MILENE RODRIGUES MALHEIROS LIMA

NEURÔNIOS CATECOLAMINÉRGICOS DO TRONCO
ENCEFÁLICO PARTICIPAM DOS AJUSTES RESPIRATÓRIOS
INDUZIDOS POR HIPÓXIA E HIPERCAPNIA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Thiago S. Moreira

Versão original

São Paulo
2017

RESUMO

MALHEIROS-LIMA, MR. Neurônios catecolaminérgicos do tronco encefálico contribuem para os ajustes respiratórios induzidos por hipóxia e hipercapnia. [Tese (Doutorado em Fisiologia Humana)] – São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Os neurônios catecolaminérgicos do grupamento C1 estão localizados na porção ventrolateral rostral do bulbo (RVLM). Embora sintetizem todas as enzimas necessárias para produzir catecolaminas, o principal neurotransmissor destes neurônios é o glutamato. Tem sido proposto que os neurônios C1 estão organizados de maneira viscerotrópica e que, em sua maioria, são intensamente ativados por hipoglicemia, infecção, inflamação, nocicepção e hipóxia. Evidências recentes sugerem que, além de contribuir para os ajustes cardiovasculares, os neurônios C1 também podem estar envolvidos no controle respiratório. No entanto, ainda não está claro na literatura se de fato os neurônios C1 contribuem para os ajustes respiratórios, sendo este o objetivo principal do presente estudo. Com o primeiro grupo de experimentos, demonstramos que os neurônios C1 contribuem para os ajustes respiratórios promovidos pela hipóxia, mas não pela hipercapnia, pois a depleção dos neurônios catecolaminérgicos localizados no RVLM atenuou o aumento da ventilação promovido pela hipóxia, predominantemente, por atenuar o aumento da frequência respiratória. Sabe-se que a maior parte dos neurônios C1 que se projetam para medula espinal está localizada no RVLM. Dessa forma, na etapa seguinte avaliamos se os neurônios catecolaminérgicos C1 que se projetam para medula espinal contribuem para os ajustes respiratórios. Como a técnica utilizada para promover a lesão dos neurônios catecolaminérgicos C1 com projeções bulbo espinais promove depleção concomitante dos neurônios catecolaminérgicos pontinos do grupamento A5, nós também avaliamos a contribuição dessa região no controle respiratório durante a hipóxia e hipercapnia. Os resultados encontrados nos permitem sugerir que os neurônios catecolaminérgicos C1 e A5 com projeções bulbo espinais contribuem para os ajustes respiratórios promovidos tanto pela hipóxia quanto pela hipercapnia. Na hipóxia, os neurônios catecolaminérgicos do grupamento C1 promovem aumento da ventilação via aumento da frequência respiratória, enquanto os neurônios do grupamento A5 promovem aumento da ventilação via aumento do volume corrente. Durante a hipercapnia, os neurônios A5 promovem aumento da ventilação via aumento no volume corrente, enquanto os neurônios C1 parecem não estar envolvidos, corroborando os dados do primeiro grupo de experimentos. Uma vez que os ajustes respiratórios promovidos pela ativação ou depleção dos neurônios C1 parecem envolver apenas mudanças na frequência respiratória, na última etapa do presente estudo, investigamos se os neurônios C1 apresentam conexões anatômicas e funcionais com os neurônios do complexo pré-Bötzinger, uma região classicamente conhecida por seu envolvimento no controle do ritmo inspiratório. Nossos resultados demonstram que os neurônios C1 se projetam para região do preBötC. Além disso, nós avaliamos se o aumento da respiração promovido pela ativação seletiva (optogenética) dos neurônios C1 depende da ativação de receptores glutamatérgicos ou adrenérgicos localizados no preBötC. Com esses experimentos, demonstramos que o bloqueio dos receptores glutamatérgicos, mas não dos adrenérgicos, atenuou o aumento da respiração promovido pela ativação optogenética do grupamento C1. Em conjunto, nossos resultados demonstram que os neurônios C1 contribuem para os ajustes respiratórios promovidos pela hipóxia, possivelmente, por meio da ativação direta de receptores glutamatérgicos localizados no preBötC.

Palavras-Chave: Adrenalina. Glutamato. Neurônios C1. Optogenética. Saporina.

ABSTRACT

MALHEIROS-LIMA, MR. Catecholaminergic neurons of the brainstem contributes to respiratory adjusts induced by hypoxia and hypercapnia. [Ph. D. thesis (Human Physiology)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The catecholaminergic C1 neurons are located in the rostral ventrolateral medulla (RVLM). These neurons synthesize all the enzymes necessary to produce catecholamines, but their main neurotransmitter is the glutamate. It has been proposed that C1 neurons are organized viscerotropically and are intensely activated by hypoglycemia, infection, inflammation, nociception and hypoxia. A previous study suggested that, in addition to their role in the cardiovascular adjustments, C1 neurons may also be involved in the respiratory control. However, it is not clear in the literature whether C1 neurons actually contribute to respiratory adjustments, which is the overall objective of the present study. With the first group of experiments, we demonstrated that C1 neurons contribute to the hypoxia-induced respiratory adjustments, but not to hypercapnia, since the depletion of the catecholaminergic neurons located in the RVLM attenuated the increase in ventilation promoted by hypoxia, predominantly by attenuating the respiratory rate increase. It is known that most of the C1 neurons that project into the spinal cord are located in RVLM. Thus, in the next step, we evaluated whether the catecholaminergic neurons (C1) that projects to the spinal cord contribute to respiratory adjustments. As a control, the A5 neurons are also evaluated in our study, because the protocol used to promote depletion of C1 cells also destroy the A5 neurons. The results allow us to suggest that catecholaminergic neurons with bulbo spinal projections contribute to the respiratory adjustments promoted by both hypoxia and hypercapnia. In hypoxia, the catecholaminergic neurons of the A5 group promote increase in ventilation by increasing the tidal volume, while the neurons of the C1 group promote increase in ventilation by increasing the respiratory rate. Corroborating the data from the first group of experiments, C1 neurons do not appear to be involved in respiratory control promoted by hypercapnia. Since the respiratory adjustments promoted by the activation or depletion of C1 neurons seem to involve only changes in respiratory rate, in the last protocol of the present study, we investigated whether C1 neurons have direct anatomic connections with the neurons of the pre-Bötzinger complex, a region classically known by its involvement in the respiratory rate control. Our results demonstrate that C1 neurons project into the preBötC region. Once the connection between C1 neurons and preBötC neurons has been confirmed, we evaluated whether respiration increase promoted by the selective activation (optogenetic) of C1 neurons depends on the activation of glutamatergic or adrenergic receptors located in preBötC. With these experiments, we demonstrated that the inhibition of glutamatergic receptors, but not of adrenergic receptors, attenuate the breathing increase promoted by the optogenetic activation of the C1 group. Taken together, our results demonstrated that C1 neurons contribute to hypoxia-induced respiratory adjustments, possibly through the direct activation of glutamatergic receptors located in preBötC.

Keyword: Adrenaline. C1 cells. Glutamate. Optogenetic. Saporin.

Os neurônios do grupamento catecolaminérgico C1, localizados na porção ventrolateral do bulbo (VLM), são classicamente conhecidos por seu envolvimento no controle cardiovascular (Ross et al., 1984; Schreihöfer, Guyenet, 1997; Madden et al., 1999; Schreihöfer, Guyenet, 2000; Guyenet et al., 2013). O modelo atual propõe que estes neurônios são, predominantemente, recrutados em situações que ofereçam risco de vida aos indivíduos, desencadeando respostas generalizadas e estereotipadas em defesa da homeostase (Guyenet et al., 2013). Tais respostas envolvem, além dos conhecidos ajustes cardiovasculares, o recrutamento de respostas imunológicas, neuroendócrinas, metabólicas, termorregulatórias e respiratórias. A hipóxia, caracterizada por reduções na pressão parcial de oxigênio no sangue arterial, além de desencadear ajustes imunológicos, neuroendócrinos, cardiovasculares, metabólicos, termorregulatórios e respiratórios, promove ativação intensa dos neurônios catecolaminérgicos do grupamento C1 (Guyenet et al., 2013). Dessa forma, no presente estudo, utilizamos ferramentas anatômicas e funcionais para investigar algumas das lacunas que envolvem o conhecimento atual sobre a contribuição dos neurônios catecolaminérgicos do grupamento C1 para os ajustes respiratórios promovidos pela hipóxia e pela hipercapnia.

1.1 Grupamento adrenérgico C1

A porção ventrolateral do bulbo (VLM) está localizada no quadrante ventrolateral da formação reticular bulbar, sendo delimitada, em sua porção rostral, pela porção caudal do núcleo motor do facial (VII) e, em sua porção caudal, pela porção compacta do núcleo ambíguos (NA) (Ilustração 1A) (Spyer, Gourine, 2009; Guyenet et al., 2013). O VLM é subdividido em três porções: rostral, intermediária e caudal, sendo, respectivamente, denominadas de bulbo ventrolateral rostral (RVLM), bulbo ventrolateral intermediário (IVLM) e bulbo ventrolateral caudal (CVLM). Nestas regiões, estão localizados diversos grupamentos neuronais envolvidos no controle cardiovascular e respiratório (Spyer, Gourine, 2009; Smith et al., 2013). Dentre as regiões cardiovasculares, podemos destacar o RVLM, o IVLM e o CVLM, e dentre as respiratórias, o núcleo retrotrapezóide (RTN), o grupamento respiratório parafacial lateral (pFRG), o complexo Bötzing (BötC), o complexo pre-Bötzing (preBötC), o grupamento respiratório ventrolateral rostral (rVRG) e o grupamento respiratório ventrolateral caudal (cVRG) (Ilustração 1A).

Ilustração 1 – Grupamento adrenérgico C1: definição e localização.

