is in part important for maintaining vigilance whether this is to expiratory hypercapnic responses or a threatening environment. Some evidence suggest that the posture and proprioceptive inputs from the abdominal wall may also affect active expiration^{61,62}. Considering that the LC presents specialized subgroups of noradrenergic neurons, projecting to prefrontal cortex, that are involved in the anxiogenic behaviours^{32,33} and that inhalation of CO₂-enriched air can produce anxiety and fear-like behaviours⁶³, we cannot rule out that changes in the behavioural responses to hypercapnia, after acute A6 inhibition, may contribute to the reductions in both active expiration magnitude and incidence through postural changes and even by Abd proprioceptive components.

Chemoreceptors sensitive to CO₂/[H⁺] and identified in the LC *in vivo* are either tonically active over a wide range of arterial CO₂ levels⁹ or show different patterns of respiratory modulation in their discharge, including expiratory modulation¹⁴. Thus, A6 expiratory-modulated neurons may mediate the CO₂-evoked activity recorded from Abd_{EMG}. Alternatively, when arterial CO₂ increases, A6 neurons might provide tonic excitatory input to the conditional expiratory oscillator located in the pFRG or directly to the cVRG of the medulla for onward relay to expiratory spinal Abd motoneurons (Fig. 8B); this remains to be determined. There is a dense catecholaminergic innervation in the pFRG partially overlapping, adjacent and more medial chemosensitive region (Retrotrapezoid Nucleus- RTN)⁶⁴. Despite the recent data showing that NA in the RTN does not contribute to the respiratory response evoked by activation of central chemoreceptors in anaesthetised rats⁶⁵, additional experiments are needed to evaluate the role of adrenergic receptors in the pFRG for hypercapnia-evoked active expiration in conscious rats. NA may affect membrane potential subthreshold oscillations of the presumable intrinsic bursting pFRG expiratory neurons⁶⁶ during hypercapnia, thereby regulating both the incidence and magnitude of Abd_{EMG} activity. Therefore, new electrophysiological experiments are needed to evaluate the synaptic mechanisms and the role of neuromodulators^{67,68} determining the excitability of pFRG expiratory neurons during hypercapnia.

In conclusion, the present study in conscious adult rats reveals a powerful modulatory role of A6 neurons in the CO₂-evoked increases in active expiration, the inspiratory motor output and $\dot{V}_E$, as well as hypoxia-evoked sighing. The present study prompts interesting questions as to whether A6 neurons have anatomical and cellular specialisation acting on different regions of the CNS for the control of sighing, inspiration and active expiration that are independently selected and regulated by hypoxia and hypercapnia, and whether these specialized subgroups of noradrenergic neurons share their involvement with other behavioural functions (e.g. arousal and anxiety).

Methods

Animals. The experiments were performed on male Wistar rats provided by the Animal Care Facility at the Ribeirão Preto campus of the University of São Paulo, Brazil. All experimental protocols were approved by the Institutional Ethics Committee for Animal Experimentation at the School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (protocols #093/2009 and #122/2016). All methods were carried out in accordance with The Principles of Laboratory Animal Care (NIH publication no. 85Y23, revised 1996). Animals were housed with a 12 h light/dark cycle at a constant temperature (22 ± 1 °C) with *ad libitum* access to standard rat chow and water.

Viral vectors. The LVV system used here was HIV-1-derived and pseudo-typed with the VSV-G envelope²⁹. The plasmids pTYF-PRsX8-AlstR-IRES2-GFP and pTYF-PRsX8-IRES2-GFP were cloned into the LVV. Titres of PRsX8-AlstR-GFP-LVV and the control virus (PRsX8-GFP-LVV) were between 1 × 10⁹ and 1 × 10¹⁰ pfu. Viral concentration and titration were performed as described in detail previously⁶⁹.

