

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA

KAROLYNE SILVA MAGALHÃES

Neurônios da Região parafacial lateral: características eletrofisiológicas, geração da expiração ativa e modulação da atividade simpática e função cardiovascular

Ribeirão Preto

2023

KAROLYNE SILVA MAGALHÃES

Neurônios da Região parafacial lateral: características eletrofisiológicas, geração da expiração ativa e modulação da atividade simpática e função cardiovascular

Versão original

Tese de Doutorado 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 Doutora em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

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

Ribeirão Preto

2023

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

Neurônios da Região parafacial lateral: características eletrofisiológicas, geração da expiração ativa e modulação da atividade simpática e função cardiovascular. Ribeirão Preto – São Paulo, 2023. 217 f.

Tese (Doutorado em Ciências – Área de concentração: Fisiologia) – Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2023.

Orientador: Moraes, Davi J. A.

Versão original

1. Região parafacial lateral, 2. Inibição sináptica, 3. Propriedades eletrofisiológicas intrínsecas, 4. Condutâncias subliminares, 5. Hipercapnia/acidose, 6. Acoplamento simpático-respiratório, 7. Expiração ativa, 8. Função vascular.

FOLHA DE APROVAÇÃO

MAGALHÃES, K. S. **Neurônios da Região parafacial lateral: características eletrofisiológicas, geração da expiração ativa e modulação da atividade simpática e função cardiovascular.** 2023. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2023.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Após 5 anos de dedicação, dou início ao encerramento do meu Doutorado com a escrita desta Tese. Muitas pessoas me acompanharam nesta caminhada e eu não poderia deixar de agradecê-las pelo suporte neste período tão importante.

Agradeço à minha mãe, Regina, que sempre me apoiou e admirou incansavelmente. Eu não teria chegado até aqui sem o seu suporte e admiração. Nos momentos de dúvida e cansaço, me mantive firme por saber que minha fã número 1 estava torcendo pelo meu sucesso.

À minha esposa, Amanda, por ser o maior prêmio que recebi durante a Pós-Graduação. A trajetória que percorri, principalmente durante o meu Doutorado, não teria sido a mesma sem o seu afeto e a sua ajuda, direta e indiretamente. Eu aprendi muito com você sobre como ser uma pesquisadora melhor. Foi um privilégio ter a minha fã número 2 trabalhando comigo e me apoiando durante essa trajetória.

Aos meus familiares que me admiram e incentivam desde sempre. Em especial ao meu pai, Henry, e ao meu irmão, Henry Jr.

Às minhas irmãs de vida, Gabriela e Juliana, que de longe trilharam esse caminho comigo e nunca soltaram a minha mão, mesmo com a minha ausência.

Ao meu orientador, o professor Davi Moraes, por me receber em seu laboratório, por confiar na minha capacidade e por me dar a oportunidade de desenvolver este trabalho. Foram muitos frutos colhidos ao longo dos anos de parceria e, por mais que eu que tenha me dedicado, eu não teria conseguido sem a sua orientação.

Aos colegas de laboratório que fizeram parte dessa história e contribuíram direta ou indiretamente para a construção do meu conhecimento e, conseqüentemente, desta Tese: Alan, Pedro, Luciana, Júlia, Daniel, Viviane, Nilton, Karla, Nathália, Juliana, Sara, Enrico, Renato e Mariulza. Agradeço ainda a minha amiga Karoline e a Professora Melina da Silva pela colaboração e apoio desde sempre.

Agradeço às amigas que construí no Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da FMRP-USP, que foram muitas! Não vou arriscar tentar nomear todos e esquecer alguém... mas quem é, sabe! Vocês foram como uma família nos últimos anos. Jamais esquecerei que nunca estive sozinha.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da FMRP-USP, bem como aos funcionários do Departamento de Fisiologia pelo suporte durante o meu Doutorado. Agradeço especialmente ao professor Benedito Machado, e aos membros do seu laboratório, por oferecer espaço e contribuir com seu conhecimento para realização deste trabalho e ao professor Norberto Cairasco por sua assessoria e acompanhamento durante o meu Doutorado.

Ao professor Julian Paton, por me receber em seu laboratório na Universidade de Auckland - Nova Zelândia, bem como aos doutores Audrys Pauza e Igor Felipe, que juntos, contribuíram exponencialmente para o crescimento da minha vida pessoal e profissional durante o desenvolvimento do meu Estágio de Pesquisa no Exterior.

Por fim, me permito agradecer a mim mesma, por ter me mantido firme e confiante mesmo com as dificuldades. Agradeço especialmente à Karol de dez anos atrás por um dia ter sonhado um sonho que parecia inalcançável, mas que hoje se torna realidade.

Apoio financeiro:

Processo nº 2019/24060-9, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

O presente estudo foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001.

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo I: Considerações iniciais

| | |
|---|----|
| Figura 1. Padrão respiratório de ratos e os núcleos respiratórios do tronco encefálico | 23 |
|---|----|

Capítulo II: Características eletrofisiológicas e moleculares dos neurônios expiratórios da região parafacial lateral

| | |
|--|----|
| Figura 1. Localização e fenótipo dos neurônios expiratórios da região pFL | 46 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| Figura 2. Projeções dos neurônios expiratórios da região pFL para o cVRG | 48 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| Figura 3. Trajetória do potencial de membrana dos neurônios expiratórios da região pFL durante normocapnia e hipercapnia | 50 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| Figura 4. Transmissão sináptica inibitória e excitatória ao longo do ciclo respiratório para os neurônios expiratórios da região pFL durante normocapnia e hipercapnia .. | 52 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| Figura 5. Propriedades eletrofisiológicas intrínsecas dos neurônios expiratórios da região pFL | 54 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| Figura 6. Canais HCN e para Ca^{2+} LVA do tipo T dos neurônios expiratórios da região pFL | 56 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| Figura 7. Correntes de vazamento dominadas por K^+ e ausência da I_{NaP} nos neurônios expiratórios da região pFL | 59 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| Figura 8. A $[Ca^{2+}]$ intracelular é importante para a atividade expiratória dos neurônios da região pFL | 64 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| Figura 9. Ausência de sensibilidade intrínseca ao CO ₂ dos neurônios expiratórios da região pFL | 66 |
| Figura 10. Ausência de sensibilidade intrínseca ao [H ⁺] dos neurônios expiratórios da região pFL | 68 |
| Figura 11. Localização e fenótipo dos neurônios do RTN e os efeitos da hipercapnia na sua frequência de potenciais de ação | 70 |
| Figura 12. Sensibilidade intrínseca ao CO ₂ dos neurônios do RTN..... | 71 |

Capítulo III: Contribuição dos neurônios da região parafacial lateral para a modulação expiratória da atividade simpática e da função cardiovascular

| | |
|--|-----|
| Figura 1. Padrão respiratório e atividade simpática de ratos e modelo esquemático dos possíveis núcleos respiratórios e simpático do tronco encefálico envolvidos com a geração da modulação respiratória da atividade simpática..... | 91 |
| Figura 2. Transfecção dos neurônios da região pFL | 107 |
| Figura 3. Efeito da fotoestimulação na atividade dos neurônios do pFL | 109 |
| Figura 4. Efeito da fotoestimulação dos neurônios da região pFL no padrão respiratório | 111 |
| Figura 5. Efeitos da fotoestimulação dos neurônios da região pFL na atividade simpática e na amplitude das THW..... | 113 |
| Figura 6. Efeitos da fotoestimulação dos neurônios da região pFL nas diferentes fases do ciclo respiratório na AE e na atividade simpática | 115 |
| Figura 7. Efeitos da fotoestimulação dos neurônios da região pFL na atividade dos neurônios pré-simpáticos do RVLM | 117 |

| | |
|--|-----|
| Figura 8. Transfecção dos neurônios da região pFL | 119 |
| Figura 9. Respostas eletrofisiológicas ao CNO dos neurônios HM3D(Gq)-mCherry positivos da região pFL de ratos | 121 |
| Figura 10. Respostas cardiorrespiratórias à injeção de CNO em um rato que expressa o HM3D(Gq)-mCherry nos neurônios da região pFL..... | 122 |
| Figura 11. Dados agrupados das respostas respiratórias a injeção de CNO em ratos transfectados com HM3D(Gq)-mCherry nos neurônios da região pFL | 123 |
| Figura 12. Dados agrupados das respostas cardiovasculares após injeções de CNO em ratos transfectados com HM3D(Gq)-mCherry nos neurônios da região pFL..... | 124 |
| Figura 13. Ausência de respostas cardiorrespiratórias após injeção de DMSO em um rato transfectado com HM3D(Gq)-mCherry em neurônios da região pFL..... | 125 |
| Figura 14. Dados agrupados dos parâmetros respiratórios antes e após injeções de DMSO em ratos transfectados com HM3D(Gq)-mCherry nos neurônios da região pFL | 127 |
| Figura 15. Dados agrupados dos parâmetros cardiovasculares antes e após injeções de DMSO em ratos transfectados com HM3D(Gq)-mCherry nos neurônios da região pFL..... | 128 |
| Figura 16. Dados agrupados dos parâmetros cardiovasculares antes e após injeções de CNO em ratos transfectados com mCherry nos neurônios da região pFL | 130 |

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo II: Características eletrofisiológicas e moleculares dos neurônios expiratórios da região parafacial lateral

Tabela 1. Proporção da expressão dos canais HCN nos neurônios expiratórios da região pFL57

Tabela 2. Proporção da expressão dos canais para Ca^{2+} LVA do tipo T nos neurônios expiratórios da região pFL.....57