O painel (A) apresenta um desenho esquemático de uma secção sagital de um encéfalo de rato, destacando a coluna respiratória ventral (vermelho), composta pelos grupamentos neuronais: núcleo retrotrapezóide/grupamento respiratório parafacial (RTN/pFRG); complexo Bötzing (BC); complexo preBötzing (preBötC); grupamento respiratório ventrolateral rostral (rVRG); e grupamento respiratório ventrolateral caudal (cVRG); e duas regiões envolvidas no controle cardiovascular: o bulbo ventrolateral rostral (RVLM) e o bulbo ventrolateral caudal (CVLM) (amarelo). O painel (B) apresenta um esquema representativo das etapas envolvidas na síntese das catecolaminas (Painel A: adaptado de Spyer, Gourine, 2009)

No VLM, o grupamento C1 se localiza no RVLM e IVLM, sendo que, no RVLM, ele se inicia na porção caudal do núcleo motor do facial (-11,4 mm do bregma) e se estende até o final da porção compacta do núcleo ambíguos (-12,6 mm do bregma), enquanto no IVLM, ele se inicia no final da porção compacta do núcleo ambíguos (-12,6 mm do bregma) e termina no ponto médio da área postrema (-13,8 mm do bregma) (Guyenet et al., 2013). Os neurônios adrenérgicos C1 são, por definição, um dos três grupos de células do sistema nervoso central que sintetizam e expressam todas as enzimas necessárias para a síntese de adrenalina (Ilustração 1B), sendo a enzima Feniletanolamina-N-Metil transferase (PNMT), responsável pela conversão da noradrenalina em adrenalina, utilizada como marcador fenotípico deste grupamento neuronal (Guyenet, 2006; Guyenet et al., 2013). Dentre os três grupamentos adrenérgicos: C1, C2 e C3, o C1 é o maior deles, contendo aproximadamente 70% dos neurônios adrenérgicos do sistema nervoso central (Minson et al., 1990; Comer et al., 199). Os demais neurônios imunorreativos para PNMT estão distribuídos em duas regiões: no núcleo do trato solitário (NTS) e na região medial e dorsal do bulbo (Minson et al., 1990). Embora as

células C1 contenham todas as enzimas necessárias para síntese de catecolaminas, uma grande parte destas células ($\cong 90\%$) não contém o transportador de monoaminas plasmalemal, responsável por restaurar os estoques de catecolaminas via recaptação, levantando a hipótese de que as células C1 não utilizam as catecolaminas como principal neurotransmissor (Guyenet et al., 2013). No entanto, como esta hipótese ainda não foi confirmada, não podemos descartar a possibilidade de que as catecolaminas contribuam para as respostas desencadeadas pela ativação dos neurônios C1.

Antes do desenvolvimento de ferramentas neuroanatômicas mais seletivas para o estudo das conexões neurais, o grupamento C1 era conhecido apenas por suas conexões com a coluna intermédia lateral (IML) e com o hipotálamo, mais especificamente com o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (Milner et al., 1987; Milner et al., 1988; Milson et al., 1990; Morrison et al., 1991). Com relação a estas conexões, está bem descrito na literatura que aproximadamente 70% dos neurônios do RVLM são neurônios C1 e que, destes, aproximadamente 70% se projetam para IML, de modo que os 30% restantes se projetam para o PVN (Milson et al., 1990; Schreihofer, Guyenet 1997; Card et al., 2006; Guyenet et al., 2013). Utilizando vetores virais para o estudo seletivo das conexões anatômicas, foi demonstrado que os axônios colaterais provenientes dos neurônios C1, que classicamente se projetam para o IML e PVN, também se conectam com outras estruturas cerebrais envolvidas com o controle autônomo e comportamental (Card et al., 2006; Abbott et al., 2013). Dentre as regiões encefálicas identificadas estão os grupamentos catecolaminérgicos bulbares e pontinos: A1, A2, A5, A6 (locus coeruleus) e A7, o núcleo motor dorsal do vago (DMV), o núcleo parabraquial (PBN), a substância cinzenta periaquedutal (PAG), a rafe bulbar, o núcleo paraventricular do tálamo (PVT), os núcleos hipotalâmicos paraventricular (PVN) e dorsomedial (DMH) e a coluna respiratória ventral (VRC) (Hokfelt et al., 1973; Hokfelt et al., 1974; Card et al., 2006; Abbott et al., 2013; Depuy et al., 2013; Guyenet et al., 2013; Burke et al., 2014; King et al., 2015; Stornetta et al., 2016; Kang et al., 2017). Embora as conexões individuais entre os neurônios C1 não estejam completamente esclarecidas, tem sido fortemente aceito que estas células, incluindo os neurônios C1 pré-motores simpáticos, são capazes de manter conexões simultâneas com outras regiões encefálicas, incluindo os neurônios da coluna respiratória ventral (Card et al., 2006; Burke et al. 2014; King et al., 2015; Kang et al., 2017). Tal hipótese é suportada por duas evidências funcionais: 1) $\cong 45\%$ dos neurônios C1 com projeções bulbo espinais podem ser antidromicamente ativados por outras regiões encefálicas, como a PAG ou o PBN (Haselton, Guyenet, 1990) e 2) a estimulação optogenética de neurônios barossensíveis

que compõem o grupamento C1 promove ativação de neurônios envolvidos no controle respiratório, localizados na região do RTN e do BötC (Burke et al., 2014).

Os neurônios C1, além do fenótipo catecolaminérgico, expressam RNA mensageiro para a proteína do transportador vesicular de glutamato 2 (VGlut2) e não expressam marcadores de neurônios inibitórios, como o ácido descarboxilase glutâmico (GAD) e o transportador de glicina 2 (GlyT2) (Schreihöfer, et al., 1999; Stornetta, Guyenet 1999; Stornetta et al., 2002; Schreihöfer, Guyenet; 2003). No entanto, embora os neurônios C1 expressem o fenótipo catecolaminérgico, evidências funcionais e anatômicas indicam que estes neurônios utilizam o glutamato como principal neurotransmissor (Depuy et al., 2013; Guyenet et al., 2013; Holloway et al., 2013; Abbott et al., 2014; Holloway et al., 2015). Os terminais que expressam PNMT, os quais também expressam glutamato, formam contato sináptico assimétrico, consistente com a ultraestrutura de sinapses excitatórias glutamatérgicas clássicas, reforçando a hipótese de que os neurônios C1 atuam por meio de sinapses glutamatérgicas (Milner et al., 1987; Milner et al., 1988; Agassandian et al., 2012; Depuy et al., 2012; Abbot et al., 2014). Além disso, tem sido consistentemente demonstrado que as respostas promovidas pela ativação seletiva dos neurônios catecolaminérgicos do grupamento C1 são desencadeadas por sinalização glutamatérgica (Depuy et al., 2013; Guyenet et al., 2013; Holloway et al., 2013; Abbott et al., 2014; Holloway et al., 2015). Embora o glutamato pareça ser o neurotransmissor responsável pelas respostas desencadeadas pelo grupamento C1, outros neuropeptídeos co-expressos na região (por exemplo o neuropeptídeo Y, a substância P, o hormônio liberador de tireotrofina, a anfetamina, e o polipeptídeo ativador de adenilato ciclase pituitário) também podem contribuir para estas respostas (Stornetta 2009; Guyenet et al., 2013). As funções dos neuropeptídeos co-expressos nos neurônios C1 ainda não são bem conhecidas, o que já foi demonstrado até o momento é que eles possibilitam a identificação das projeções eferentes destes neurônios. Os neurônios C1 localizados em regiões mais caudais do VLM co-expressam neuropeptídeo Y e se projetam predominantemente para o PVN, enquanto os neurônios C1 localizados em regiões mais rostrais do VLM não co-expressam neuropeptídeo Y e se projetam predominantemente para o IML e para o núcleo motor dorsal do vago (Stornetta 2009; Guyenet et al., 2013).

Considerando o conjunto de evidências (anatômicas e funcionais) uma das hipóteses do presente estudo é que os neurônios C1 podem se comunicar diretamente, por meio de arborizações, com neurônios localizados na coluna respiratória ventral (Abbott et al., 2013; Burke et al., 2014; Kang et al, 2017), como o BötC, o preBötC, o rVRG, o cVRG, RTN e/ou pFRG, promovendo ajustes respiratórios via ativação de receptores glutamatérgicos ou

adrenérgicos localizados nestas regiões e contribuindo para os ajustes respiratório promovidos pela hipóxia e pela hipercapnia.

1.2 Grupamento adrenérgico C1 e o controle cardiovascular

Os neurônios do RVLM que se projetam para medula espinal são classicamente conhecidos por seu envolvimento no controle tônico e reflexo da pressão arterial (Guertzenstein, 1973; Guertzenstein, Silver, 1974; Guyenet et al., 1989; Guyenet, 2006), regulando o tônus vasomotor periférico via projeções diretas para neurônios pré-ganglionares simpáticos, localizados na coluna intermédio lateral (IML) da medula espinal (Loewy, 1981; Millhorn, Eldridge, 1986; Guyenet, 2006). A estimulação concomitante dos neurônios C1 e não-C1, localizados na região do RVLM, promove aumento da pressão arterial, enquanto a inibição causa redução da pressão arterial (Reis et al., 1984; Ross et al., 1984; Willette et al., 1983; Morrison et al., 1991; Sapru 1996; Schreihöfer et al., 2000; Moraes et al., 2011). Nos estudos eletrofisiológicos, nos quais foi possível diferenciar, por imunoistoquímica para PNMT, os neurônios C1 dos não-C1 foi demonstrado que, embora representem $\cong 70\%$ dos neurônios simpatoexcitatórios com projeções bulbo espinais do RVLM, os neurônios C1 não apresentam atividade de marcapasso, são barossensíveis (inibidos pela ativação do barorreflexo) e são modulados pela atividade respiratória (Schreihöfer, Guyenet 1997). Já os neurônios não-C1 apresentam atividade marcapasso, são barossensíveis e não são moduladas por respiração (Schreihöfer, Guyenet 1997). Na época, as descobertas das diferenças eletrofisiológicas entre os neurônios C1 e não-C1 possibilitou inúmeros avanços sobre a contribuição destes neurônios para o controle cardiovascular. No entanto, o registro neuronal só era possível de ser realizado em fatias encefálicas, em animais anestesiados ou preparações reduzidas, impossibilitando o estudo da contribuição dos grupamentos C1 e não-C1 para os ajustes cardiovasculares em animais não anestesiados (Guyenet et al., 2013). Além disso, com ferramentas farmacológicas não era possível realizar ativações seletivas dos neurônios C1 ou não-C1 (Guyenet et al., 2013). Uma vez que, tanto os neurônios do grupamento C1 quanto os não-C1 são glutamatérgicos, o estudo da contribuição individual de cada um desses grupamentos neuronais para o controle cardiovascular em animais não anestesiados só foi possível após o desenvolvimento de ferramentas metodológicas que possibilitassem a ativação, a inibição ou a depleção seletiva dos neurônios C1.