In vivo gene transfer. Male rats (225–250 g) were anaesthetised with a ketamine (75 mg kg⁻¹ i.p.)/xylazine (5 mg kg⁻¹ i.p.) mixture. The depth of anaesthesia was checked at regular intervals (15–20 min) by assessing the withdrawal reflex response to noxious pinching of the tail or hind paw. Animals were placed in a stereotaxic frame (David Kopf, Tujunga, USA) and four microinjections (each 250 µm apart in the dorsoventral axis) per side of PRsX8-AlstR-GFP-LVV (250 nL each, over 2 min) were delivered into LC bilaterally (Picospritzer II; Parker Instruments, Cleveland, USA). The microinjections were made 2 mm caudal to bregma, ±1.2 mm lateral from the midline and 5.5–6.0 mm below the brain surface with a 10° rostral angulation. A stainless-steel guide cannula (13 mm long, 0.6 mm o.d., 0.4 mm i.d.) was implanted into the lateral cerebral ventricle (−0.6 mm to Bregma, 1.5 mm lateral to the midline and −3.6 mm ventral to dura mater). The guide cannula was fixed to the cranium using dental acrylic resin. Post-surgery, rats were treated with one prophylactic dose of analgesic and antipyretic

flunixinmeglumine (1 mg/kg; Schering-Plough, Rio de Janeiro, Brazil) and 0.1 ml of veterinary antibiotic (1.2 million i.u.; Fort Dodge, Campinas, Brazil) via intramuscular injections.

In vivo experiments. *Anaesthetised studies.* Experiments in anaesthetised PRSx8-AlstR-GFP-LVV rats were performed to evaluate the single cellular response of A6 neurons to activation of AlstR fifteen days after the LVV injections. General anaesthesia was induced with 5% halothane (AstraZeneca do Brasil Ltda, Cotia, Brazil) in 100% O₂. A tracheostomy was performed and the halothane concentration was reduced to a level of 1.4–1.5%, which was sufficient to abolish the corneal reflex and the retraction of distal phalanges to strong nociceptive stimulation of the hindpaw until the end of surgery. A polyethylene catheter (PE-10 connected to PE-50; Clay Adams, Parsippany, USA) was inserted into the femoral vein for systemic administration of fluids and drug. Rats were placed onto a stereotaxic apparatus (David Kopf) on a heating pad (ALB 200 RA; Bonther, Ribeirão Preto, Brazil) and core body temperature was monitored and maintained at a minimum of 37 °C via a thermocouple (MLT1403; Harvard Apparatus, Holliston, USA). All rats were ventilated (Small animal ventilator 683; Harvard Apparatus) with 100% O₂ throughout the experiment. End tidal-CO₂ was monitored throughout the experiment with a capnometer (Columbus Instruments, Ohio, USA). The discharges of neurons in the LC were recorded extracellularly (Duo 773 Electrometer; World Precision Instruments, Sarasota, USA) using glass electrodes (30–50 MΩ) filled with 1.5% biocytin (Molecular Probes, Grand Island, USA) in 0.5 M sodium acetate. Effects produced by: (i) activation of peripheral chemoreceptors using an intravenous injection of KCN (50 μl; 40 μg/Kg; Merck, Darmstadt, Germany), (ii) activation of central chemoreceptors stepping end-expiratory CO₂ from 5% to 7% and (iii) activation of AlstR on the discharge of LC neurons were evaluated. Alst (2 mM, 10 μl; Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Burlingame, USA) was administered intracerebroventricularly [(25 μl syringe; Hamilton Company, Reno, USA) (needle 33-gauge; Small Parts, Miami Lakes, USA)]. The correct placement of the guide cannula was confirmed at the end of the experiment by injection of Evans Blue (2% in 10 μl; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and its visible presence in the intracerebroventricular system. After electrophysiological experiments, LC neurons were filled with biocytin using the previously described juxtacellular labelling method (200 ms pulses of 1.0–4.0 nA at 2.5 Hz for 1–3 min)⁷⁰. All signals were acquired by a data acquisition system (5 KHz; CED 1401; Cambridge Electronic Design, UK) controlled by a computer running Spike 2 software (Cambridge Electronic Design).