Tabela 3. Proporção da expressão dos canais de vazamento para K^+ nos neurônios expiratórios da região pFL.....61

Tabela 4. Proporção da expressão dos canais de vazamento para Na^+ e K^+ , bem como do receptor acoplado a proteína G ativado por H^+ , nos neurônios expiratórios da região pFL.....61

Tabela 5. Proporção da expressão do canal de vazamento para K^+ e do receptor acoplado a proteína G ativado por H^+ nos neurônios do RTN.....72

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------------|---|
| AAV | Vírus adeno-associado |
| AbN | Nervo abdominal |
| AE | Expiração ativa |
| AHP | Amplitude da hiperpolarização pós-potencial de ação |
| AP | Potencial de ação |
| AP5 | <i>d-2-amino-5-phosphonovalerate</i> |
| BötC | Complexo Bötzinger |
| C1 | Neurônios catecolaminérgicos C1 |
| CB | Corpúsculo carotídeo |
| Cav | Canal para Ca ²⁺ do tipo T ativado por baixa voltagem |
| CETEA | Comitê de Ética em Experimentação Animal |
| ChAT | Colina-O-acetiltransferase |
| ChR2 | <i>channelrhodopsin 2</i> |
| CIH | Hipóxia crônica intermitente |
| CNO | N-óxido de clozapina |
| CNQX | <i>6-cyano-7-nitroquinoxaline- 2,3-dione</i> |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| Ct | Ciclo do limiar |
| CTB | Subunidade B da toxina da cólera |
| cVRG | Grupo Respiratório Ventral caudal |
| DE | Duração da expiração |
| DI | Duração da inspiração |
| DiaEMG | Eletromiograma do músculo diafragma |
| DREADDs | receptores projetados para ativação exclusiva por drogas projetadas |
| E2 | Segunda fase da expiração |
| EMG | Eletromiograma |
| epF | Parafacial embrionário |
| fR | Frequência respiratória |
| Gad65 | Descarboxilase do ácido glutâmico 65 |
| Gad67 | Descarboxilase do ácido glutâmico 67 |
| g _{Leak} | Condutância de vazamento |

| | |
|------------------|---|
| Glyt2 | Transportador de glicina 2 |
| GPR4 | receptor acoplado a proteína G ativado por hidrogênio iônico |
| H ⁺ | Hidrogênio iônico |
| HCN | Canais para cátion ativados por hiperpolarização e por nucleotídeos cíclicos |
| HN | Nervo hipoglosso |
| HR | Frequência cardíaca |
| I _h | Correntes mediadas por canais para cátion ativados por hiperpolarização e por nucleotídeos cíclicos |
| I _{NaP} | corrente persistente de sódio |
| Insp | Inspiração |
| LVA | Canais para Ca ²⁺ do tipo T ativados por baixa voltagem |
| mRNA | RNA mensageiro |
| Nalcn | Canal para Na ⁺ de vazamento |
| Nmb | Neuropeptídeo neuromedina B |
| OSA | Apneia obstrutiva do sono |
| PAD | Pressão arterial diastólica |
| PAM | Pressão arterial média |
| PAP | Pressão arterial pulsátil |
| PAS | Pressão arterial sistólica |
| PBS | Salina tamponada com fosfato |
| PFA | Paraformaldeído |
| pFL | Região parafacial lateral |
| pFRG | Grupo respiratório parafacial |
| pFV | Região parafacial ventral |
| PiCo | Complexo Pós-Inspiratório |
| PIR | <i>post-inhibitory rebound</i> |
| PN | Nervo frênico |
| Post-I | Pós-inspiração |
| PP | Pressão de perfusão |
| preBötC | Complexo pré-Bötzinger |
| Pre-I | Pré-inspiração |
| qRT-PCR | Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real |

| | |
|----------------|--|
| R _i | Resistência de entrada |
| RLN | Nervo laríngeo recorrente |
| RMP | Potencial de membrana em repouso |
| RTN | Núcleo Retrotrapezóide |
| RVLM | Bulbo rostral ventrolateral |
| sEPSCs | Correntes espontâneas pós-sinápticas excitatórias |
| sIPSCs | Correntes espontâneas pós-sinápticas inibitórias |
| SLN | Nervo laríngeo superior |
| TASK | <i>Tandem of P domains in a weak inwardly-rectifying K⁺ channel</i> |
| TH | Tirosina hidroxilase |
| THW | Ondas de Traube-Hering |
| TREK1 | Twik-related K ⁺ <i>channel 1</i> |
| tSN | Nervo simpático |
| TTX | Tetrodotoxina |
| USP | Universidade de São Paulo |
| Vglut2 | Transportador vesicular para glutamato 2 |
| V _m | Potencial de membrana |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| Capítulo I - Considerações iniciais | 19 |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 21 |
| 1.1. Região parafacial lateral | 24 |
| Capítulo II - Características eletrofisiológicas e moleculares dos neurônios expiratórios da região parafacial lateral..... | 26 |
| RESUMO..... | 27 |
| ABSTRACT..... | 28 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 30 |
| 2. OBJETIVOS | 34 |
| 2.1. Objetivo geral | 34 |
| 2.2. Objetivos específicos..... | 34 |
| 3. MÉTODOS..... | 36 |
| 3.1. Animais e aprovação ética..... | 36 |
| 3.2. Marcação retrógrada dos neurônios pré-motores abdominais | 36 |
| 3.3. Preparação <i>in situ</i> de ratos..... | 37 |
| 3.3.1. Procedimentos cirúrgicos..... | 37 |
| 3.3.2. Aquisição dos dados eletrofisiológicos | 38 |
| 3.3.3. Análise dos dados..... | 40 |
| 3.4. Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR) de uma única célula | 41 |
| 3.5. Histologia..... | 42 |
| 3.6. Análises estatísticas | 43 |

| | |
|--|-----------|
| 4. RESULTADOS | 45 |
| 4.1. Localização, fenótipo e projeções dos neurônios expiratórios da região pFL... | 45 |
| 4.2. Trajetórias do potencial de membrana e transmissão sináptica para neurônios expiratórios da região pFL | 49 |
| 4.3. Propriedades eletrofisiológicas intrínsecas dos neurônios expiratórios da região pFL..... | 53 |
| 4.4. Propriedades de membrana subliminares dos neurônios expiratórios da região pFL | 55 |
| 4.5. Concentração intracelular de Ca ²⁺ e a geração da atividade expiratória nos neurônios da região pFL | 63 |
| 4.6. Ausência de sensibilidade intrínseca ao CO ₂ /[H ⁺] dos neurônios expiratórios da região pFL..... | 65 |
| | |
| 5. DISCUSSÃO..... | 74 |
| | |
| 6. CONCLUSÃO..... | 82 |
| | |
| Capítulo III - Contribuição dos neurônios da região parafacial lateral para a modulação expiratória da atividade simpática e da função cardiovascular | 83 |
| | |
| RESUMO..... | 84 |
| ABSTRACT..... | 86 |
| | |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 88 |
| | |
| 2. OBJETIVOS | 94 |
| 2.1. Objetivo geral | 94 |
| 2.2. Objetivos específicos..... | 94 |
| | |
| 3. MÉTODOS..... | 96 |
| 3.1. Animais e aprovação ética..... | 96 |
| 3.2. Vetores virais | 96 |

| | |
|--|------------|
| 3.2.1. Expressão gênica na região pFL | 97 |
| 3.3. Experimentos <i>in vitro</i> | 97 |
| 3.3.1. Procedimentos Cirúrgicos | 97 |
| 3.3.2. Aquisição dos sinais eletrofisiológicos | 98 |
| 3.3.3. Análise dos dados | 99 |
| 3.4. Experimentos <i>in situ</i> | 99 |
| 3.4.1. Procedimentos Cirúrgicos | 99 |
| 3.4.2. Aquisição dos sinais eletrofisiológicos | 100 |
| 3.4.3. Estimulação optogenética | 101 |
| 3.4.4. Análise dos dados | 101 |
| 3.4.5. Histologia e imunofluorescência | 102 |
| 3.5. Experimentos <i>in vivo</i> | 103 |
| 3.5.1. Implante dos eletrodos para registro da atividade do músculo diafragma | 103 |
| 3.5.2. Implante de cateter arterial | 103 |
| 3.5.3. Registro dos parâmetros cardiovasculares e do DiaEMG | 104 |
| 3.5.4. Análise dos dados | 104 |
| 3.5.5. Histologia e imunofluorescência | 104 |
| 3.6. Análise estatística | 105 |
| 4. RESULTADOS | 107 |
| 4.1. Experimentos <i>in situ</i> | 107 |
| 4.1.1. Transfecção de neurônios da região pFL | 107 |
| 4.1.2. Fotoestimulação dos neurônios ChR2-YFP positivos da região pFL .. | 108 |
| 4.1.3. Efeitos da fotoestimulação dos neurônios da região pFL no padrão respiratório | 110 |
| 4.1.4. Efeitos da fotoestimulação dos neurônios da região pFL na atividade simpática e na amplitude das ondas de Traube-Hering | 112 |

| | |
|--|------------|
| 4.1.5. Efeitos da fotoestimulação dos neurônios da região pFL na atividade dos neurônios pré-simpáticos C1 do RVLM | 116 |
| 4.2. Experimentos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> | 118 |
| 4.2.1. Transfecção dos neurônios da região pFL | 118 |
| 4.2.2. Efeitos do CNO nas características eletrofisiológicas dos neurônios HM3D(Gq)-mCherry positivos da região pFL..... | 120 |
| 4.2.3. Respostas cardiorrespiratórias induzidas pela ativação dos neurônios da região pFL..... | 122 |
| 4.2.4. Ausência de alterações cardiorrespiratórias após injeções de DMSO em ratos transfectados com HM3D(Gq)-mCherry nos neurônios da região pFL.. | 125 |
| 4.2.5. Ausência de alterações cardiovasculares após injeções de CNO em ratos transfectados com mCherry nos neurônios da região pFL | 129 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 132 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 138 |
| 7. REFERÊNCIAS GERAIS | 139 |
| 8. APÊNDICE | 150 |
| 8.1. Artigo publicado na revista <i>Experimental Physiology</i> (2019) | 150 |
| 8.2. Artigo publicado na revista <i>Experimental Physiology</i> (2020) | 162 |
| 8.3. Artigo publicado na revista <i>The Journal of Physiology</i> (2021) | 176 |
| 8.4. Artigo publicado na revista <i>The Journal of Physiology</i> (2021) | 192 |
| 8.5. Prêmio <i>Early Investigator Prize 2021</i> pela publicação na revista <i>The Journal of Physiology</i> | 216 |
| 9. ANEXO | 217 |
| 9.1. Certificado de aprovação do protocolo pela Comissão de Ética no Uso de Animais | 217 |