A primeira ferramenta metodologia utilizada para estudar a contribuição dos neurônios adrenérgicos C1 para os ajustes cardiovasculares foi à toxina saporina conjugada com anti-

dopamina β - hidroxilase¹ (anti-D β H-SAP), que, ao ser administrada diretamente no RVLM, promove destruição dos neurônios catecolaminérgicos presentes na região (Madden et al., 1999). Em um trabalho pioneiro, foi demonstrado que, ao contrário do esperado, os neurônios C1 não eram determinantes para o controle tônico da pressão arterial, pois só foram observadas reduções na pressão arterial quando o percentual de redução no número de neurônios catecolaminérgicos do grupamento C1 ultrapassou 80% (Madden et al., 1999; Madden, Sved 2003). Uma vez que a anti-D β H-SAP é transportada retrogradamente, um trabalho subsequente injetou a toxina anti-D β H-SAP diretamente na IML, para promover a depleção seletiva dos neurônios catecolaminérgicos que se projetam para medula espinal (Schreihöfer, Guyenet, 2000; Schreihöfer et al., 2000). Neste estudo, quando apenas os neurônios catecolaminérgicos com projeções bulbo espinais foram lesados, os valores médios de pressão arterial não foram alterados, levantando dúvidas sobre a importância dessa região para o controle tônico da pressão arterial (Madden et al., 1999; Schreihöfer, Guyenet, 2000; Schreihöfer et al., 2000; Madden, Sved 2003). Um aspecto importante, a ser considerado nos estudos descritos acima, é que a toxina não promove morte neuronal instantânea, sendo necessário esperar pelo menos 2 semanas para que fossem observadas reduções significativas na quantidade de neurônios catecolaminérgicos do RVLM (Madden et al., 1999; Schreihöfer, Guyenet, 2000; Schreihöfer et al., 2000; Madden, Sved 2003). Dentro deste contexto, não podemos descartar a possibilidade de que a contribuição real dos neurônios C1 para o controle tônico da pressão arterial tenha sido subestimada, pois adaptações compensatórias podem ter sido desenvolvidas durante esse período. Na época, esse resultado foi considerado inesperado, pois já era bem descrito que 70% dos neurônios do RVLM que se projetam para IML são neurônios C1. Embora a toxina saporina tenha possibilitado a avaliação dos efeitos crônicos promovidos pela depleção dos neurônios catecolaminérgicos do grupamento C1 em animais não-anestesiados durante várias condições, até aquele momento, ainda não era possível realizar inibições ou estimulações seletivas agudas das células C1.

O desenvolvimento das técnicas de fármaco e optogenética possibilitou grandes avanços no estudo das funções dos neurônios catecolaminérgicos do grupamento C1 em animais anestesiados e não anestesiados, pois com elas foi possível avaliar o efeito tanto da inibição

¹ A toxina anti-D β H-SAP é uma neurotoxina composta por proteínas de inativação ribossômica de transporte axonal retrógrado, conjugadas com o anticorpo anti-dopamina- β -hidroxilase. A ligação do anticorpo ao complexo D β H, presente na membrana dos neurônios catecolaminérgicos durante a exocitose, possibilita a internalização da toxina. Uma vez dentro da célula, a toxina bloqueia a síntese proteica, causando a morte neuronal.

quanto da estimulação aguda dos catecolaminérgicos do grupamento C1 (Abbott et al., 2010; Kanbar et al., 2010; Marina et al., 2011; Abbott et al., 2012; Abbott et al., 2013; Depuy, et al., 2013; Burke et al., 2014; Menuet et al., 2017; Wenker et al., 2017). Os primeiros estudos avaliaram os efeitos da ativação seletiva dos neurônios C1 (optogenética) sobre os parâmetros cardiovasculares e demonstraram que a ativação optogenética do grupamento C1 promove um aumento expressivo da pressão arterial e da atividade simpática, tanto em animais anestesiados (Abbott et al., 2010) quanto em animais não anestesiados (Kanbar et al., 2010), reproduzindo os efeitos observados com as técnicas convencionais de estimulação química ou elétrica do RVLM (Abbott et al., 2010; Kanbar et al., 2010). Já com os estudos nos quais a inibição seletiva dos neurônios C1 foram avaliadas em animais anestesiados (Marina et al., 2011; Wenker et al., 2017) e não anestesiadas (Wenker et al., 2017), foi demonstrado que de fato os neurônios C1 apresentam uma contribuição modesta no controle tônico da pressão arterial em animais não anestesiados (Wenker et al., 2017), enquanto apresentam uma contribuição expressiva no controle cardiovascular em animais anestesiados (Marina et al., 2011; Wenker et al., 2017). Além de apresentar contribuições distintas com relação as condições com e sem anestesia, os neurônios C1 pareciam apresentar diferenças no controle cardiovascular ao compararmos sono REM, sono não-REM e vigília (Abbott et al., 2013). Os autores demonstraram que a intensidade das respostas cardiovasculares promovidas pela estimulação dos neurônios catecolaminérgicos do grupamento C1 era menor quando realizada durante o sono REM (Abbott et al., 2013). Em um estudo subsequente, e ainda mais seletivo (ativação optogenética dos neurônios C1 em ratos D β H-cre), os autores demonstraram que os neurônios C1 são determinantes para o controle pressórico durante todos os estados: sono REM, sono não REM e vigília, quanto só contribui para o controle da frequência cardíaca durante o sono não REM e a vigília (Burke et al., 2014).

É classicamente aceito que os neurônios C1 são determinantes para o controle reflexo da pressão arterial, sendo inibidos pela ativação do barorreflexo e ativados por hipóxia (Guyenet et al., 2013). Nos estudos prévios, realizados após o desenvolvimento de tecnologias seletiva para o estudo da função dos neurônios C1, essas respostas foram confirmadas (Madden et al., 1999; Schreihöfer, Guyenet, 2000; Schreihöfer et al., 2000; Madden, Sved 2003; Abbott et al., 2010; Kanbar et al., 2010; Abbott et al., 2013; Burke et al., 2014; Wenker et al., 2017). A depleção dos neurônios catecolaminérgicos do grupamento C1, por injeções da toxina anti-D β H-SAP no RVLM ou na IML, atenuou os reflexos cardiovasculares promovidos pela ativação/inibição dos barorreceptores e ativação dos quimiorreceptores periféricos, sendo a magnitude de contribuição dos neurônios C1 para o controle reflexo da pressão arterial

diretamente relacionada à extensão da lesão (Madden et al., 1999; Schreihöfer, Guyenet, 2000; Schreihöfer et al., 2000; Madden, Sved, 2003).

Durante o sono, a hipóxia, a hipercapnia e asfixia promovem estimulação cardiorrespiratória e despertar (Dempsey et al., 2012). Como os neurônios C1 são importantes para o controle cardiovascular, foi especulado que estes neurônios seriam determinantes para os ajustes cardiovasculares promovidos pela hipóxia e pela hipercapnia (Abbott et al., 2013). O primeiro estudo que avaliou a função dos neurônios C1 nestas condições promoveu ativação dos neurônios C1, em ratos não anestesiados, durante a hipóxia e a hipercapnia (Burke et al., 2014). Durante a hipóxia, ocorreu uma pequena atenuação na magnitude da resposta cardiovascular promovida pela fotoestimulação dos neurônios C1, enquanto durante a hipercapnia, poucas alterações foram observadas (Burke et al., 2014). Em um estudo subsequente, no qual foi realizada a inibição dos neurônios C1 durante a hipóxia e hiperpania, foi demonstrado que bloqueio dos neurônios C1 durante a hipóxia promove redução da pressão arterial e da frequência cardíaca, enquanto durante a hipercapnia, ocorre redução da pressão arterial e aumento da frequência cardíaca (Wenker et al., 2017). Além disso, os autores demonstraram que os efeitos cardiovasculares observados na hipóxia são revertidos pela adição de CO₂ (Wenker et al., 2017). Em conjunto, estes resultados sugerem que os neurônios C1 contribuem para os ajustes cardiovasculares promovidos pela hipóxia, e que durante a hipercapnia os neurônios C1 não parecem exercer uma influência direta sobre o controle cardiovascular (Wenker et al., 2017). A hipótese mais plausível para explicar a reversão dos ajustes cardiovasculares induzidos pela hipóxia após a adição de CO₂ propõe que o aumento da respiração promovido pelo CO₂ decorreria de uma redução na hipoxemia arterial, o que possibilitaria a ativação dos neurônios do RTN, os quais são inibidos por alcalose (Basting et al., 2015). Tal resposta, faria com o estímulo hipóxico fosse menos intenso, reduzindo a ativação dos corpúsculos carotídeos e, conseqüentemente, a descarga dos neurônios C1 (Basting et al., 2015; Wenker et al., 2017). No entanto, embora vários avanços tenham sido realizados no estudo da contribuição dos neurônios C1 para o controle tônico e reflexo da pressão arterial, não foram encontrados estudos que avaliaram os efeitos promovidos pela depleção dos neurônios C1, por meio de injeções da toxina anti-DβH-SAP no RVLM e na medula espinal, sobre os ajustes cardiovasculares promovidos pela hipóxia e a hipercapnia, sendo um dos objetivos do presente estudo.