Conscious studies. EMG of respiratory muscles was used to evaluate inspiratory and expiratory indexes in conscious rats⁷¹. Ten days after the microinjections, PRSx8-AlstR-GFP-LVV rats were re-anaesthetised (ketamine/xylazine mixture; i.p.). The depth of anaesthesia was also checked at regular intervals by assessing the withdrawal reflex response to noxious pinching of the tail or hind paw. Bipolar teflon-coated stainless steel EMG electrodes were implanted in the Dia and Abd oblique muscles, a temperature datalogger (SubCue, Calgary, Canada) was implanted within the abdominal cavity for body temperature (Tb) measurements and a polyethylene catheter was inserted into the femoral vein for systemic administration of drug. Wires were attached to an electrical socket, tunnelled under the skin and positioned on the back of the rat's neck together with the distal end of the catheter. In the experiments involving activation of central chemoreceptors, the carotid artery bifurcations were exposed, carotid sinus nerves and all its branches sectioned⁷². The completeness of carotid body denervation was assessed on the day of the study by the absence of Dia_{EMG} and Abd_{EMG} responses to peripheral chemoreceptor stimulation using an intravenous injection of KCN. Post-surgery, rats were treated with analgesic, antipyretic and veterinary antibiotic as above. Five days later, the electrical socket of the EMG was connected to an amplifier (1700 amplifier, A-M Systems, Sequim, USA) and animals placed in a cylindrical plethysmograph chamber (5 liters). The chamber was flushed with room air at a flow rate of 1000 ml/min during baseline condition. The gas was then switched to a hypercapnic (7% CO₂, 21% O₂, N₂ balance) or hypoxic (7% O₂, N₂ balance) mixtures for 20 minutes. Gases were mixed with a gas mixer (Pegas 4000, Columbus Instruments, Columbus, USA) using an equivalent flow rate. $\dot{V}_E$, a product of $\dot{V}_T$ and fR, was obtained by using whole body plethysmography⁷³. A volume calibration was performed by injecting a known volume of air (1 ml) inside the chamber. $\dot{V}_T$ was calculated using the formula described by Bartlett & Tenney⁷⁴ and Tb was recorded using the temperature datalogger programmed to acquire every 5 min. Alst was also administered intracerebroventricularly. The EMG (0.3–5 KHz of bandpass) and breathing-related pressure oscillations (MLT141 spirometer, ADInstruments, Bella Vista, Australia) were acquired by a data acquisition system (5 KHz; PowerLab, ADInstruments) controlled by a computer running LabChart software (ADInstruments).

Data analysis. EMGs were recorded in absolute units (μV) and analyses were performed off-line from rectified and integrated ($\int$) signals (time constant: 50 ms). Dia_{EMG} burst activity was assessed as fR. DI and DE were calculated from the $\dot{V}_E$ trace. A sigh was defined as a high-amplitude inspiratory breath in the barometric respiratory movements and in the Dia_{EMG} activity of at least 100% larger in amplitude than the mean amplitude of five breaths preceding each sigh. Sigh frequency was expressed as the number of sighs per hour or per protocol (systemic hypoxia or hypercapnia - 20 minutes) and sigh amplitude was measured as changes in $\dot{V}_T$. Changes in the Dia_{EMG} (amplitude) and Abd_{EMG} activities during baseline conditions (room air exposure) after Alst application were expressed in μV. Based upon absolute values of Dia_{EMG} and Abd_{EMG} (μV), we determined percentage changes in order to compare their activities in each animal during different experimental conditions (systemic hypoxic hypoxia and hypercapnia), before and after Alst applications. Changes in the fR and Dia_{EMG} amplitude (percentage values) in response to acute activation of peripheral chemoreceptors using KCN were assessed by the difference between baseline and the peak of response observed after the stimulus (Δ fR and Δ Dia_{EMG} amplitude). The Abd_{EMG} expiratory responses to acute peripheral chemoreflex activation was assessed by the measurement of the area under the curve, in a time window of ≤ 20 s after the stimulus, and expressed as percentage values (Δ Abd_{EMG} in percentage) in relation to EMG activity before the stimulus. Active expiration was defined by the presence of Abd_{EMG} expiratory activity, i.e. rhythmic burst of activity (between inspiratory Dia_{EMG} activities) above tonic