Capítulo I

Considerações iniciais

Introdução geral

1. INTRODUÇÃO GERAL

A atividade motora respiratória que ocorre momento a momento é fundamental para manutenção da vida, ocorrendo automaticamente com o objetivo de manter os níveis de oxigênio e dióxido de carbono ideais nos tecidos para o funcionamento adequado do organismo (SMITH, 2022). A geração da atividade motora respiratória depende da interação de uma rede neuronal rítmica localizada no tronco cerebral e na medula espinhal, chamada de gerador central do padrão respiratório (DEL NEGRO; FUNK; FELDMAN, 2018)

Observe na Figura 1 que o padrão respiratório eupneico de mamíferos em repouso é dividido em três fases: inspiração (Insp), pós-inspiração (post-I) e segunda fase da expiração (E2). Em condições de repouso o ciclo respiratório apresenta uma fase inspiratória ativa, a qual ocorre a contração de vários músculos respiratórios, tais como o diafragma, genioglosso e cricoaritenóideo posterior, controlados pelos nervos frênico (PN), hipoglosso (HN), laríngeo recorrente (RLN), respectivamente. A contração do diafragma provoca expansão da caixa torácica e consequente inflação dos pulmões para permitir a troca gasosa, enquanto que a contração dos dois outros músculos reduz a resistência e previne a obstrução das vias aéreas superiores durante a inspiração (BRANCATISANO; DODD; ENGEL, 1991). A fase inspiratória ativa ocorre sob o controle do oscilador inspiratório localizado no complexo preBötzinger (preBötC) (SMITH et al., 1991). Em seguida, ocorre a post-I, caracterizada pela contração dos músculos cricoaritenóideo lateral e tireoaritenóideo, controlados pelo RLN, provocando a adução parcial da glote a fim de prolongar a duração da troca gasosa por meio do controle da taxa de esvaziamento pulmonar (DUTSCHMANN et al., 2014; PATON; DUTSCHMANN, 2002). A post-I ocorre sob o controle do Grupo Respiratório Pontino (DUTSCHMANN; DICK, 2012; POON; SONG, 2014), apesar de evidências recentes, e ainda iniciais, apontarem a possível participação de neurônios localizados no Complexo Pós-Inspiratório (PiCo - (ANDERSON et al., 2016; HUFF et al., 2023).

A expiração é um processo passivo do ponto de vista da mecânica da caixa torácica, com baixa ou ausente atividade dos músculos abdominais e intercostais internos em condições basais (JENKIN; MILSOM, 2014). Com o aumento da demanda respiratória, ocorre o aumento da atividade dos músculos expiratórios, principalmente da região abdominal, e a E2 torna-se ativa – expiração ativa (AE; ABDALA et al.,

2009b; ABRAHAM et al., 2002; MORAES et al., 2012) . A AE é um mecanismo compensatório essencial para aumentar a ventilação, recrutando o volume de reserva expiratório, aumentando o volume corrente e a frequência respiratória (JENKIN; MILSOM, 2014). Embora os mecanismos envolvidos ainda estejam sob investigação, evidências suportam que um grupo de neurônios localizados na região parafacial lateral (pFL), adjacente ao núcleo motor facial, é importante para gerar o padrão motor expiratório ativo (FORTUNA et al., 2008; JANCZEWSKI et al., 2002; ONIMARU; HOMMA, 2003; PAGLIARDINI et al., 2011).

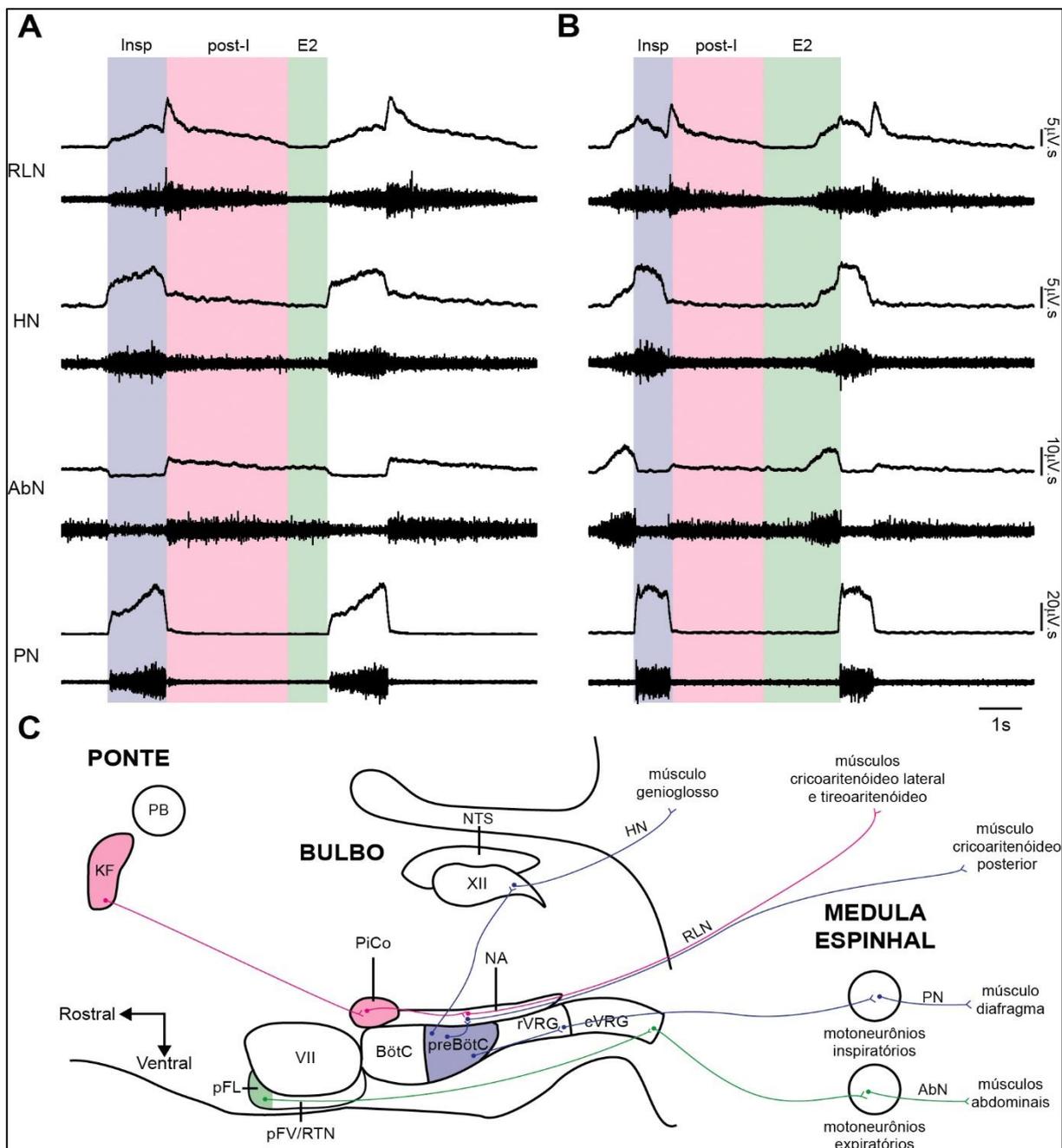


Figura 1. Padrão respiratório de ratos e os núcleos respiratórios do tronco encefálico. Registros integrados e originais da atividade do nervo laríngeo recorrente (RLN), nervo hipoglosso (HN), nervo abdominal (AbN) e nervo frênico (PN) de preparações in situ de ratos jovens em condições basais (A) e em condições de hipercapnia (B), mostrando as três fases do ciclo respiratório: inspiração (Insp, em azul), pós-inspiração (post-I, em rosa) e segunda fase da expiração (E2, em verde). Observe a presença da atividade motora elevada no final da E2 no AbN - expiração ativa (AE) - durante a hipercapnia. (C) Representação esquemática de um corte sagital do tronco encefálico de rato contendo as regiões envolvidas na geração central do padrão respiratório. Os núcleos envolvidos com a geração da Insp (Complexo preBötzinger – preBötC), post-I (Kölliker-Fuse - KF e Complexo Pós-Inspiratório – PiCo) e a AE (região parafacial lateral – pFL) estão destacados em azul, rosa e verde, respectivamente (ABDALA et al., 2009b; ANDERSON et al., 2016; DUTSCHMANN; DICK, 2012; HUFF et al., 2023; JANCZEWSKI; FELDMAN, 2006; PAGLIARDINI et al., 2011; POON; SONG, 2014; SMITH et al., 1991). BötC: Complexo Bötzingler, cVRG: Grupo respiratório ventral caudal, NA: Núcleo Ambíguo, NTS: Núcleo do Trato Solitário, PB: Núcleo Parabraquial, pFV/RTN: Região parafacial ventral/Núcleo Retrotrapezoide, rVRG: Grupo respiratório ventral rostral, VII: Núcleo motor facial, XII: Núcleo Hipoglosso.