1.3 Grupamento adrenérgico C1 e o controle respiratório

Para que o ritmo e a amplitude respiratória sejam ajustados de forma a assegurar a homeostase gasométrica, é necessário que o sistema nervoso central receba informações refinadas e precisas da pressão parcial de O_2 e CO_2 no sangue arterial. Esse papel é desempenhado pelos quimiorreceptores, que são estruturas especializadas em detectar alterações químicas no sangue (Feldman et al., 2003; Guyenet et al., 2010; Prabhakar et al., 2015). Em condições normais, os quimiorreceptores realizam monitoramento contínuo das PaO_2 , $PaCO_2$ e pH plasmático, informando ao SNC e possibilitando que o mesmo promova os ajustes adequados da ventilação (Guyenet et al., 2010; Guyenet, Bayliss, 2015).

Os quimiorreceptores periféricos são mais sensíveis à queda na PaO_2 do que ao aumento na $PaCO_2$ e queda do pH (Prabhakar et al., 2015). Esses sensores são encontrados na bifurcação carotídea e na curvatura da aorta e as informações geradas por eles é veiculada, via nervos vago e glossofaríngeo, até o sistema nervoso central (Feldman et al., 2003; Nurse, 2010). Suas fibras entram no tronco encefálico na fissura póstero-lateral do bulbo, incorporando-se ao trato solitário, terminando predominantemente nas porções dos núcleos do trato solitário denominadas de comissural (NTScom) ou caudal (NTSc) (Finley, Katz, 1992; Takakura et al., 2006). A partir do NTScom, comunicações neurais são ativadas, incluindo a projeção para o grupamento catecolaminérgico C1 (Aicher et al., 1996; Koshiya, Guyenet, 1996). Por outro lado, os quimiorreceptores centrais são altamente sensíveis ao aumento na $PaCO_2$ e à acidose (Feldman et al., 2003; Richerson, 2004; Nattie, Li, 2008; Guyenet et al., 2010; Guyenet, Bayliss 2015). Embora seja crescente o número de trabalhos postulando que núcleos de células quimiossensíveis estejam distribuídos ao longo do encéfalo (Nattie, Li, 2010), é comumente aceito que o núcleo retrotapezóide (RTN), localizado na porção ventral ao núcleo motor do núcleo facial e próximo da superfície ventrolateral do bulbo (Connelly et al., 1989; Connelly et al., 1990; Mulkey et al., 2004; Takakura et al., 2006), concentre o principal grupamento de células quimiorreceptoras centrais. Além disso, essa região está localizada próxima do grupamento catecolaminérgico C1 (Mulkey et al., 2004; Moreira et al., 2006; Lazarenko et al., 2009). Esta organização anátomo-funcional sugere uma integração entre o quimiorreflexo periférico e central, a regulação da respiração e funções autônomas (Rosin et al., 2006; Takakura et al., 2006).

Está bem estabelecido na literatura a contribuição do grupamento C1 durante a ativação dos quimiorreceptores periféricos e centrais, no que diz respeito ao controle autônomo, mais especificamente na modulação da atividade simpática (Koshiya et al., 1993; Koshiya, Guyenet,

1996; Moreira et al., 2006; Takakura et al., 2011; Moraes et al., 2013). No entanto, a participação dos neurônios C1 no controle respiratório só foi descoberta recentemente (Abbott et al., 2014; Burke et al., 2014). Até então, os vetores virais utilizados nos estudos de opto e farmacogenética promoviam a transfecção concomitante dos neurônios C1 e dos neurônios do RTN, pois o promotor PRSx8 promove transfecção de neurônios que expressam o fator de transcrição Pho2a/b, o qual é expresso em ambos os grupamentos neuronais. Dessa forma, como os neurônios C1 são classicamente conhecidos por seu envolvimento no controle cardiovascular e o RTN é por seu envolvimento no controle respiratório, as respostas cardiovasculares observadas após a fotoestimulação eram atribuídas aos neurônios C1 e as respiratórias aos neurônios do RTN (Abbott et al., 2010; Kanbar et al., 2010; Abbott et al., 2013).

A primeira evidência de que os neurônios C1 participam do controle respiratório foi observada em um estudo realizado em camundongos D β H-cre não anestesiados (Abbott et al., 2013). Neste estudo, a fotoestimulação de neurônios catecolaminérgicos localizados no bulbo ventrolateral promoveu um aumento intenso da ventilação (Abbott et al., 2013). Num estudo subsequente, cujo foco central era investigar a contribuição do transportador vesicular de glutamato 2 (VGlut2) nas respostas promovidas pela ativação dos neurônios C1, os autores também demonstraram que o aumento da ventilação induzido pela fotoestimulação dos neurônios C1 depende da expressão do VGlut2, pois a fotoestimulação dos neurônios C1 em animais knockout para VGlut2 nos neurônios catecolaminérgicos não gerou aumento da ventilação (Abbott et al., 2014). Como os camundongos D β H-cre também expressam cre em neurônios A1, poderíamos especular que os ajustes respiratórios promovidos pela fotoestimulação decorreriam da ativação dos neurônios noradrenérgicos A1. No entanto, diferentemente dos neurônios C1, os neurônios A1 não expressam nenhum tipo de transportador vesicular de glutamato, utilizando predominantemente as catecolaminas como neurotransmissor (Stornetta et al., 2002). Portanto, o aumento da ventilação promovido pela estimulação dos neurônios C1 parece ser promovido pela estimulação glutamatérgica de neurônios envolvidos no controle respiratório, no entanto, a circuitaria neuronal envolvida nesta resposta ainda não foi identificada.

A existência de uma conexão direta entre os neurônios C1 e o complexo pré-Bötzinger é anatomicamente plausível, pois a ativação dos neurônios C1 gera suspiros e os efeitos respiratórios envolvem o aumento da frequência respiratória (Abbott et al., 2013; Abbott et al., 2014; Burke et al., 2014). No entanto, a complexidade do padrão de projeções dos neurônios C1 (Card et al., 2006; Abbott et al., 2013) tornam muitas outras vias possíveis, como por exemplo, a estimulação dos neurônios C1 poderia ativar a respiração por meio de projeções

para o núcleo parabraquial, para coluna respiratória ventral, para substância cinzenta periaquedutal, ou mesmo, neurônios hipotalâmicos (Card et al., 2006; Abbott et al., 2013; Stonertta et al., 2016). Além disso, ao avaliar o efeito da fotoestimulação seletiva dos neurônios C1 em ratos D β H-cre, foi demonstrado que a fotoestimulação destes neurônios promove aumento da atividade de neurônios envolvidos no controle respiratório, localizados na região do núcleo retrotrapezóide e no complexo Böttinger (Burke et al., 2014), sugerindo que a contribuição dos neurônios C1 para o controle respiratório poderia ocorrer via ativação direta de uma destas regiões. É plausível sugerir que a ativação respiratória desencadeada pela fotoestimulação dos neurônios C1 seja desencadeada pela ativação do RTN, pois, além de serem inervados pelos neurônios C1 (Card et al., 2006; Abbott et al., 2013), a administração endovenosa de cianeto de potássio (KCN) promove aumento da frequência de disparo destes neurônios (Takatura et al., 2006).

Para avaliar se os ajustes cardiorrespiratórios promovidos pela ativação dos neurônios C1 neurônios são estado-dependentes, os autores realizaram a fotoestimulação destes neurônios durante o sono REM, o sono não-REM e a vigília (Burke et al., 2014). Os resultados mostraram que os ajustes cardiorrespiratórios promovidos pela ativação dos neurônios C1 foram diferentes apenas durante o sono-REM, sendo a redução da frequência cardíaca, e o aumento da ventilação observadas apenas durante a vigília e o sono não-REM. Os outros parâmetros, o aumento da pressão arterial e aumento do volume corrente, não diferiu entre o sono REM, o sono não-REM e a vigília (Burke et al., 2014). Com estes trabalhos, foi demonstrado que a ativação seletiva do grupamento C1 aumenta a ventilação (Abbott et al., 2013; Abbott et al., 2014; Burke et al., 2014). No entanto, além de esclarecer as possíveis vias responsáveis por esta resposta, ainda falta determinar em que condições/estímulos estas vias seriam recrutadas, sendo um dos objetivos do presente estudo avaliar se os neurônios C1 são determinantes para os ajustes respiratórios promovidos pela hipóxia e pela hipercapnia.

A ativação optogenética dos neurônios C1 reproduz diversas respostas desencadeadas pela hipóxia, como a taquipneia, hipertensão, bradicardia e suspiros, sugerindo que os neurônios C1 poderiam estar envolvidos nos ajustes respiratórios promovidos pela hipóxia (Abbott et al., 2009; Kanbar et al., 2010; Abbott et al., 2013; Abbott et al., 2014; Burke et al., 2014; Wenker et al., 2017). No entanto, ao realizar a fotoestimulação dos neurônios C1 durante a hipóxia, foi observado que a exposição a hipóxia bloqueou o aumento da ventilação promovido pela ativação seletiva dos neurônios C1 (Burke et al., 2014), levantando dúvidas sobre a real contribuição dos neurônios C1 para os ajustes respiratórios promovidos pela hipóxia (Burke et al. 2014). Neste mesmo estudo, os autores também demonstraram que, diferentemente do

observado na hipóxia, o aumento da ventilação desencadeado pela fotoestimulação dos neurônios C1 não foi alterado pela hipercapnia (Burke et al., 2014). Como a fotoestimulação dos neurônios C1 promove aumento da frequência de disparo de em neurônios do RTN (Burke et al., 2014), este conjunto de resultados dão suporte a hipótese de que o aumento da ventilação promovido pela ativação dos neurônios C1 poderia ser desencadeada pela ativação direta do RTN. No entanto, em um estudo subsequente, Basting e colaboradores (2015) mostraram que os neurônios do RTN são inibidos por alcalose (Basting et al., 2015), tornando improvável a hipótese de que o aumento da ventilação desencadeado pela hipóxia poderia decorrer de da conexão direta entre os neurônios C1 e o RTN. Um aspecto importante a ser considerado é que, embora a ativação optogenética dos neurônios C1 promova respostas cardiorrespiratórias similares as observadas na hipóxia, ela não é capaz, por exemplo, de simular a alcalose gerada pela hipóxia. Portanto, mesmo estando estabelecido que a ativação dos neurônios C1 promove aumento da ventilação, com os trabalhos realizados até o momento, não foi possível determinar se o controle ventilatório basal e os ajustes ventilatórios promovidos pela hipóxia e pela hipercapnia, dependem da ativação dos neurônios catecolaminérgicos do grupamento C1.