levels. Event detection and the measurement of the amplitude of Abd_{EMG} active expiration was performed on LabChart software. This allowed an assessment of the incidence of active expiration. All data were normalized to their largest integrated ($\int$) peak amplitude of Abd_{EMG} expiratory activity obtained. The normalized values were used for comparisons of active expiration incidence during the activation of central chemoreceptors, before and after Alst application across animals (i.e number 1 being Abd_{EMG} active expiration at its maximal value observed in each animal).

Statistical analyses. Results are expressed as mean $\pm$ SD. Data were compared using Student's paired t test or Two-way ANOVA with Bonferroni post hoc test (GraphPad Prism 4, La Jolla, USA) in accordance with the experimental protocol. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Histology and immunocytochemistry. Rats were killed with an overdose of anaesthetics (ketamine/ xylazine mixture; i.p.) and perfused transcardially first with phosphate buffered saline (PBS; 0.1 M) and then with 4% paraformaldehyde (PFA) and brains removed and post fixed in PFA for 2–5 days. Transverse sections (40 μm thick) were cut through the LC with a cryostat (Leica CM1800; Buffalo Grove, USA) and collected into a cryoprotectant solution and stored at -20°C before further processing. The immunofluorescence was performed with free-floating sections. Sections were blocked and permeabilized in PBS containing 10% normal horse serum and 0.5% Triton X-100 for 1 h at room temperature. After three PBS washes, the sections were incubated in primary antibodies against TH (mouse - 1:1000; Millipore, Billerica, USA) and GFP (chicken - 1:1000; AVEs Labs, Tigard, USA) for 24 hrs at 4°C . After three PBS washes, the sections were incubated in secondary antibodies Alexa 405-conjugated streptavidin (1:1000; Molecular Probes), Alexa 647-conjugated donkey anti-mouse (1:500; Molecular Probes) and Alexa 488-conjugated donkey anti-chicken (1:500; Molecular Probes) for 1 h at room temperature. Sections were washed in PBS and mounted in Fluoromount (Sigma-Aldrich). Images were collected on a Leica TCS SP5 confocal microscope equipped with 405, 488 and 633 nm laser lines and tunable emission wavelength detection. For each preparation, biocytin- and GFP-expressing neurons were identified and confocal z stacks collected sequentially for the other channel to detect the TH-expressing neurons and verify colocalization of fluorophores. GFP- and TH-expressing neurons were counted over the entire length of the LC from each rat (-9.16 to -10.32 mm from bregma). Analyses were performed using a computerized image analysis system (Image J) developed at the National Institutes of Health (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