1.1. Região parafacial lateral

Transecções caudais ao núcleo motor facial, onde localiza-se a região pFL, foram capazes de abolir a AE, mas não a inspiração, em ratos adultos anestesiados e em preparações *in situ* de ratos jovens/adultos, reforçando a hipótese de que essa região contém um oscilador expiratório acoplado ao preBötC. (ABDALA et al., 2009b; JANCZEWSKI; FELDMAN, 2006). Adicionalmente, Abdala e colaboradores (2009) investigaram a atividade neural gerada durante a expiração em ratos jovens/adultos. Esses autores observaram que neurônios da região pFL de ratos jovens/adultos eram silentes em condições basais e tornavam-se ritmicamente ativos em condições de hipercapnia somente no final da E2, simultaneamente à atividade do nervo abdominal (AbN).

A desinibição farmacológica ou fotoestimulação da região pFL de ratos jovens/adultos anestesiados em condições basais também induziu a AE, observada pelo aumento da atividade dos músculos abdominais, bem como no aumento do volume corrente (PAGLIARDINI et al., 2011). Adicionalmente, Pagliardini e colaboradores (2011) observaram atividade rítmica expiratória em neurônios da região pFL durante normocapnia somente após a desinibição farmacológica ou fotoestimulação dessa região. Com esses resultados, esses autores reforçaram a contribuição da região pFL na geração da AE e levantaram a hipótese de que a inibição sináptica da região pFL suprime a AE em condições de repouso.

Em 2017, observou-se que o bloqueio da excitação sináptica na região pFL durante condições de hipercapnia não foi capaz de abolir a AE de preparações *in situ* de ratos jovens/adultos (DE BRITTO; MORAES, 2017). Por outro lado, De Britto e Moraes (2017) observaram que a ativação dos receptores GABAérgicos e glicinérgicos dos neurônios da região pFL foi capaz de abolir a AE, e a atividade expiratória rítmica dos neurônios dessa região, evocadas pela hipercapnia. Com esses dados, esses autores sugeriram que a geração da AE em condições de hipercapnia depende da desinibição, e não da excitação glutamatérgica, da região pFL.

Ratos expostos à hipóxia crônica intermitente (CIH) por 10 dias apresentam hipertensão arterial, bem como AE simultânea ao aumento da atividade do nervo simpático (ABDALA et al., 2009a; ZOCCAL et al., 2008; ZOCCAL; PATON; MACHADO, 2009). Adicionalmente, neurônios expiratórios da região pFL de

preparações *in situ* de ratos jovens/adultos expostos à CIH apresentam atividade rítmica expiratória em condições de normocapnia associada à AE e atividade expiratória do nervo simpático (MACHADO; ZOCCAL; MORAES, 2017; MORAES; ZOCCAL; MACHADO, 2012c). De maneira similar, a ativação aguda dos quimiorreceptores periféricos é capaz de recrutar neurônios expiratórios da região pFL, simultaneamente à geração da AE e aumentos da atividade simpática (MORAES et al., 2012). Moraes e colaboradores (2012) observaram que a inibição da região pFL aboliu a atividade expiratória motora evocada pelo quimiorreceptores periféricos. Neste sentido, neurônios expiratórios da região pFL também estão envolvidos na geração da AE, e na modulação da atividade simpática, em condições de hipóxia.

Apesar desses achados, ainda não é totalmente estabelecido quais os mecanismos eletrofisiológicos envolvidos na geração da atividade expiratória desses neurônios. Além disso, não se sabe se esses neurônios respondem à hipercapnia por serem intrinsecamente sensíveis à CO_2/H^+ . Por fim, o conhecimento a respeito de como esses neurônios podem modular a função autonômica simpática e a função cardiovascular também não é totalmente estabelecida. Dessa forma, essa Tese justifica-se na importância de investigar o fenótipo, as conexões e os mecanismos celulares relacionados a geração da atividade expiratória pelos neurônios da região pFL, bem como, se eles possuem propriedades intrínsecas de *burst* e sensibilidade ao $\text{CO}_2/[\text{H}^+]$ e a sua contribuição na modulação da função autonômica simpática e função cardiovascular de ratos.

Capítulo II

Características eletrofisiológicas e moleculares dos neurônios
expiratórios da região parafacial lateral

RESUMO

MAGALHÃES, Karolyne Silva. **Neurônios da Região parafacial lateral: características eletrofisiológicas, geração da expiração ativa e modulação da atividade simpática e função cardiovascular.** Capítulo II: Características eletrofisiológicas e moleculares dos neurônios expiratórios da região parafacial lateral. 217 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2023.

A expiração ativa (AE) é essencial para aumentar a ventilação pulmonar durante aumento da demanda respiratória (hipercapnia). Uma série de estudos demonstraram que a região parafacial lateral (pFL), que contém neurônios expiratórios, controla a atividade dos músculos abdominais durante a AE em resposta à hipercapnia. Entretanto, as propriedades eletrofisiológicas e os mecanismos sinápticos que determinam a atividade dos neurônios expiratórios da região pFL, bem como as condições específicas para sua atividade não são totalmente compreendidas. Utilizando técnicas de *whole-cell patch clamp* e qRT-PCR de uma única célula, nós descrevemos as propriedades eletrofisiológicas intrínsecas, o fenótipo e a transmissão sináptica relacionadas a respiração em neurônios expiratórios da região pFL, bem como os mecanismos para a expressão da sua atividade expiratória em condições de AE induzida por hipercapnia, em preparações *in situ* de ratos jovens. Nós também avaliamos se esses neurônios possuem sensibilidade intrínseca ao $\text{CO}_2/[\text{H}^+]$ e propriedades intrínsecas de geração de burst. A inibição GABAérgica e glicinérgica durante a inspiração e expiração suprimem a atividade dos neurônios glutamatérgicos expiratórios da região pFL em normocapnia. Em hipercapnia, esses neurônios escapam da inibição glicinérgica e geram *bursts* no final da expiração. Apresentamos evidências da contribuição do rebote pós-inibitório, da isoforma Cav3.2 de canais para Ca^{2+} do tipo T e da $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular. Propriedades intrínsecas de *burst*, mediadas por corrente persistente de Na^+ , sensibilidade ao $\text{CO}_2/[\text{H}^+]$ ou expressão de canais iônicos/receptores sensíveis ao $\text{CO}_2/[\text{H}^+]$ (TASK ou GPR4) não foram observados. Por outro lado, correntes mediadas pelos canais ativados por hiperpolarização ou nucleotídeo cíclico e canais de vazamento para K^+ foram registradas. A desinibição pós-sináptica e as propriedades eletrofisiológicas intrínsecas dos neurônios glutamatérgicos desempenham papéis importantes na geração de oscilações expiratórias na região pFL durante a hipercapnia em ratos.

Palavras-chaves: Região parafacial lateral. Inibição sináptica. Propriedades eletrofisiológicas intrínsecas. Condutâncias subliminares. Hipercapnia/acidose.

ABSTRACT

MAGALHÃES, Karolyne Silva. **Lateral parafacial region neurons: electrophysiological characteristics, active expiration generation and modulation of sympathetic activity and cardiovascular function.** Chapter II: Electrophysiological characteristics and molecular profile of lateral parafacial region expiratory neurons. 217 p. Thesis (Doctorate) – School of Medicine of Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2023.

Active expiration is essential to increase pulmonary ventilation during increased respiratory demand (hypercapnia). Several studies have shown that the lateral parafacial region (pFL), which contains expiratory neurons, controls the activity of the abdominal muscles during active expiration in response to hypercapnia. However, the electrophysiological properties and synaptic mechanisms that determine the activity of expiratory neurons in the pFL region, as well as the specific conditions for their activity, are not fully understood. Using whole-cell patch clamp and single-cell qRT-PCR techniques, we describe the intrinsic electrophysiological properties, phenotype and respiratory-related synaptic inputs to the expiratory neurons of the pFL region, as well as the mechanisms for the expression of their expiratory activity under conditions of hypercapnia-induced active expiration, in *in situ* preparations of young rats. We also evaluated whether these neurons have intrinsic CO₂/[H⁺] sensitivity and intrinsic burst-generating properties. GABAergic and glycinergic inhibition during inspiration and expiration suppress the activity of expiratory glutamatergic neurons in the pFL region in normocapnia. In hypercapnia, these neurons escape from glycinergic inhibition and generate bursts at the end of expiration. We present evidence of the contribution of post-inhibitory rebound, the CaV3.2 isoform of T-type Ca²⁺ channels and intracellular [Ca²⁺]. Intrinsic burst properties, mediated by persistent Na⁺ current, CO₂/[H⁺] sensitivity or expression of CO₂/[H⁺] sensitive ion channels/receptors (TASK or GPR4) were not observed. On the other hand, currents mediated by hyperpolarization-activated or cyclic nucleotide-gated channels and leak channels for K⁺ were recorded. Postsynaptic disinhibition and the intrinsic electrophysiological properties of glutamatergic neurons play important roles in the generation of expiratory oscillations in the pFL region during hypercapnia in rats.