No trabalho realizado por Burke e colaboradores (2014), as respostas ventilatórias promovidas pela fotoestimulação dos neurônios C1 foram atribuídas a os neurônios C1 localizados na porção rostral do bulbo ventrolateral (RVLM), onde estão concentrados os neurônios C1 que se projetam para medula espinal (Burke et al., 2014). Já foi demonstrado previamente que os neurônios C1/A1 com projeções para o núcleo paraventricular do hipotálamo contribuem para o aumento da ventilação promovido pela hipóxia e pela hipercapnia (King et al., 2015), sendo um dos objetivos do presente estudo avaliar se os neurônios catecolaminérgicos do grupamento C1, que se projetam para medula espinal, contribuem para os ajustes respiratórios nestas mesmas condições. É importante ressaltar que a contribuição seletiva dos neurônios A1 para os ajustes respiratórios ainda não foi demonstrada, de modo que não podemos descartar a possibilidade de que eles participem dos ajustes respiratórios promovidos pela hipóxia e pela hipercapnia.

Além de promover aumento da ventilação, a ativação seletiva dos neurônios C1 gera suspiros (Burke et al., 2014). Os suspiros são gerados pela ativação de neurônios do complexo pre-Bötzinger (Viemari et al., 2013), a qual pode decorrer da ativação de receptores β -adrenérgicos localizados na região (Viemari et al., 2013), reforçando a hipótese de que possa existir uma conexão direta entre os neurônios C1 e os neurônios do preBötC. Portanto, como a ativação optogenética do grupamento C1 promove aumento da ventilação, predominantemente, via aumento da frequência respiratória, uma hipótese adicional levantada no presente estudo foi

a de que os efeitos respiratórios promovidos pela ativação optogenética do grupamento C1 desencadeia aumento da respiração por meio da ativação dos neurônios localizados no complexo pre-Bötzinger, uma região classicamente conhecida por gerar o ritmo inspiratório (Smith et al., 1991; Feldman, Del Negro, 2006; Feldman et al., 2013). Além disso, além de modular os suspiros, as catecolaminas endógenas também modulam a atividade do preBötC, sendo plausível especular, considerando a proximidade anatômicas entre estas regiões, que os neurônios A1/C1 contribuam para estas respostas (Viemari, Ramirez, 2006; Zanella et al., 2006; Zanella et al., 2014). Portanto, uma das hipóteses do presente estudo é que o aumento da ventilação promovido pela ativação dos neurônios C1 é desencadeada pela ativação de receptores adrenérgicos localizados na região do preBötC. Além disso, como as evidências, encontradas até o momento, sugerem que as respostas desencadeadas pela ativação dos neurônios C1 são predominantemente promovidas pela liberação de glutamato (Abbott et al., 2012; Depuy et al., 2013; Holoway et al., 2013; Abbott et al., 2014; Halloway et al., 2015), também especulamos que o aumento da ventilação promovido pela ativação optogenética dos neurônios C1 promove aumento da respiração por meio da ativação de receptores glutamatérgicos localizados no preBötC.

Em conjunto, os resultados do presente estudo nos permitem sugerir que:

1) os neurônios do grupamento C1 contribuem para os ajustes cardiorrespiratórios durante a hipóxia, mas não durante a normóxia e a hipercapnia (protocolo 1);

2) os neurônios catecolaminérgicos C1 e A5 que se projetam para medula espinal contribuem para os ajustes respiratórios promovidos pela hipóxia (C1e A5) e hipercapnia (A5). Além disso, nós também demonstramos que os neurônios C1 modulam os ajustes respiratórios promovidos pela hipóxia por meio de aumentos na frequência respiratória, enquanto os neurônios A5 modulam os ajustes ventilatórios na hipóxia e na hipercapnia por meio de aumentos no volume corrente (Protocolo 2).

3) O aumento da frequência respiratória promovido pela ativação optogenética do grupamento C1 depende da ativação de receptores glutamatérgicos, mas não catecolaminérgicos, localizados no preBötC, os quais podem ser ativados por meio de uma conexão direta entre estas duas regiões (Protocolo 3).

A Ilustração 5 apresenta o modelo teórico proposto por nós, considerando o conjunto de resultados observados no presente estudo.

Ilustração 5 – Modelo proposto.

A ilustração apresenta o modelo teórico proposto para explicar a contribuição dos neurônios catecolaminérgicos C1 e A5 nos ajustes respiratórios promovidos pela hipóxia e pela hipercapnia. Nos sugerimos que, em resposta a uma redução na pressão parcial de oxigênio (hipóxia) ocorreria a estimulação dos quimiorreceptores periféricos e das células gliais localizadas na região do RVLM, promovendo a ativação de ajustes cariorrespiratórios. As aferências provenientes dos quimiorreceptores periféricos ativam neurônios localizados na porção comissural do núcleo do trato solitário (NTS). Os neurônios do NTS apresentam conexões anatômicas com diversas regiões envolvidas nos ajustes cardiorrespiratórios promovidas pela hipóxia, tais como grupo noradrenérgico A5, grupo adrenérgico C1, regiões hipotalâmicas, núcleo retrotrapezoide (RTN), e coluna respiratória. Os grupos C1 e A5 podem contribuir tanto para os ajustes respiratórios quanto cardiovasculares. O grupo C1, além de regular a atividade simpática, parece modular os ajustes ventilatórios induzidos pela hipóxia por meio de projeções diretas para regiões envolvidas no controle respiratório (preBötC e pFRG). As linhas cheias representam as projeções já descritas na literatura e as linhas tracejadas representam sugestões de possíveis projeções do tronco encefálico envolvidas no controle respiratório.

REFERÊNCIAS²

- Abbott SB, Coates MB, Stornetta RL, Guyenet PG. Optogenetic stimulation of c1 and retrotrapezoid nucleus neurons causes sleep state-dependent cardiorespiratory stimulation and arousal in rats. *Hypertension*. 2013; 61(4):835-41.
- Abbott SB, DePuy SD, Nguyen T, Coates MB, Stornetta RL, Guyenet PG. Selective optogenetic activation of rostral ventrolateral medullary catecholaminergic neurons produces cardiorespiratory stimulation in conscious mice. *J Neurosci*. 2013; 33(7):3164-77.
- Abbott SB, Holloway BB, Viar KE, Guyenet PG. Vesicular glutamate transporter 2 is required for the respiratory and parasympathetic activation produced by optogenetic stimulation of catecholaminergic neurons in the rostral ventrolateral medulla of mice in vivo. *Eur J Neurosci*. 2014; 39(1):98-106.
- Abbott SB, Kanbar R, Bochorishvili G, Coates MB, Stornetta RL, Guyenet PG. C1 neurons excite locus coeruleus and A5 noradrenergic neurons along with sympathetic outflow in rats. *J Physiol*. 2012; 590:2897–915.
- Abbott SB, Stornetta RL, Fortuna MG, Depuy SD, West GH, Harris TE, Guyenet PG. Photostimulation of retrotrapezoid nucleus phox2b-expressing neurons in vivo produces long-lasting activation of breathing in rats. *J Neurosci*. 2009; 29(18):5806-19.
- Abbott SB, Stornetta RL, Socolovsky CS, West GH, Guyenet PG. Photostimulation of channelrhodopsin-2 expressing ventrolateral medullary neurons increases sympathetic nerve activity and blood pressure in rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010; 182(9):1184-94.
- Abbott SB, Stornetta RL, Coates MB, Guyenet PG. Phox2b-expressing neurons of the parafacial region regulate breathing rate, inspiration, and expiration in conscious rats. *J Neurosci*. 2011; 31(45):16410-22.
- Accorsi-Mendonça D, Leão RM, Aguiar JF, Varanda WA, Machado BH. Urethane inhibits the GABAergic neurotransmission in the nucleus of the solitary tract of rat brain stem slices. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007; 292(1): R396-402.
- Agassandian K, Shan Z, Raizada M, Sved AF, Card JP. C1 catecholamine neurons form local circuit synaptic connections within the rostroventrolateral medulla of rat. *Neurosci*. 2012; 227: 247–59.
- Aicher SA, Saravay RH, Cravo S, Jeske I, Morrison SF, Reis DJ, Milner TA. Monosynaptic projections from the nucleus tractus solitarii to C1 adrenergic neurons in the rostral ventrolateral medulla: comparison with input from the caudal ventrolateral medulla. *J Comp Neurol*. 1996; 373(1):62-75.
- Angelova PR, Kasymov V, Christie I, Sheikhabaei S, Turovsky E, Marina N, Korsak A, Zwicker J, Teschemacher AG, Ackland GL, Funk GD, Kasparov S, Abramov AY, Gourine AV. Functional Oxygen Sensitivity of Astrocytes. *J Neurosci*. 2015; 35(29):10460-73.

²International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals [2011 July 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

Aston-Jones G, Chen S, Zhu Y, Oshinsky ML. A neural circuit for circadian regulation of arousal. *Nat Neurosci.* 2001; 4(7):732-8.

Basting TM, Burke PG, Kanbar R, Viar KE, Stornetta DS, Stornetta RL, Guyenet PG. Hypoxia silences retrotrapezoid nucleus respiratory chemoreceptors via alkalosis. *J Neurosci.* 2015; 35(2):527-43.

Biancardi V, da Silva LT, Bícago KC, Gargaglioni LH. Role of locus coeruleus noradrenergic neurons in cardiorespiratory and thermal control during hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol.* 2010; 170(2):150-6.

Biancardi V, Bícago KC, Almeida MC, Gargaglioni LH. Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO₂ drive to breathing. *Pflugers Arch.* 2008; 455(6):1119-28.