References

- Lindvall, O. & Björklund, A. The organization of the ascending catecholamine neuron systems in the rat brain as revealed by the glyoxylic acid fluorescence method. *Acta Physiol Scand Suppl* **412**, 1–48 (1974).
- Takeuchi, T. *et al.* locus coeruleus and dopaminergic consolidation of everyday memory. *Nature* **537**, 357–362 (2016).
- Martins, A. R. & Froemke, R. C. Coordinated forms of noradrenergic plasticity in the locus coeruleus and primary auditory cortex. *Nat Neurosci* **18**, 1483–1492 (2015).
- Sara, S. J. & Bouret, S. Orienting and reorienting: the locus coeruleus mediates cognition through arousal. *Neuron* **76**, 130–141 (2012).
- Carter, M. E. *et al.* Tuning arousal with optogenetic modulation of locus coeruleus neurons. *Nat Neurosci* **13**, 1526–1533 (2010).
- Putnam, R. W., Filosa, J. A. & Ritucci, N. A. Cellular mechanisms involved in CO(2) and acid signaling in chemosensitive neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**, C1493–1526 (2004).
- Gargaglioni, L. H., Hartzler, L. K. & Putnam, R. W. The locus coeruleus and central chemosensitivity. *Respir Physiol Neurobiol* **173**, 264–273 (2010).
- Pineda, J. & Aghajanian, G. K. Carbon dioxide regulates the tonic activity of locus coeruleus neurons by modulating a proton- and polyamine-sensitive inward rectifier potassium current. *Neuroscience* **77**, 723–743 (1997).
- Elam, M., Yao, T., Thoren, P. & Svensson, T. H. Hypercapnia and hypoxia: chemoreceptor-mediated control of locus coeruleus neurons and splanchnic, sympathetic nerves. *Brain Res* **222**, 373–381 (1981).
- Oyamada, Y., Ballantyne, D., Muckenhoff, K. & Scheid, P. Respiration-modulated membrane potential and chemosensitivity of locus coeruleus neurones in the *in vitro* brainstem-spinal cord of the neonatal rat. *J Physiol* **513**(Pt 2), 381–398 (1998).
- Filosa, J. A., Dean, J. B. & Putnam, R. W. Role of intracellular and extracellular pH in the chemosensitive response of rat locus coeruleus neurones. *J Physiol* **541**, 493–509 (2002).
- Ito, Y. *et al.* Optical mapping of pontine chemosensitive regions of neonatal rat. *Neurosci Lett* **366**, 103–106 (2004).
- Biancardi, V., Bicego, K. C., Almeida, M. C. & Gargaglioni, L. H. locus coeruleus noradrenergic neurons and CO2 drive to breathing. *Pflügers Arch* **455**, 1119–1128 (2008).
- Guyenet, P. G., Koshiya, N., Huangfu, D., Verberne, A. J. & Riley, T. A. Central respiratory control of A5 and A6 pontine noradrenergic neurons. *Am J Physiol* **264**, R1035–1044 (1993).
- Biancardi, V., da Silva, L. T., Bicego, K. C. & Gargaglioni, L. H. Role of locus coeruleus noradrenergic neurons in cardiorespiratory and thermal control during hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol* **170**, 150–156 (2010).
- Richter, D. W. & Smith, J. C. Respiratory rhythm generation *in vivo*. *Physiology (Bethesda)* **29**, 58–71 (2014).
- Poon, C. S. & Song, G. Bidirectional plasticity of pontine pneumotaxic postinspiratory drive: implication for a pontomedullary respiratory central pattern generator. *Prog Brain Res* **209**, 235–254 (2014).
- Dutschmann, M. & Dick, T. E. Pontine mechanisms of respiratory control. *Compr Physiol* **2**, 2443–2469 (2012).
- Anderson, T. M. *et al.* A novel excitatory network for the control of breathing. *Nature* **536**, 76–80 (2016).
- Abdala, A. P., Rybak, I. A., Smith, J. C. & Paton, J. F. Abdominal expiratory activity in the rat brainstem-spinal cord *in situ*: patterns, origins and implications for respiratory rhythm generation. *J Physiol* **587**, 3539–3559 (2009).
- Moraes, D. J., Dias, M. B., Cavalcanti-Kwiatkoski, R., Machado, B. H. & Zoccal, D. B. Contribution of the retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory region to the expiratory-sympathetic coupling in response to peripheral chemoreflex in rats. *J Neurophysiol* **108**, 882–890 (2012).
- de Britto, A. A. & Moraes, D. J. Non-chemosensitive parafacial neurons simultaneously regulate active expiration and airway patency under hypercapnia in rats. *J Physiol* **595**, 2043–2064 (2017).
- Jenkin, S. E. & Milsom, W. K. Expiration: breathing's other face. *Prog Brain Res* **212**, 131–147 (2014).
- Pagliardini, S. *et al.* Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult anesthetized rats. *J Neurosci* **31**, 2895–2905 (2011).
- Wulbrand, H., McNamara, F. & Thach, B. T. The role of arousal related brainstem reflexes in causing recovery from upper airway occlusion in infants. *Sleep* **31**, 833–840 (2008).