Keywords: Lateral parafacial region. Synaptic inhibition. Intrinsic electrophysiological properties. Subliminal conductances. Hypercapnia/acidosis.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O ciclo respiratório é gerado por uma rede neuronal localizada no tronco cerebral (DEL NEGRO; FUNK; FELDMAN, 2018; SMITH, 2022). Em 1991, utilizando fatias do bulbo de ratos neonatos, Smith e colaboradores identificaram oscilações rítmicas relacionadas à inspiração (Insp). Além disso, esses autores identificaram neurônios com propriedades de marca-passo em uma região identificada como preBötC, que passou a ser considerada a fonte primária da atividade rítmica inspiratória (SMITH et al., 1991).

Outra região geradora de oscilações respiratórias na superfície ventral do bulbo foi localizada na região parafacial, próxima ao núcleo motor do facial, a qual foi inicialmente identificada em preparações do tronco cerebral-medula espinhal de camundongos no período embrionário (THOBY-BRISSON et al., 2009) e de ratos neonatos (ONIMARU; HOMMA, 2003).

Uma série de hipóteses relacionadas ao papel fisiológico dessas oscilações tem sido debatida e incluem: (i) um oscilador inspiratório em animais pré-natais (parafacial embrionário – epF) e neonatos (grupo respiratório parafacial – pFRG) (ONIMARU; HOMMA, 2003; ONIMARU; KUMAGAWA; HOMMA, 2006; THOBY-BRISSON et al., 2009), e; (ii) um gerador de ritmo expiratório independente, acoplado ao gerador de ritmo inspiratório localizado no preBötC de animais neonatos (JANCZEWSKI; FELDMAN, 2006).

O padrão de atividade dos neurônios do epF e pFRG registrados *in vitro* é pré- e pós-inspiratório, sendo ativado antes e após a Insp (ONIMARU; ARATA; HOMMA, 1995; ONIMARU; IKEDA; KAWAKAMI, 2008; ONIMARU; KUMAGAWA; HOMMA, 2006; THOBY-BRISSON et al., 2009). Esses neurônios respiratórios ritmicamente ativos são sensíveis à variações dos níveis de dióxido de carbono/hidrogênio iônico ($\text{CO}_2/[\text{H}^+]$), expressam fator de transcrição Phox2b, o qual também é encontrado em neurônios quimiorreceptores respiratórios na superfície ventral do bulbo (ONIMARU; IKEDA; KAWAKAMI, 2008) e apresentam propriedades de atividade intrínseca dependente da corrente persistente de sódio (I_{NaP}) e correntes (I_h) mediadas por canais para cátion ativados por hiperpolarização e por nucleotídeo cíclico (HCN) (THOBY-BRISSON et al., 2009). Tem sido proposto que o epF/pFRG desenvolve-se no Núcleo Retrotrapezóide (RTN) em ratos jovens e adultos, que contém uma porção de neurônios sensíveis ao $\text{CO}_2/[\text{H}^+]$ que expressam

Phox2b e são tonicamente ativos ou modulados pela respiração (GUYENET; BAYLISS, 2022). Os neurônios do pFRG e RTN expressam o transportador vesicular para glutamato (Vglut2), receptores para neurocinina-1, o neuropeptídeo neuromedina B (Nmb), mas não expressam os marcadores para neurônios catecolaminérgicos, colinérgicos, GABAérgicos e glicinérgicos (GUYENET et al., 2019; GUYENET; BAYLISS, 2015, 2022; ONIMARU; IKEDA; KAWAKAMI, 2008; SHI et al., 2017). Uma fração desses neurônios também apresenta sensores para $\text{CO}_2/[\text{H}^+]$ que incluem expressão dos canais para K^+ sensíveis à ácido *tandem of P domains in a weak inwardly-rectifying K^+ channel* (TASK) e do receptor acoplado a proteína G ativado por H^+ (GPR4) (GESTREAU et al., 2010; KUMAR et al., 2015; ONIMARU et al., 2014). Por fim, a ativação dos neurônios Phox2b do pFRG ou Phox2b/Nmb do RTN aumenta potencialmente a geração do ritmo respiratório e a ventilação pulmonar (ABBOTT et al., 2009; IKEDA et al., 2019), por meio do recrutamento da Insp e expiração ativa (AE) (SOUZA et al., 2020). Neste sentido, considerando essas características, e por estar localizado ventralmente ao núcleo motor facial, o RTN tem sido frequentemente chamado de região parafacial ventral em ratos jovens/adultos (pFV - HUCKSTEPP et al., 2015, 2016).

Por outro lado, como dito anteriormente no Capítulo I, uma série de estudos demonstraram que a região pFL recruta os músculos abdominais expiratórios durante a AE para causar a expiração forçada em ratos jovens e adultos (PISANSKI; PAGLIARDINI, 2018; TAKAKURA; MALHEIROS-LIMA; MOREIRA, 2021). A ativação ou desinibição dessa região evoca AE, sem afetar a frequência respiratória ou com pequenos efeitos na mesma (BRITTO et al., 2020; DE BRITTO; MORAES, 2017; HUCKSTEPP et al., 2016; PAGLIARDINI et al., 2011), sugerindo uma possível diferença funcional entre os neurônios do RTN/pFV e da região pFL. Apesar da presença de diferentes neurônios glutamatérgicos, GABAérgicos e glicinérgicos na região pFL (BIANCARDI et al., 2021), suas propriedades eletrofisiológicas e suas projeções no tronco cerebral permanecem pouco descritas. Estudos anteriores demonstraram que a região pFL contém uma população de neurônios que não expressa Phox2b (DE BRITTO; MORAES, 2017) e são silentes em condições de normocapnia, mas tornam-se ritmicamente ativos no final da expiração (neurônios expiratórios) e simultaneamente com a atividade abdominal durante hipercapnia, hipóxia ou desinibição local (ABDALA et al., 2009b; DE BRITTO; MORAES, 2017; MORAES et al., 2012; PAGLIARDINI et al., 2011). A inibição da região pFL elimina

tanto a atividade de neurônios expiratórios dessa região (DE BRITTO; MORAES, 2017) como a AE durante condições de hipercapnia (ABDALA et al., 2009b; HUCKSTEPP et al., 2015), sugerindo que esses neurônios desempenham um papel importante na geração da AE e que são diferentes dos neurônios do RTN. Dessa forma, este capítulo se justifica na importância de investigar o fenótipo, as conexões e os mecanismos celulares relacionados a geração da atividade expiratória pelos neurônios da região pFL, bem como, se eles possuem propriedades intrínsecas de *burst* e sensibilidade ao $\text{CO}_2/[\text{H}^+]$.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar as características eletrofisiológicas, moleculares e as projeções dos neurônios expiratórios da região pFL necessários para a geração da AE.

2.2. Objetivos específicos

- 2.2.1.** Identificar a localização, o fenótipo e projeções dos neurônios expiratórios da região pFL.
- 2.2.2.** Avaliar as trajetórias do potencial de membrana (V_m) dos neurônios expiratórios da região pFL em condições de normocapnia e hipercapnia.
- 2.2.3.** Avaliar a transmissão sináptica para neurônios expiratórios da região pFL em condições de normocapnia e hipercapnia.
- 2.2.4.** Investigar as propriedades eletrofisiológicas intrínsecas dos neurônios expiratórios da região pFL.
- 2.2.5.** Investigar as propriedades de membrana subliminares dos neurônios expiratórios da região pFL.
- 2.2.6.** Avaliar a contribuição da $[Ca^{2+}]$ intracelular na geração da atividade expiratória dos neurônios expiratórios da região pFL em condições de hipercapnia.
- 2.2.7.** Avaliar a sensibilidade intrínseca ao $CO_2/[H^+]$ dos neurônios expiratórios da região pFL.

Métodos

3. MÉTODOS

3.1. Animais e aprovação ética

Utilizamos 71 ratos Wistar (4 semanas de idade) provenientes do Serviço de Biotério do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP), Brasil. O projeto foi submetido no seu conjunto ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA – Protocolos 1/2016 e 3/2019) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP e foi aprovado. Os animais foram alojados com um ciclo de luz/escuridão de 12 h a uma temperatura constante (23 ± 2 °C) com acesso à comida de rato padrão e água *ad libitum*.

3.2. Marcação retrógrada dos neurônios pré-motores abdominais

A projeção axonal dos neurônios expiratórios da região pFL para neurônios pré-motores abdominais foi avaliada. Para marcar neurônios pré-motores abdominais no Grupo Respiratório Ventral caudal (cVRG), três ratos receberam microinjeções do traçador retrógrado da subunidade B da toxina da cólera (CTB) conjugada com Alexa-Fluor 647 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) no corno ventral (motor) da medula espinhal torácica (T10-T12) onde localizam-se os motoneurônios abdominais (DA SILVA et al., 2019; MILLER, 1987). Essas microinjeções foram realizadas em ratos de três semanas de idade, uma semana antes dos registros dos neurônios expiratórios da região pFL. Os ratos foram profundamente anestesiados com Cetamina (75 mg.kg^{-1} i.p.) e Xilazina (5 mg.kg^{-1} i.p.) (Agener União, São Paulo, SP, Brasil) e o grau de anestesia foi constantemente verificado por meio do pinçamento da cauda para análise de possíveis respostas reflexas. Utilizando técnicas assépticas, os ratos foram fixados em um aparato estereotáxico (David Kopf, Tujunga, CA, USA), e uma laminectomia foi realizada entre T10-T12 para expor a medula espinhal. Microinjeções da CTB (Picospritzer II; Parker Instruments, Hollis, NH, USA) foram realizadas unilateralmente (50 nL) $450 \mu\text{m}$ lateral à linha média e $1000\text{-}1100 \mu\text{m}$ ventral à superfície dorsal. No final do procedimento cirúrgico, os ratos foram tratados com o analgésico e antipirético Flunixinina (1 mg.kg^{-1} ; Banamine; Schering-Plow, São Paulo, SP, Brasil) e 0.1 ml de antibiótico veterinário ($1.200.0000 \text{ IU}$; Pentabiótico Veterinário; Fort Dodge, Campinas, Brasil) via injeções intramusculares.