Bruinstroop E, Cano G, Vanderhorst VG, Cavalcante JC, Wirth J, Sena-Esteves M, Saper CB. Spinal projections of the A5, A6 (locus coeruleus), and A7 noradrenergic cell groups in rats. *J Comp Neurol.* 2012; 520(9):1985-2001.

Burke PGR, Abbott SBG, Coates MB, Viar KE, Stornetta RL, Guyenet PG. Optogenetic Stimulation of Adrenergic C1 Neurons Causes Sleep State-Dependent Cardiorespiratory Stimulation and Arousal with Sighs in Rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014; 190(11): 1301–10.

Card JP, Kobiler O, Ludmir EB, Desai V, Sved AF, Enquist LW. A dual infection pseudorabies virus conditional reporter approach to identify projections to collateralized neurons in complex neural circuits. *PLoS One.* 2011;6(6):e21141.

Card JP, Sved JC, Craig B, Raizada M, Vazquez J, Sved AF. Efferent projections of rat rostroventrolateral medulla C1 catecholamine neurons: Implications for the central control of cardiovascular regulation. *J Comp Neurol.* 2006; 499: 840–59.

Ceroni A, Chaar LJ, Bombein RL, Michelini LC. Chronic absence of baroreceptor inputs prevents training-induced cardiovascular adjustments in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Exp Physiol.* 2009; 94(6):630-40.

Chamberlin NL, Saper CB. A brainstem network mediating apneic reflexes in the rat. *J Neurosci.* 1998; 18(15):6048-56.

Chamberlin NL, Saper CB. Topographic organization of respiratory responses to glutamate microstimulation of the parabrachial nucleus in the rat. *J Neurosci.* 1994 ;14(11 Pt 1):6500-10.

Chamberlin NL. Functional organization of the parabrachial complex and intertrigeminal region in the control of breathing. *Respir Physiol Neurobiol.* 2004; 143(2-3):115-25.

Chitravanshi VC, Sapru HN. Chemoreceptor-sensitive neurons in commissural subnucleus of nucleus tractus solitarius of the rat. *American Journal of Physiology.* 1995; 268: R851-8.

Coles SK, Dick TE. Neurones in the ventrolateral pons are required for post-hypoxic frequency decline in rats. *J Physiol.* 1996; 497(Pt 1): 79-94.

Colombari E, Menani JV, Talman WT. Commissural NTS contributes to pressor responses to glutamate injected into the medial NTS of awake rats. *Am J Physiol*. 1996; 270(6 Pt 2): R1220-5.

Comer AM, Qi J, Christie DL, Gibbons HM, Lipski J. Noradrenaline transporter expression in the pons and medulla oblongata of the rat: localisation to noradrenergic and some C1 adrenergic neurones. *Mol Brain Res*. 1998; 62: 65-76.

Connelly CA, Ellenberger HH, Feldman JL. Are there serotonergic projections from raphe and retrotrapezoid nuclei to the ventral respiratory group in the rat? *Neurosci. Lett*. 1989; 105:34-40.

Connelly CA, Ellenberger HH, Feldman JL. Respiratory activity in retrotrapezoid nucleus in cat. *Am. J. Physiol*. 1990; 258: L33-44.

Damasceno RS, Takakura AC, Moreira TS. Regulation of the chemosensory control of breathing by Kölliker-Fuse neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2014; 307(1): R57-67.

Damasceno RS, Takakura AC, Moreira TS. Respiratory and sympathetic chemoreflex regulation by Kölliker-Fuse neurons in rats. *Pflugers Arch*. 2015; 467(2):231-9.

Dampney RA. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol Rev*. 1994; 74(2):323-64.

Dempsey JA, Smith CA, Blain GM, Xie A, Gong Y, Teodorescu M. Role of central/peripheral chemoreceptors and their interdependence in the pathophysiology of sleep apnea. *Adv Exp Med Biol*. 2012; 758:343-349.

DePuy SD, Stornetta RL, Bochorishvili G, Deisseroth K, Witten I, Coates M, Guyenet PG. Glutamatergic neurotransmission between the C1 neurons and the parasympathetic preganglionic neurons of the dorsal motor nucleus of the vagus. *J Neurosci*. 2013; 23;33(4):1486-97.

DiMicco JA, Samuels BC, Zaretskaia MV, Zaretsky DV. The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002; 71:469-80.

Doi A, Ramirez JM. Neuromodulation and the orchestration of the respiratory rhythm. *Respir Physiol Neurobiol*. 2008; 64(1-2):96-104.

Dutschmann M, Dick TE. Pontine mechanisms of respiratory control. *Compr Physiol*. 2012; 2(4):2443-69.

Dutschmann M, Herbert H. Pontine cholinergic mechanisms enhance trigeminally evoked respiratory suppression in the anesthetized rat. *J Appl Physiol* (1985). 1999; 87(3):1059-65.

Erickson JT, Millhorn DE. Hypoxia and electrical stimulation of the carotid sinus nerve induce Fos-like immunoreactivity within catecholaminergic and serotonergic neurons of the rat brainstem. *J Comp Neurol*. 1994; 348(2):161-82.

Feldman JL, Mitchell GS, Nattie EE. Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. *Annu Rev Neurosci.* 2003; 26:239-66.

Feldman, J. L., Del Negro, C. A. Looking for inspiration: new perspectives into the generation of respiratory rhythm. *Nature Reviews Neuroscience.* 2006; 7:232-42.

Feldman, JF, Del Negro CA, Gray PA. Understanding the rhythm of breathing: so near yet so far. *Annu Rev Physiol.* 2013; 75: 423-52.

Finley JC, Katz DM. The central organization of carotid body afferent projections to the brainstem of the rat. *Brain Res.* 1992; 572(1-2):108-16.

Garcia III AJ, Zanella S, Koch H, Doi A, Ramirez JM. Networks within networks: The neuronal control of breathing. *Prog Brain Res.* 2011; 188: 31-50.

Goodchild AK, Moon EA, Dampney RA, Howe PR. Evidence that adrenaline neurons in the rostral ventrolateral medulla have a vasopressor function. *Neurosci. Lett.* 1984; 45, 267-72.

Gray PA, Rekling JC, Bocchiaro CM, Feldman JL. Modulation of respiratory frequency by peptidergic input to rhythmogenic neurons in the preBötzinger complex. *Science* 1999; 286(5444):1566-8.

Guertzenstein PG. Blood pressure effects obtained by drugs applied to the ventral surface of the brain stem. *J Physiol.* 1973; 229: 395-408.

Guertzenstein PG; Silver A. Fall in blood pressure produced from discrete regions of the ventral surface of the medulla by glycine and lesions. *J Physiol.* 1974; 242: 489-503.

Guertzenstein PG; Silver A. Further studies on the role of a bilateral chemosensitive zone on the ventral surface of the brain stem in the maintenance of arterial blood pressure. *J Physiol.* 1973; 233: 27-8.

Guyenet PG, Bayliss DA. Neural Control of Breathing and CO₂ Homeostasis. *Neuron.* 2015; 87(5):946-61.

Guyenet PG, Haselton JR, Sun MK. Sympathoexcitatory neurons of the rostroventrolateral medulla and the origin of the sympathetic vasomotor tone. *Prog Brain Res.* 1989; 81:105-16.

Guyenet PG, Koshiya N, Huangfu D, Verberne AJ, Riley TA. Central respiratory control of A5 and A6 pontine noradrenergic neurons. *Am J Physiol.* 1993; 264(6 Pt 2): R1035-44.

Guyenet PG, Schreihofer AM, Stornetta RL. Regulation of sympathetic tone and arterial pressure by the rostral ventrolateral medulla after depletion of C1 cells in rats. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 940:259-69.

Guyenet PG, Sevigny CP, Weston MC, Stornetta RL. Neurokinin-1 receptor-expressing cells of the ventral respiratory group are functionally heterogeneous and predominantly glutamatergic. *J Neurosci.* 2002; 22(9):3806-16.

Guyenet PG, Stornetta RL, Bayliss DA. Retrotrapezoid nucleus and central chemoreception. *J Physiol.* 2008; 586(8):2043-8.

Guyenet PG, Stornetta RL, Bochorishvili G, Depuy SD, Burke PG, Abbott SB. C1 neurons: the body's EMTs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013; 305(3): R187-204.

Guyenet PG. Novel two-rhythm generator theory of breathing in mammals. *J Physiol*. 2006; 570(Pt 2):207.

Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci*. 2006; 7(5):335-46.

Guyenet, PG, Stornetta RL, Bayliss DA. Central respiratory chemoreception. *J Comp Neurol*. 2010; 518(19): 3883–906.

Haselton JR, Guyenet PG. Ascending collaterals of medullary barosensitive neurons and C1 cells in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 1990; 258: R1051-63.

Hilaire G, Viemari JC, Coulon P, Simonneau M, Bévengut M. Modulation of the respiratory rhythm generator by the pontine noradrenergic A5 and A6 groups in rodents. *Respir Physiol Neurobiol*. 2004;143(2-3):187-97.

Hirooka Y, Polson JW, Potts PD, Dampney RAL. Hypoxia-induced Fos expression in neurons projecting to the pressor region in the rostral ventrolateral medulla. *Neurosci*. 1997; 80: 1209-24.

Hokfelt T, Fuxe K, Goldstein M, Johansson O. Evidence for adrenaline neurons in the rat brain. *Acta Physiol Scand*. 1973; 89: 286-8.

Hokfelt T, Fuxe K, Goldstein M, Johansson O. Immunohistochemical evidence for the existence of adrenaline neurons in the rat brain. *Brain Res*. 1974; 66: 235-51.

Holloway BB, Stornetta RL, Bochorishvili G, Erisir A, Viar KE, Guyenet PG. Monosynaptic glutamatergic activation of locus coeruleus and other lower brainstem noradrenergic neurons by the C1 cells in mice. *J Neurosci*. 2013; 33(48):18792-805.

Holloway BB, Viar KE, Stornetta RL, Guyenet PG. The retrotrapezoid nucleus stimulates breathing by releasing glutamate in adult conscious mice. *Eur J Neurosci*. 2015, 42(6):2271-82.