26. Van Bockstaele, E. J., Pieribone, V. A. & Aston-Jones, G. Diverse afferents converge on the nucleus paragigantocellularis in the rat ventrolateral medulla: retrograde and anterograde tracing studies. *J Comp Neurol* **290**, 561–584 (1989).
27. Callaway, E. M. A molecular and genetic arsenal for systems neuroscience. *Trends Neurosci* **28**, 196–201 (2005).
28. Lechner, H. A., Lein, E. S. & Callaway, E. M. A genetic method for selective and quickly reversible silencing of Mammalian neurons. *J Neurosci* **22**, 5287–5290 (2002).
29. Moraes, D. J. A., Bonagamba, L. G. H., da Silva, M. P., Paton, J. F. R. & Machado, B. H. Role of ventral medullary catecholaminergic neurons for respiratory modulation of sympathetic outflow in rats. *Sci Rep* **7**, 16883 (2017).
30. Duale, H. *et al.* Restraining influence of A2 neurons in chronic control of arterial pressure in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* **76**, 184–193 (2007).
31. Teschemacher, A. G., Wang, S., Raizada, M. K., Paton, J. F. & Kasparov, S. Area-specific differences in transmitter release in central catecholaminergic neurons of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **52**, 351–358 (2008).
32. Hirschberg, S., Li, Y., Randall, A., Kremer, E. J. & Pickering, A. E. Functional dichotomy in spinal- vs prefrontal-projecting *locus coeruleus* modules splits descending noradrenergic analgesia from ascending aversion and anxiety in rats. *Elife* **6** (2017).
33. Li, Y. *et al.* Retrograde optogenetic characterization of the pontospinal module of the *locus coeruleus* with a canine adenoviral vector. *Brain Res* **1641**, 274–290 (2016).
34. Nieber, K., Sevcik, J. & Illes, P. Hypoxic changes in rat *locus coeruleus* neurons *in vitro*. *J Physiol* **486**(Pt 1), 33–46 (1995).
35. Yang, J. J., Chou, Y. C., Lin, M. T. & Chiu, T. H. Hypoxia-induced differential electrophysiological changes in rat *locus coeruleus* neurons. *Life Sci* **61**, 1763–1773 (1997).
36. Bartlett, D. Jr. Origin and regulation of spontaneous deep breaths. *Respir Physiol* **12**, 230–238 (1971).
37. Zhang, Z., Xu, F., Zhang, C. & Liang, X. Activation of opioid micro-receptors in medullary raphe depresses sighs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **296**, R1528–1537 (2009).
38. Li, P. *et al.* The peptidergic control circuit for sighing. *Nature* **530**, 293–297 (2016).
39. Marcos, P. *et al.* Distribution of gastrin-releasing peptide/bombesin-like immunoreactive cell bodies and fibres in the brainstem of the cat. *Neuropeptides* **26**, 93–101 (1994).
40. Burke, P. G. *et al.* Optogenetic stimulation of adrenergic C1 neurons causes sleep state-dependent cardiorespiratory stimulation and arousal with sighs in rats. *Am J Respir Crit Care Med* **190**, 1301–1310 (2014).
41. Guyenet, P. G. *et al.* C1 neurons: the body's EMTs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **305**, R187–204 (2013).
42. Viemari, J. C., Garcia, A. J. 3rd, Doi, A., Elsen, G. & Ramirez, J. M. b-Noradrenergic receptor activation specifically modulates the generation of sighs *in vivo* and *in vitro*. *Front Neural Circuits* **7**, 179 (2013).
43. McNamara, E., Wulbrand, H. & Thach, B. T. Characteristics of the infant arousal response. *J Appl Physiol* (1985) **85**, 2314–2321 (1998).
44. McNamara, E., Lijowska, A. S. & Thach, B. T. Spontaneous arousal activity in infants during NREM and REM sleep. *J Physiol* **538**, 263–269 (2002).
45. Lijowska, A. S., Reed, N. W., Chiodini, B. A. & Thach, B. T. Sequential arousal and airway-defensive behavior of infants in asphyxial sleep environments. *J Appl Physiol* (1985) **83**, 219–228 (1997).
46. Thach, B. T. & Lijowska, A. Arousals in infants. *Sleep* **19**, S271–273 (1996).
47. Garcia, A. J. 3rd, Koschnitzky, J. E. & Ramirez, J. M. The physiological determinants of sudden infant death syndrome. *Respir Physiol Neurobiol* **189**, 288–300 (2013).