3.3. Preparação *in situ* de ratos

3.3.1. Procedimentos cirúrgicos

Os procedimentos foram baseados na descrição original da preparação coração-tronco cerebral isolados (PATON, 1996). Os ratos foram profundamente anestesiados com isoflurano (5%; Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, São Paulo, Brasil). O grau de anestesia foi constantemente verificado por meio do pinçamento da cauda para análise de possíveis respostas reflexas. Nesse momento, os ratos foram seccionados abaixo do diafragma e a porção superior do corpo foi submergida em solução de Ringer gelada (4° C) (mM: NaCl, 125; NaHCO₃, 24; KCl, 3; CaCl₂, 2.5; MgSO₄, 1.25; KH₂PO₄, 1.25; glicose, 10). Os ratos foram descerebrados imediatamente no nível pré-colicular para torná-los insensíveis e inconscientes. A pele foi removida e a superfície ventral do tronco cerebral foi exposta para realização do registro em *whole-cell patch clamp* às cegas de neurônios expiratórios da região pFL e neurônios do RTN. Os corpúsculos carotídeos foram removidos bilateralmente para permitir a ativação exclusiva de quimiorreceptores centrais utilizando hipercapnia (veja a seguir), como previamente descrito (DE BRITTO; MORAES, 2017). Cianeto de potássio (0.05%, 50 µL i.a.; Merck, Darmstadt, Germany) foi utilizado para testar a ablação completa do quimiorreflexo periférico (ausência de ativação inspiratória). Todas as preparações foram perfundidas (bomba peristáltica; Watson-Marlow, Falmouth, UK) com solução de Ringer, que foi constantemente aerada com 5% CO₂ e 95% O₂. A hipercapnia foi realizada aumentando o CO₂ para 10% com 90% de O₂, enquanto a hipocapnia foi realizada pela redução do CO₂ para 1% com 99% de O₂ utilizando um misturador de gases (Pegas 4000; Columbus Instruments, Columbus, OH, USA) e solução de perfusão de Ringer (tamponada com HCO₃⁻). Solução de perfusão tamponada com HEPES (in mM: NaCl, 140; KCl, 3; MgCl₂, 2; CaCl₂, 2.5; HEPES, 10; glicose, 10) foi usada para induzir acidose (pH 7.1) e alcalose (pH 8.1), pela adição de HCl ou NaOH respectivamente, a qual também foi aerada constantemente. Todas as soluções continham um agente oncótico (Polietileno glicol - PEG, 1.25%, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), bloqueador neuromuscular (Brometo de vecurônio 3-4 µg/mL, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda) e foram mantidas aquecidas em 31°C, filtradas e recirculadas.

3.3.2 Aquisição dos dados eletrofisiológicos

A porção distal do PN esquerdo foi registrada usando um eletrodo bipolar de sucção (1700 amplifier; A-M Systems, Sequim, WA, USA) conectado a um micromanipulador (YOU-1; Narishige, Setagaya, Japan); sua atividade foi usada como índice para fase inspiratória. Registros em *whole-cell patch clamp* foram realizados para analisar a trajetória do (V_m), propriedades eletrofisiológicas, bem como a frequência e amplitude de correntes espontâneas pós-sinápticas excitatórias (sEPSCs) e inibitórias (sIPSCs) em neurônios expiratórios da região pFL. Registros em *whole-cell patch clamp* também foram realizados em neurônios do RTN para analisar seu potencial de membrana em repouso (RMP) e frequência de potenciais de ação. Os eletrodos (5.5-6.5 M Ω) foram preenchidos com quatro soluções de pipeta diferentes (em mM): (i) gluconato de potássio, 135; KCl, 10; MgCl₂, 1; CaCl₂, 0.3; Hepes, 10; EGTA, 1; Na-ATP, 2; Na-GTP, 0.25 para registros de eventos sinápticos excitatórios, V_m , potenciais de ação, bem como correntes de vazamento e correntes ativadas por hiperpolarização; (ii) KCl, 145; MgCl₂, 1; CaCl₂, 0.3; Hepes, 10; EGTA, 1; Na-ATP, 2; Na-GTP, 0.25 para registros de eventos sinápticos inibitórios; (iii) CsCl₂, 110; TEA, 30; CaCl₂, 2; EGTA, 5; MgCl₂, 1; Na-ATP, 2; Na-GTP, 0.25; Hepes, 10 para o registros de correntes de Ca²⁺, e; (iv) K₄-BAPTA, 30; gluconato de potássio, 20; NaCl, 10; Hepes, 10; MgCl₂, 2; sacarose, 50; Na-ATP, 2; Na-GTP, 0.25 para registros do V_m e potenciais de ação durante tamponamento do Ca²⁺ intracelular. As pipetas foram preenchidas com soluções intracelulares e biocitina 0.2% (Molecular Probes) para identificação da localização do soma dos neurônios expiratórios da região pFL e do RTN registrados. Não mais do que um neurônio em cada preparação *in situ* foi registrado/marcado por experimento. Nos experimentos envolvendo a identificação de projeções axonais dos neurônios da região pFL, a preparação foi mantida por mais três horas para permitir o transporte intracelular de biocitina para seus terminais antes da fixação (veja a seguir). Os eletrodos de registro foram posicionados na superfície ventral do bulbo usando um micromanipulador (PatchStar; Scientifica, Uckfield, UK) sobre controle visual (microscópio; Seiler, St Louis, MO, USA) utilizando pontos de referência na superfície (corpo trapezoide, artéria basilar e raízes do nervo hipoglosso). Neurônios expiratórios da região pFL foram identificados 0.3-0.5 mm caudal ao corpo trapezoide, 2.2-2.7 mm lateral à linha média e 25–600 μ m abaixo da superfície ventral, enquanto os neurônios do RTN foram identificados 0.4-0.5 mm caudal ao

corpo trapezoide, 1.6-1.8 mm lateral à linha média e 10–400 μm abaixo da superfície ventral, como descrito previamente por nós (DE BRITTO; MORAES, 2017).

Os experimentos foram realizados, nos modos *voltage* (-70 mV) e *current clamp* (Axopatch-200B; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). As sEPSCs foram isoladas pela aplicação local dos antagonistas dos receptores GABA_A e glicinérgicos picrotoxina (30 μM ; Sigma-Aldrich) e estricnina (1 μM ; Sigma-Aldrich), respectivamente. As sIPSCs GABAérgicos foram isoladas pela aplicação local de uma solução contendo estricnina, *6-cyano-7-nitroquinoxaline- 2,3-dione* (CNQX, 10 μM ; Sigma-Aldrich) e *d-2-amino-5-phosphonovalerate* (AP5, 20 μM ; Sigma-Aldrich). As sIPSCs glicinérgicos foram isoladas pela aplicação local de uma solução contendo picrotoxina, CNQX e AP5. As drogas foram aplicadas localmente utilizando um anel de pressão perfurado localizado na superfície ventral do tronco cerebral na qual a membrana pial foi removida (RICHTER et al., 1996).

Canais HCN foram ativados utilizando uma série de pulsos de voltagem hiperpolarizantes (de -70 mV para -120 mV, em incrementos de 10 mV), enquanto os canais para Ca²⁺ do tipo T ativados por baixa voltagem (LVA) foram ativados utilizando pulsos de voltagem despolarizantes (de -80mV para 30mV, em incrementos de 10 mV) na presença de tetrodotoxina (TTX; 0.5 μM ; Tocris Bioscience, Abingdon, UK), para bloquear canais para Na⁺ dependentes de voltagem, o qual foi adicionado na solução de perfusão. Correntes de vazamento foram avaliadas utilizando rampas de voltagem lentas (30 mV/s; de -20 mV para -10 mV) e isoladas farmacologicamente usando bloqueadores de canais para Ca²⁺ dependentes de voltagem (CdCl₂ - 200 μM ; Sigma-Aldrich) e canais para K⁺ dependentes de voltagem [(cloreto de amônio tetra hidratado: 10 mM; Sigma-Aldrich) (4-aminopiridina: 5 mM; Sigma-Aldrich)], bem como para canais HCN (ZD7288: 40 μM ; Tocris Bioscience) e canais para K⁺ retificadores de entrada (BaCl₂ - 200 μM ; Sigma-Aldrich). Essas drogas foram adicionadas a solução de perfusão. As propriedades eletrofisiológicas intrínsecas (veja a seguir) e a sensibilidade intrínseca ao CO₂/[H⁺], bem como os canais HCN, canais para Ca²⁺ LVA do tipo T e de vazamento foram também avaliados na presença de bloqueadores da transmissão sináptica rápida na solução de perfusão (picrotoxina, estricnina, CNQX e AP5). O riluzole (20 μM ; Tocris Bioscience) foi usado como bloqueador dos canais que medeiam a I_{NaP}, enquanto o NiCl₂ (50 μM ; Sigma-Aldrich) foi utilizado como bloqueador dos canais para Ca²⁺ LVA do tipo T e adicionados a solução de perfusão.