Huckstepp RT, Cardoza KP, Henderson LE, Feldman JL. Role of parafacial nuclei in control of breathing in adult rats. *J Neurosci*. 2015; 21;35(3):1052-67.

Hwang DY, Carlezon WA, Jr, Isacson O, Kim KS. A high-efficiency synthetic promoter that drives transgene expression selectively in noradrenergic neurons. *Hum Gene Ther*. 2001; 12: 1731-40.

Ito S, Sved AF. Tonic glutamate-mediated control of rostral ventrolateral medulla and sympathetic vasomotor tone. *Am J Physiol*. 1997; 273(2 Pt 2): R487-94.

Johnson SM, Haxhiu MA, Richerson GB. GFP-expressing locus ceruleus neurons from Prp57 transgenic mice exhibit CO₂/H⁺ responses in primary cell culture. *J Appl Physiol* (1985). 2008, 105(4):1301-11.

Kanbar R, Depuy SD, West GH, Stornetta RL, Guyenet PG. Regulation of visceral sympathetic tone by A5 noradrenergic neurons in rodents. *J Physiol*. 2011; 589(Pt 4):903-17.

Kanbar R, Stornetta RL, Cash DR, Lewis SJ, Guyenet PG. Photostimulation of Phox2b medullary neurons activates cardiorespiratory function in conscious rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010; 182:1184-94.

Kang JJ, Liang WH, Lam CS, Huang XF, Yang SJ, Wong-Riley MT, Fung ML, Liu YY. Catecholaminergic neurons in synaptic connections with pre-Bötzinger complex neurons in the rostral ventrolateral medulla in normoxic and daily acute intermittent hypoxic rats. *Exp Neurol*. 2017; 287(Pt 2):165-75.

King TL, Ruyle BC, Kline DD, Heesch CM, Hasser EM. Catecholaminergic neurons projecting to the paraventricular nucleus of the hypothalamus are essential for cardiorespiratory adjustments to hypoxia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2015; 309(7): R721-31.

Koshiya N, Huangfu D, Guyenet PG. Ventrolateral medulla and sympathetic chemoreflex in the rat. *Brain Res*. 1993; 609(1-2):174-84.

Koshiya, N, Guyenet PG. Tonic sympathetic chemoreflex after blockade of respiratory rhythmogenesis in the rat. *J Physiol*. 1996; 491(Pt 3): 859–69.

Kuwaki T. Hypothalamic modulation of breathing. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2010; 669:243-7.

Lazarenko RM, Milner TA, Depuy SD, Stornetta RL, West GH, Kievits JA, Bayliss DA, Guyenet PG. Acid sensitivity and ultrastructure of the retrotrapezoid nucleus in Phox2b-EGFP transgenic mice. *J Comp Neurol*. 2009; 517:69–86.

Li A, Nattie E. Catecholamine neurones in rats modulate sleep, breathing, central chemoreception and breathing variability. *J Physiol*. 2006; 570(Pt 2):385-96.

Lieske SP, Thoby-Brisson M, Telgkamp P, Ramirez JM. Reconfiguration of the neural network controlling multiple breathing patterns: eupnea, sighs and gasps [see comment]. *Nat Neurosci*. 2000; 3(6):600-7.

Loewy AD, Wallach JH, McKellar S. Efferent connections of the ventral medulla oblongata in the rat. *Brain Res*. 1981; 228(1):63-80.

Machado BH, Bonagamba LG. Microinjection of S-nitrosocysteine into the nucleus tractus solitarii of conscious rats decreases arterial pressure but L-glutamate does not. *Eur J Pharmacol*. 1992; 221(1):179-82.

Madden CJ, Ito S, Rinaman L, Wiley RG, Sved AF. Lesions of the C1 catecholaminergic neurons of the ventrolateral medulla in rats using anti-DbetaH-saporin. *Am J Physiol*. 1999; 277(4 Pt 2): R1063-75.

Madden CJ, Sved AF. Cardiovascular regulation after destruction of the C1 cell group of the rostral ventrolateral medulla in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 285(6):H2734-48.

Malheiros-Lima MR, Takakura AC, Moreira TS. Depletion of rostral ventrolateral medullary catecholaminergic neurons impairs the hypoxic ventilatory response in conscious rats. *Neuroscience*. 2017; 351:1-14.

Marina N, Ang R, Machhada A, Kasymov V, Karagiannis A, Hosford PS, Mosienko V, Teschemacher AG, Vihko P, Paton JFR, Kasparov S, Gourine AV. Brainstem Hypoxia

Contributes to the Development of Hypertension in the Spontaneously Hypertensive Rat. Hypertension. 2015; 65(4): 775-83.

Marina N, Abdala AP, Korsak A, Simms AE, Allen AM, Paton JF, Gourine AV. Control of sympathetic vasomotor tone by catecholaminergic C1 neurones of the rostral ventrolateral medulla oblongata. Cardiovasc Res. 2011; 91: 703-10.

McKay LC, Feldman JL. Unilateral ablation of pre-Botzinger complex disrupts breathing during sleep but not wakefulness. Am J Respir Crit Care Med. 2009; 178(1):89-95.

Menuet C, Sevigny CP, Connelly AA, Bassi JK, Jancovski N, Williams DA, Anderson CR, Llewellyn-Smith IJ, Fong AY, Allen AM. Catecholaminergic C3 neurons are sympathoexcitatory and involved in glucose homeostasis. J Neurosci. 2014; 34(45):15110-22.

Menuet C, Le S, Dempsey B, Connelly AA, Kamar JL, Jancovski N, Bassi JK, Walters K, Simms AE, Hammond A, Fong AY, Goodchild AK, McMullan S, Allen AM. Excessive Respiratory Modulation of Blood Pressure Triggers Hypertension. Cell Metab. 2017;25(3):739-48.

Millhorn DE, Eldridge FL. Role of ventrolateral medulla in regulation of respiratory and cardiovascular systems. J Appl Physiol (1985). 1986; 61(4):1249-63.

Milner TA, Morrison SF, Abate C, Reis DJ. Phenylethanolamine N-methyltransferase-containing terminals synapse directly on sympathetic preganglionic neurons in the rat. Brain Res. 1988; 448:205-22.

Milner TA, Pickel VM, Park DH, Joh TH, Reis DJ. Phenylethanolamine N-methyltransferase-containing neurons in the rostral ventrolateral medulla of the rat. I. Normal Ultrastructure. Brain Res. 1987; 411:28–45.

Minson J, Llewellyn-Smith I, Neville A, Somogyi P, Chalmers J. Quantitative analysis of spinally projecting adrenaline- synthesising neurons of C1, C2 and C3 groups in rat medulla oblongata. J Auton Nerv Syst. 1990; 30:209–20.

Moraes DJ, Bonagamba LG, Zoccal DB, Machado BH. 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. 2011; 300(6):R1476-86.

Moraes DJ, da Silva MP, Bonagamba LG, Mecawi AS, Zoccal DB, Antunes-Rodrigues J, Varanda WA, Machado BH. Electrophysiological properties of rostral ventrolateral medulla presympathetic neurons modulated by the respiratory network in rats. J Neurosci. 2013; 33(49):19223-37.

Moreira TS, Sato MA, Takakura AC, Menani JV, Colombari E. Role of pressor mechanisms from the NTS and CVLM in control of arterial pressure. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2005; 289(5):R1416-25.

Moreira TS, Takakura AC, Colombari E, Guyenet PG. Central chemoreceptors and sympathetic vasomotor outflow. J Physiol (Lond). 2006; 577: 369-86.

Moreira TS, Takakura AC, Colombari E, West GH, Guyenet PG. Inhibitory input from slowly adapting lung stretch receptors to retrotrapezoid nucleus chemoreceptors. *J Physiol.* 2007; 580(Pt 1):285-300.

Morrison SF, Callaway J, Milner TA, Reis DJ. RVLM: A source of the glutamatergic innervation of the sympathetic IML nucleus. *Brain Res.* 1991; 562, 126-35.

Morrison SF, Reis DJ. Responses of sympathetic preganglionic neurons to rostral ventrolateral medullary stimulation. *Am J Physiol.* 1991; 261(5 Pt 2):R1247-56.

Mulkey DK, Stornetta RL, Weston MC, Simmons JR, Parker A, Bayliss DA, Guyenet PG. Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. *Nat. Neurosci.* 2004; 7:1360-69.

Nattie G, Li A. Multiple central chemoreceptor sites: cell types and function in vivo. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008; 605:343-47.

Nattie E, Li A. Central chemoreception in wakefulness and sleep: evidence for a distributed network and a role for orexin. *J Appl Physiol (1985).* 2010, 108(5):1417-24.

Nurse CA. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms at peripheral arterial chemoreceptors. *Exp Physiol.* 2010; 95(6):657-67.

Pagliardini S, Janczewski WA, Tan W, Dickson CT, Deisseroth K, Feldman JL. Active Expiration Induced by Excitation of Ventral Medulla in Adult Anesthetized Rats. *J Neurosci.* 2011; 31(8): 2895-905.

Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5th ed. San Diego: Academic Press, 2005.

Phillips JK, Goodchild AK, Dubey R, Sesiashvili E, Takeda M, Chalmers J, Pilowsky PM, Lipski J. Differential expression of catecholamine biosynthetic enzymes in the rat ventrolateral medulla. *J Comp Neurol.* 2001; 432: 20-34.

Pilowsky PM, Jiang C, Lipski J. An intracellular study of respiratory neurons in the rostral ventrolateral medulla of the rat and their relationship to catecholamine-containing neurons. *J Comp Neurol.* 1990; 301(4):604-17.

Prabhakar NR, Semenza GL. Oxygen Sensing and Homeostasis. *Physiology (Bethesda).* 2015; 30(5):340-8.

Qureshi M, Khalil M, Kwiatkowski K, Alvaro RE. Morphology of sighs and their role in the control of breathing in preterm infants, term infants and adults. *Neonatology.* 2009; 96(1):43-9.

Ramirez JM, Viemari JC. Determinants of inspiratory activity. *RespirPhysiolNeurobiol.* 2005; 28;147(2-3):145-57.