48. Ramirez, J. M. The integrative role of the sigh in psychology, physiology, pathology, and neurobiology. *Prog Brain Res* **209**, 91–129 (2014).
49. Kahn, A. *et al.* Polysomnographic studies of infants who subsequently died of sudden infant death syndrome. *Pediatrics* **82**, 721–727 (1988).
50. Li, A. & Nattie, E. Catecholamine neurones in rats modulate sleep, breathing, central chemoreception and breathing variability. *J Physiol* **570**, 385–396 (2006).
51. de Carvalho, D. *et al.* Role of neurokinin-1 expressing neurons in the *locus coeruleus* on ventilatory and cardiovascular responses to hypercapnia. *Respir Physiol Neurobiol* **172**, 24–31 (2010).
52. Hilaire, G., Viemari, J. C., Coulon, P., Simonneau, M. & Beventut, M. Modulation of the respiratory rhythm generator by the pontine noradrenergic A5 and A6 groups in rodents. *Respir Physiol Neurobiol* **143**, 187–197 (2004).
53. Viemari, J. C., Garcia, A. J. 3rd, Doi, A. & Ramirez, J. M. Activation of alpha-2 noradrenergic receptors is critical for the generation of fictive eupnea and fictive gasping inspiratory activities in mammals *in vitro*. *Eur J Neurosci* **33**, 2228–2237 (2011).
54. Viemari, J. C. & Ramirez, J. M. Norepinephrine differentially modulates different types of respiratory pacemaker and nonpacemaker neurons. *J Neurophysiol* **95**, 2070–2082 (2006).
55. Pieribone, V. A. & Aston-Jones, G. Adrenergic innervation of the rat nucleus *locus coeruleus* arises predominantly from the C1 adrenergic cell group in the rostral medulla. *Neuroscience* **41**, 525–542 (1991).
56. Card, J. P. *et al.* Efferent projections of rat rostromedullary C1 catecholamine neurons: Implications for the central control of cardiovascular regulation. *J Comp Neurol* **499**, 840–859 (2006).
57. Moreira, T. S., Takakura, A. C., Colombari, E. & Guyenet, P. G. Central chemoreceptors and sympathetic vasomotor outflow. *J Physiol* **577**, 369–386 (2006).
58. Abbott, S. B. *et al.* Selective optogenetic activation of rostral ventrolateral medullary catecholaminergic neurons produces cardiorespiratory stimulation in conscious mice. *J Neurosci* **33**, 3164–3177 (2013).
59. Abbott, S. B. *et al.* C1 neurons excite *locus coeruleus* and A5 noradrenergic neurons along with sympathetic outflow in rats. *J Physiol* **590**, 2897–2915 (2012).
60. Leirao, I. P., Silva, C. A. Jr., Gargaglioni, L. H. & da Silva, G. S. F. Hypercapnia-induced active expiration increases in sleep and enhances ventilation in unanesthetized rats. *J Physiol* (2017).
61. De Troyer, A., Gilmartin, J. J. & Ninane, V. Abdominal muscle use during breathing in unanesthetized dogs. *J Appl Physiol* (1985) **66**, 20–27 (1989).
62. Sherrey, J. H., Pollard, M. J. & Megirian, D. Proprioceptive, chemoreceptive and sleep state modulation of expiratory muscle activity in the rat. *Exp Neurol* **101**, 50–62 (1988).
63. Winter, A., Ahlbrand, R., Naik, D. & Sah, R. Differential behavioral sensitivity to carbon dioxide (CO₂) inhalation in rats. *Neuroscience* **346**, 423–433 (2017).
64. Rosin, D. L., Chang, D. A. & Guyenet, P. G. Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus. *J Comp Neurol* **499**, 64–89 (2006).
65. Oliveira, L. M., Moreira, T. S., Kuo, F. S., Mulkey, D. K. & Takakura, A. C. alpha1- and alpha2-adrenergic receptors in the retrotrapezoid nucleus differentially regulate breathing in anesthetized adult rats. *J Neurophysiol* **116**, 1036–1048 (2016).
66. Molkov, Y. I. *et al.* Late-expiratory activity: emergence and interactions with the respiratory CpG. *J Neurophysiol* **104**, 2713–2729 (2010).
67. Lemes, E. V., Colombari, E. & Zoccal, D. B. Generation of active expiration by serotonergic mechanisms of the ventral medulla of rats. *J Appl Physiol* (1985) **121**, 1135–1144 (2016).
68. Boutin, R. C., Alsaifi, Z. & Pagliardini, S. Cholinergic modulation of the parafacial respiratory group. *J Physiol* **595**, 1377–1392 (2016).