Todos os sinais foram amplificados, filtrados [(PN: *band-pass filter* – 300 Hz a 5 KHz) (neurônio: *low pass filter* - 2 KHz)] e adquiridos (frequência da amostragem - PN: 5 KHz; neurônio: 10 KHz) com um conversor A/D (Digidata 1440A; Molecular Devices), usando o software de aquisição pClamp (Molecular Devices).

3.3.3. Análise dos dados

Os dados foram analisados utilizando os softwares Clampfit (Molecular Devices), Mini Analysis (Synaptosoft Inc., Fort Lee, NJ, USA) e Origin (OriginLab; Northampton, MA, USA). A atividade do PN foi considerada como Insp. O tempo do intervalo entre as atividades consecutivas do PN foi considerado a fase expiratória, que foi dividida em dois seguimentos iguais: o primeiro, a pós-inspiração (post-I) e o segundo, a segunda fase da expiração (E2). As sEPSCs e sIPSCs, nas três fases do ciclo respiratório, foram analisadas para medida da sua frequência (Hz) e amplitude (pA). O Vm foi analisado nas três fases do ciclo respiratório. A relação corrente-voltagem da I_h foi determinada pela corrente medida durante o *steady-state* no final dos pulsos de voltagem hiperpolarizantes, enquanto a corrente de Ca^{2+} foi determinada no pico da corrente após o transiente capacitivo. A dependência de voltagem para ativação da corrente I_h foi obtida das correntes normalizadas e obtida pela equação: $I/I_{max} = 1 / \{1 + \exp[(V_m - V_{0.5})/k]\}$, onde $V_{0.5}$ é a voltagem na metade da condutância máxima e k é o coeficiente angular (MORAES et al., 2013). A dependência de voltagem da ativação das correntes de Ca^{2+} foi estimada pela função de Boltzmann para a relação corrente-voltagem: $I = G_{max} + (G_{min} - G_{max}) / \{1 + \exp[(V_m - V_{0.5})/k]\} (V - V_r)$, onde I representa o pico de corrente obtido em resposta a cada pulso de voltagem, G_{max} é a condutância máxima, G_{min} é a condutância mínima, V_m é a voltagem fixada, V_r é o potencial de reversão estimado, $V_{0.5}$ é o valor de voltagem que representa metade da resposta na relação corrente-voltagem e k é o coeficiente angular relacionado a dependência de voltagem do sistema (COSTA; VARANDA, 2007). A condutância de vazamento (g_{Leak}) foi calculada pela regressão na porção linear da região passiva da relação corrente-voltagem (-100 mV para -70 mV). O potencial de equilíbrio do K^+ foi obtido pela equação de *Nernst* (HILLE, 2001): $E_{K^+} = -RT/zF \cdot \ln([K]^o/[K]^i)$, o qual gerou o valor de $E_{K^+} = -92.51$ mV, para concentrações de K^+ nas soluções de registro intracelular e extracelular ($[K]^i = 145$ mM; $[K]^o = 4.25$ mM). As propriedades eletrofisiológicas medidas foram: a) frequência de potenciais de ação; b) RMP; c) resistência de

entrada (R_i); d) amplitude da hiperpolarização pós-potencial (AHP); e) largura, limiar e amplitude do potencial de ação (AP), e; f) número de potenciais de ação em resposta a injeção de corrente despolarizante (2s). A RMP foi obtida utilizando um histograma cumulativo (largura de caixa de 0.5s) de registros do V_m de 30s (PIRES DA SILVA et al., 2016). O R_i foi calculado pelo coeficiente angular da regressão obtido em resposta a diferentes níveis de correntes hiperpolarizantes (2s). A amplitude do AP foi medida pela amplitude do pico do AP em relação ao limiar do AP, enquanto a metade da largura do AP foi medida como a largura do AP na metade da voltagem máxima. A AHP foi medida pela subtração do pico da amplitude da hiperpolarização após o AP do RMP. O limiar do AP foi obtido pelo plano de fase (PIRES DA SILVA et al., 2016).

3.4. Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR) de uma única célula

A solução de pipeta contendo o material citoplasmático dos neurônios registrados foi coletada da pipeta de registro e expelida em um *ependorf* para realização do qRT-PCR. A solução foi colocada em um microtubo contendo um kit próprio (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) para transcrição reversa em um termociclador (ProFlex PCR System; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A pré-amplificação do cDNA foi realizada utilizando o kit TaqMan PreAmp Master Mix Kit (Life Technologies) utilizando as seguintes sondas: Rn00584780_m1 (Vglut2), Rn00690300_m1 (descarboxilase do ácido glutâmico 67 - Gad67), Rn00561244_m1 (descarboxilase do ácido glutâmico 65 - Gad65), Rn01475607_m1 (transportador de glicina 2 - Glyt2), Rn00562500_m1 (tirosina hidroxilase - TH), Rn01453446_m1 (colina-O-acetiltransferase - ChAT), Rn01413076_mH (Phox2b), Rn01478123_m1 (Nmb), Rn00670384_m1 (HCN1), Rn01408572_mH (HCN2), Rn00586666_m1 (HCN3), Rn00572232_m1 (HCN4), Rn01505208_m1 (subunidade alpha 3.1 do canal para Ca^{2+} do tipo T ativado por baixa voltagem - Cav3.1), Rn01460348_m1 (subunidade alpha 3.2 do canal para Ca^{2+} do tipo T ativado por baixa voltagem - Cav3.2), Rn01299126_m1 (subunidade alpha 3.3 do canal para Ca^{2+} do tipo T ativado por baixa voltagem - Cav3.2), Rn04223042_m1 (TASK1), Rn01755927_m1 (TASK2), Rn00755967_m1 (TASK3), Rn00597042_m1 (twik-related K^+ channel 1 - TREK1), Rn00596555_m1 (Canal para

Na⁺ de vazamento - Nalcn), Rn02585915_s1 (GPR4) e NM_031144.2 (β -Actina; gene de referência), como descrito anteriormente (PIRES DA SILVA et al., 2016). O qRT-PCR foi realizado em um termociclador (apenas um gene foi amplificado em cada poço) em triplicada (StepOnePlus System; Applied Biosystems) usando as mesmas sondas e um kit TaqMan Universal PCR Master Mix (Life Technologies). O material citoplasmático de cada neurônio foi utilizado para avaliar a amplificação de diferentes sondas (até cinco) e somente uma determinada combinação de sondas foi testada em cada neurônio. Portanto, diferentes combinações de sondas para avaliação do fenótipo neuronal e da expressão de canais iônicos ou receptores foram aplicadas em diferentes neurônios. Quatro combinações de sondas foram utilizadas para avaliar o fenótipo neuronal (β -Actin + Vglut2 + Gad67; β -Actin + Vglut2 + Glyt2; β -Actin + Phox2b + Gad65 + Vglut2; β -Actin + TH + ChAT + Nmb) e a expressão de canais iônicos ou receptores (β -Actin + HCN1 + HCN2 + HCN3 + HCN4; β -Actin + Cav3.1 + Cav3.2 + Cav3.3; β -Actin + TASK1 + TASK3 + TREK1; β -Actin + TASK2 + Nalcn + GPR4) nos neurônios expiratórios da região pFL. Uma combinação de sondas foi utilizada para avaliar o fenótipo neuronal e a expressão de canais iônicos ou receptores (β -Actin + Phox2b + Nmb + TASK2 + GPR4) em neurônios do RTN. A quantificação relativa da expressão do canal iônico ou receptor foi determinada pelo ciclo do limiar (Ct) em cada neurônio e normalizado pelo Ct do gene de referência (Δ Ct = Ct do canal iônico ou receptor – Ct da β -actina).

3.5. Histologia

No final dos registros eletrofisiológicos, as preparações foram perfundidas com solução de salina tamponada com fosfato (PBS; 0.1 M) e então com 4% de paraformaldeído (PFA - Sigma-Aldrich) em PBS à 4° C. O tronco cerebral e medula espinhal foram removidas e fixadas em paraformaldeído por uma noite à 4° C. Fatias transversais (40 μ m de espessura) foram cortadas utilizando um criostato (CM1800; Leica, Buffalo Grove, IL, USA) ao longo da região parafacial para identificação da localização dos neurônios expiratórios da região pFL e do RTN (positivos para biocitina). Nos neurônios marcados com biocitina em preparações nas quais os neurônios pré-motores abdominais também foram retrogradamente marcados, nós mapeamos as projeções para o cVRG (positivos para CTB), bem como avaliamos a localização das microinjeções de CTB nos segmentos torácicos da medula espinhal.

As fatias foram coletadas em uma solução crioprotetora (0.1 M PBS, 0.3% etileno glicol e 0.2% glicerol) e armazenado à 20° C antes do processamento. Fatias contendo neurônios do RTN registrados foram bloqueados e permeabilizados em PBS contendo 10% de soro de cavalo e 0.5% Triton X-100 por 1h em temperatura ambiente e então encubada com anticorpo primário anti-Phox2b de coelho (1:800; doação de J.-F. Brunet, Ecole Normale Supérieure, Paris, França) por 24 horas em 4° C. As fatias do tronco cerebral foram encubadas com estreptavidina conjugada com Alexa 488 (neurônios da região pFL e do RTN - 1:1000; Molecular Probes) e Alexa 647 anti-coelho de cabra (somente neurônios do RTN; 1:500; Molecular Probes) por 1 h em temperatura ambiente. Todas as fatias foram montadas em Fluoromount (Sigma-Aldrich). As imagens foram coletadas em um microscópio confocal Leica TCS SP5 equipada com lasers 488 e 633 e detecções de comprimento de ondas sintonizáveis.