Reis DJ, Granata AR, Joh TH, Ross CA, Ruggiero DA, Park DH. Brain stem catecholamine mechanisms in tonic and reflex control of blood pressure. *Hypertension.* 1984; 6(5 Pt 2):II7-15.

Reis DJ, Ross CA, Ruggiero DA, Granata AR, Joh TH. Role of adrenaline neurons of ventrolateral medulla (the C1 group) in the tonic and phasic control of arterial pressure. *Clin Exp Hypertens A*. 1984; 6(1-2):221-41.

Richerson GB. Serotonergic neurons as carbon dioxide sensors that maintain pH homeostasis. *Nat Rev Neurosci*. 2004; 5(6):449-61.

Rosin DL, Chang DA, Guyenet PG. Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus. *J. Comp. Neurol*. 2006; 499:64-89.

Ross CA, Ruggiero DA, Joh TH, Park DH, Reis DJ. Adrenaline synthesizing neurons in the rostral ventrolateral medulla: a possible role in tonic vasomotor control. *Brain Res*. 1983; 273(2):356-61.

Ross CA, Ruggiero DA, Joh TH, Park DH, Reis DJ. Rostral ventrolateral medulla: selective projections to the thoracic autonomic cell column from the region containing C1 adrenaline neurons. *J Comp Neurol*. 1984; 228(2):168-85.

Ross CA, Ruggiero DA, Park DH, Joh TH, Sved AF, Fernandez-Pardal J, Saavedra JM, Reis DJ. Tonic vasomotor control by the rostral ventrolateral medulla: effect of electrical or chemical stimulation of the area containing C1 adrenaline neurons on arterial pressure, heart rate, and plasma catecholamines and vasopressin. *J Neurosci*. 1984; 4: 474-94.

Ross, C. A., D. A. Ruggiero, D. J. Reis. Afferent projections to cardiovascular portions of the tractus solitarius in the rat. *Brain Res*. 1981, 223: 402-408.

Sapru HN. Carotid chemoreflex. Neural pathways and transmitters. *Adv Exp Med Biol*. 1996; 410:357-64.

Schlenker EH, Prestbo A. Elimination of the post-hypoxic frequency decline in conscious rats lesioned in pontine A5 region. *Respir Physiol Neurobiol*. 2003;138(2-3):179-91.

Schreihöfer AM, Guyenet PG. Baroactivated neurons with pulse-modulated activity in the rat caudal ventrolateral medulla express GAD67 mRNA. *J Neurophysiol*. 2003; 89: 1265-77.

Schreihöfer AM, Guyenet PG. Sympathetic reflexes after depletion of bulbospinal catecholaminergic neurons with anti-D β H-saporin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000;279: R729-42.

Schreihöfer AM, Stornetta RL, Guyenet PG. Evidence for glycinergic respiratory neurons: Bötzing neurons express mRNA for glycinergic transporter 2. *J Comp Neurol*. 1999; 407: 583-97.

Schreihöfer AM, Stornetta RL, Guyenet PG. Regulation of sympathetic tone and arterial pressure by rostral ventrolateral medulla after depletion of C1 cells in rat. *J Physiol*. 2000; 529: 221-36.

Schreihöfer AM, Guyenet PG. Identification of C1 presympathetic neurons in rat rostral ventrolateral medulla by juxtacellular labeling in vivo. *J Comp Neurol*. 1997, 387(4):524-36.

Sevigny CP, Bassi J, Williams DA, Anderson CR, Thomas WG, Allen AM. Efferent projections of C3 adrenergic neurons in the rat central nervous system. *J Comp Neurol.* 2012; 520:2352-68.

Smith JC, Abdala APL, Borgmann A, Rybak IA, Paton JFR. Brainstem respiratory networks: building blocks and microcircuits. *Trends Neurosci.* 2013; 36(3): 152-62.

Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW, Feldman JL. Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science.* 1991; 254(5032):726-9.

Spyer, MK, and Alexander V. Gourine. Chemosensory pathways in the brainstem controlling cardiorespiratory activity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2009; 364(1529): 2603-10.

St-John WM. Neurogenesis of patterns of automatic ventilatory activity. *Prog Neurobiol.* 1998; 56(1):97-117.

Stornetta RL. Neurochemistry of bulbospinal presympathetic neurons of the medulla oblongata. *J Chem Neuroanat.* 2009, 38(3):222-30.

Stornetta RL, Akey PJ, Guyenet PG. Location and electrophysiological characterization of rostral medullary adrenergic neurons that contain neuropeptide Y mRNA in rat. *J Comp Neurol.* 1999; 415: 482–500.

Stornetta RL, Guyenet PG. Distribution of glutamic acid decarboxylase mRNA-containing neurons in rat medulla projecting to thoracic spinal cord in relation to monoaminergic brainstem neurons. *J Comp Neurol.* 1999; 407: 367-80.

Stornetta RL, Inglis MA, Viar KE, Guyenet PG. Afferent and efferent connections of C1 cells with spinal cord or hypothalamic projections in mice. *Brain Struct Funct.* 2016; 221(8):4027-44.

Stornetta RL, Moreira TS, Takakura AC, Kang BJ, Chang DA, West GH, Brunet JF, Mulkey DK, Bayliss DA, Guyenet PG. Expression of *Phox2b* by brainstem neurons involved in chemosensory integration in the adult rat. *J Neurosci.* 2006; 26(40):10305-14.

Stornetta RL, Rosin DL, Wang H, Sevigny CP, Weston MC, Guyenet PG. A group of glutamatergic interneurons expressing high levels of both neurokinin-1 receptors and somatostatin identifies the region of the pre-Bötzinger complex. *J Comp Neurol.* 2003; 455(4):499-512.

Stornetta RL, Sevigny CP, Schreihofer AM, Rosin DL, Guyenet PG. Vesicular glutamate transporter DNPI/GLUT2 is expressed by both C1 adrenergic and nonaminergic presympathetic vasomotor neurons of the rat medulla. *J Comp Neurol.* 2002, 444: 207-20.

Sun MK, Reis DJ. Excitatory amino acid-mediated chemoreflex excitation of respiratory neurones in rostral ventrolateral medulla in rats. *J Physiol.* 1996; 492 (Pt 2):559-71.

Sun MK. Pharmacology of reticulospinal vasomotor neurons in cardiovascular regulation. *Pharmacol Rev.* 1996; 48(4):465-94.

Takakura AC, Colombari E, Menani JV, Moreira TS. Ventrolateral medulla mechanisms involved in cardiorespiratory responses to central chemoreceptor activation in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011; 300(2):R501-10.

Takakura AC, Moreira TS, Colombari E, West GH, Stornetta RL, Guyenet PG. Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats. *J Physiol*. 2006; 572: 503-23.

Taxini CL, Takakura AC, Gargaglioni LH, Moreira TS. Control of the central chemoreflex by A5 noradrenergic neurons in rats. *Neuroscience*. 2011; 199:177-86.

Taxini CL, Moreira TS, Takakura AC, Bícigo KC, Gargaglioni LH, Zoccal DB. Role of A5 noradrenergic neurons in the chemoreflex control of respiratory and sympathetic activities in unanesthetized conditions. *Neuroscience*. 2017; 354:146-57.

Teppema LJ, Veening JG, Kranenburg A, Dahan A, Berkenbosch A, Olivier C. Expression of c-fos in the rat brainstem after exposure to hypoxia and to normoxic and hyperoxic hypercapnia. *J Comp Neurol*. 1997; 388:169-90.

Tupal S, Huang WH, Picardo MC, Ling GY, Del Negro CA, Zoghbi HY, Gray PA. Atoh1-dependent rhombic lip neurons are required for temporal delay between independent respiratory oscillators in embryonic mice. *Elife*. 2014; 3:e02265.

Viemari JC, Bévengut M, Burnet H, Coulon P, Pequignot JM, Tiveron MC, Hilaire G. Phox2a gene, A6 neurons, and noradrenaline are essential for development of normal respiratory rhythm in mice. *J Neurosci*. 2004; 24(4):928-37.

Viemari JC, Bévengut M, Coulon P, Hilaire G. Nasal trigeminal inputs release the A5 inhibition received by the respiratory rhythm generator of the mouse neonate. *J Neurophysiol*. 2004; 91(2):746-58.

Viemari JC, Garcia AJ, Doi A, Elsen G, Ramirez JM. β -Noradrenergic receptor activation specifically modulates the generation of sighs in vivo and in vitro. *Front Neural Circuits*. 2013; 7:179.

Viemari JC, Ramirez JM. Norepinephrine differentially modulates different types of respiratory pacemaker and nonpacemaker neurons. *J Neurophysiol*. 2006; 95(4):2070-82.

Wenker IC, Sobrinho CR, Takakura AC, Mulkey DK, Moreira TS. P2Y₁-receptors expressed by C1 neurons determine peripheral chemoreceptor modulation of breathing, sympathetic activity and blood pressure. *Hypertension*. 2013 Aug; 62(2): 263-73.

Wenker IC, Abe C, Viar KE, Stornetta DS, Stornetta RL, Guyenet PG. Blood pressure regulation by the rostral ventrolateral medulla in conscious rats: effects of hypoxia, hypercapnia, baroreceptor denervation and anesthesia. *J Neurosci*. 2017; 37(17):4565-83.

Willette RN, Barcas PP, Krieger AJ, Sapru HN. Vasopressor and depressor areas in the rat medulla. Identification by microinjection of l-glutamate. *Neuropharmacology*. 1983; 22: 1071-79.

Zanella S, Doi A, Garcia AJ 3rd, Elsen F, Kirsch S, Wei AD, Ramirez JM. When Norepinephrine Becomes a Driver of Breathing Irregularities: How Intermittent Hypoxia

Fundamentally Alters the Modulatory Response of the Respiratory Network. *J Neurosci*. 2014; 34(1): 36-50.

Zanella S, Roux JC, Viemari JC, Hilaire G. Possible modulation of the mouse respiratory rhythm generator by A1/C1 neurones. *Respir Physiol Neurobiol*. 2006; 153(2):126-38.