69. Coleman, J. E. *et al.* Efficient large-scale production and concentration of HIV-1-based lentiviral vectors for use *in vivo*. *Physiol Genomics* **12**, 221–228 (2003).
70. Moraes, D. J. *et al.* Respiratory Network Enhances the Sympathoinhibitory Component of Baroreflex of Rats Submitted to Chronic Intermittent Hypoxia. *Hypertension* **68**, 1021–1030 (2016).
71. Moraes, D. J. *et al.* Electrophysiological properties of rostral ventrolateral medulla presympathetic neurons modulated by the respiratory network in rats. *J Neurosci* **33**, 19223–19237 (2013).
72. McBryde, F. D. *et al.* The carotid body as a putative therapeutic target for the treatment of neurogenic hypertension. *Nat Commun* **4**, 2395 (2013).
73. Moraes, D. J., Bonagamba, L. G., Zoccal, D. B. & Machado, B. H. Modulation of respiratory responses to chemoreflex activation by L-glutamate and ATP in the rostral ventrolateral medulla of awake rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **300**, R1476–R1486 (2011).
74. Bartlett, D. Jr. & Tenney, S. M. Control of breathing in experimental anemia. *Respir Physiol* **10**, 384–395 (1970).

Acknowledgements

Marcio Chaim Bajgelman (Brazilian Biosciences National Laboratory, Campinas, Brazil) for making the LVV. This work was supported by grants from “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo” (FAPESP, Young Investigator Project to D.J.A.M., 2013/10484-5, Master Fellowship to K.S.M., 2017/09071-9, Undergraduate Fellowship to P.F.S., 2016/24869-4, Post-doctoral Fellowship to M.P.S., 2015/01073-7 and Thematic Project to B.H.M., 2013/06077-5). J.F.R.P. is funded by the British Heart Foundation (RG/12/6/29670).

Author Contributions

K.S.M., P.F.S., M.P.d.S., L.B.K. and D.J.A.M. contributed to experiments involving virus microinjections and *in vivo* recordings. D.J.A.M. and M.P.d.S. contributed to experiments involving virus microinjections and neuronal recordings. K.S.M., P.F.S., M.P.d.S., L.B.K., J.F.R.P., B.H.M. and D.J.A.M. contributed to the conception and experimental design, data analyses and interpretation of the findings and preparation of the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

Additional Information

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018