3.6. Análises estatísticas

Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão. A distribuição dos dados foi testada utilizando o teste de normalidade *Shapiro-Wilk* antes da comparação pela análise pareada paramétrica do teste-t de *Student*, pareada não paramétrica do teste *Wilcoxon* ou ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*, de acordo com o protocolo experimental (GraphPad Prism 8, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). O nível de significância adotado foi de $p < 0.05$.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Localização, fenótipo e projeções dos neurônios expiratórios da região pFL

Nós utilizamos marcação intracelular em combinação com o qRT-PCR de uma única célula para determinar a localização e o fenótipo, respectivamente, dos neurônios expiratórios registrados. Todos os neurônios registrados (65 neurônios de 65 animais) estavam localizados na região parafacial e ventral ao aspecto lateral do núcleo motor facial (Figura 1, painel A). Esses neurônios estavam localizados na porção rostral da porção caudal final do núcleo motor facial (de 11.30 até 11.50 mm caudal ao bregma), 25–600 μ m abaixo da superfície ventral e 2.2-2.7 mm lateral a linha média (Figura 1, painel B), o qual é consistente com a localização da região pFL em ratos jovens (DE BRITTO; MORAES, 2017; MORAES et al., 2012, 2014; MORAES; MACHADO; PATON, 2014). Nós coletamos a solução de pipeta contendo o material citoplasmático de 16 neurônios expiratórios do pFL para analisar seu fenótipo pela expressão do RNA mensageiro (mRNA). Esses neurônios expressaram mRNA para Vglut2 (12 neurônios de 12 animais), mas não para Gad67 (4 neurônios de 4 animais), Glyt2 (4 neurônios de 4 animais), Phox2b (4 neurônios de 4 animais), Gad65 (4 neurônios de 4 animais), TH (4 neurônios de 4 animais), ChAT (4 neurônios de 4 animais) ou Nmb (4 neurônios de 4 animais), indicando que eles são excitatórios, não-colinérgicos, não-adrenérgicos (Figura 1, painéis C-F) e diferentes de neurônios do RTN positivos para Phox2b e Nmb descrito por outros (GUYENET; BAYLISS, 2015; SHI et al., 2017).

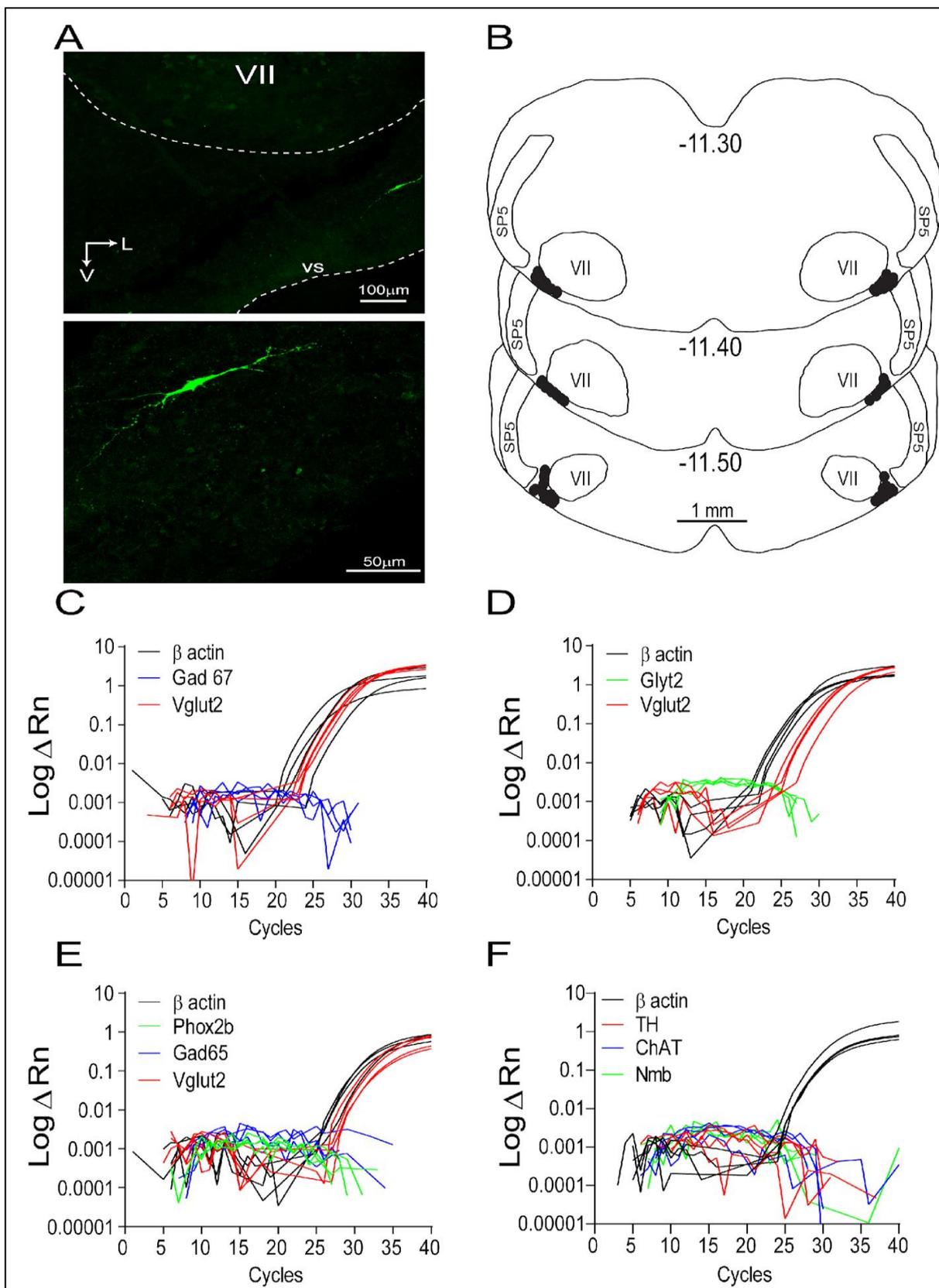


Figura 1. Localização e fenótipo dos neurônios expiratórios da região pFL. (A) Corte coronal do bulbo mostrando um neurônio expiratório representativo localizado na região pFL marcado com biocitina (-11.50 mm do Bregma; 100 μ m rostral ao polo caudal do núcleo motor facial - VII) em magnificações de 20x (superior) e 63x (inferior). vs: superfície ventral do bulbo; V: ventral; L: lateral. (B) Representações esquemáticas de cortes coronais do tronco cerebral mostrando a localização dos

neurônios expiratórios da região pFL marcados (-11.30 mm e -11.50 mm do Bregma; 300-100 μ m rostral ao polo caudal do núcleo motor facial - VII) seguindo as coordenadas publicadas (PAXINOS; WATSON, 2006). SP5: trato trigeminal espinhal. (C) Média dos pontos de amplificação de qRT-PCR para β actina, Gad67 e Vglut2 de 4 neurônios expiratórios da região pFL de 4 animais. A emissão fluorescente (Δ RN) é plotada em razão do número de ciclos. Note que esses neurônios expressam Vglut2, mas não Gad67. (D) Média dos pontos de amplificação de qRT-PCR para β actina, Glyt2 e Vglut2 de outros 4 neurônios expiratórios de 4 animais expressando Vglut2, mas não Glyt2. (E) Média dos pontos de amplificação de qRT-PCR para β actina, Phox2b, Gad65 e Vglut2 de outros 4 neurônios expiratórios de 4 animais expressando Vglut2, mas não Phox2b ou Gad65. (F) Média dos pontos de amplificação de qRT-PCR para β actina, TH, ChAT e Nmb de outros 4 neurônios expiratórios de 4 animais indicando ausência de expressão de TH, ChAT ou Nmb nesses neurônios.

Esperamos três horas para permitir o transporte intracelular de biocitina para os terminais axonais em 10 neurônios expiratórios da região pFL de 10 animais (Figura 2, painel A). Nós encontramos projeções para a região cVRG ipsilateral em todos os neurônios analisados (Figura 2, painel A e B). Nós também identificamos os neurônios bulbo espinhais do cVRG, definidos pela marcação retrógrada da medula espinhal torácica inferior (Figura 2, painéis C-E), em 3 desses 10 animais. Foram observadas posições próximas entre os botões axonais de neurônios expiratórios da região pFL e neurônios abdominais do cVRG (Figura 2, painel D). Os 10 neurônios descritos nas análises histológicas acima foram submetidos aos seguintes testes moleculares e funcionais: a) 7 neurônios foram usados para analisar o efeito do CO₂ em seu Vm, frequência de potenciais de ação antes e após o bloqueio da transmissão sináptica e para a expressão de mRNA para Vglut2 (n=7), Gad67 (n=4) e Glyt2 (n=3); b) 3 neurônios foram utilizados para analisar os efeitos do CO₂/[H⁺] antes e depois do bloqueio da transmissão sináptica em seu Vm, RMP e frequência de potenciais de ação e para a expressão de mRNA para TH, ChAT e Nmb.

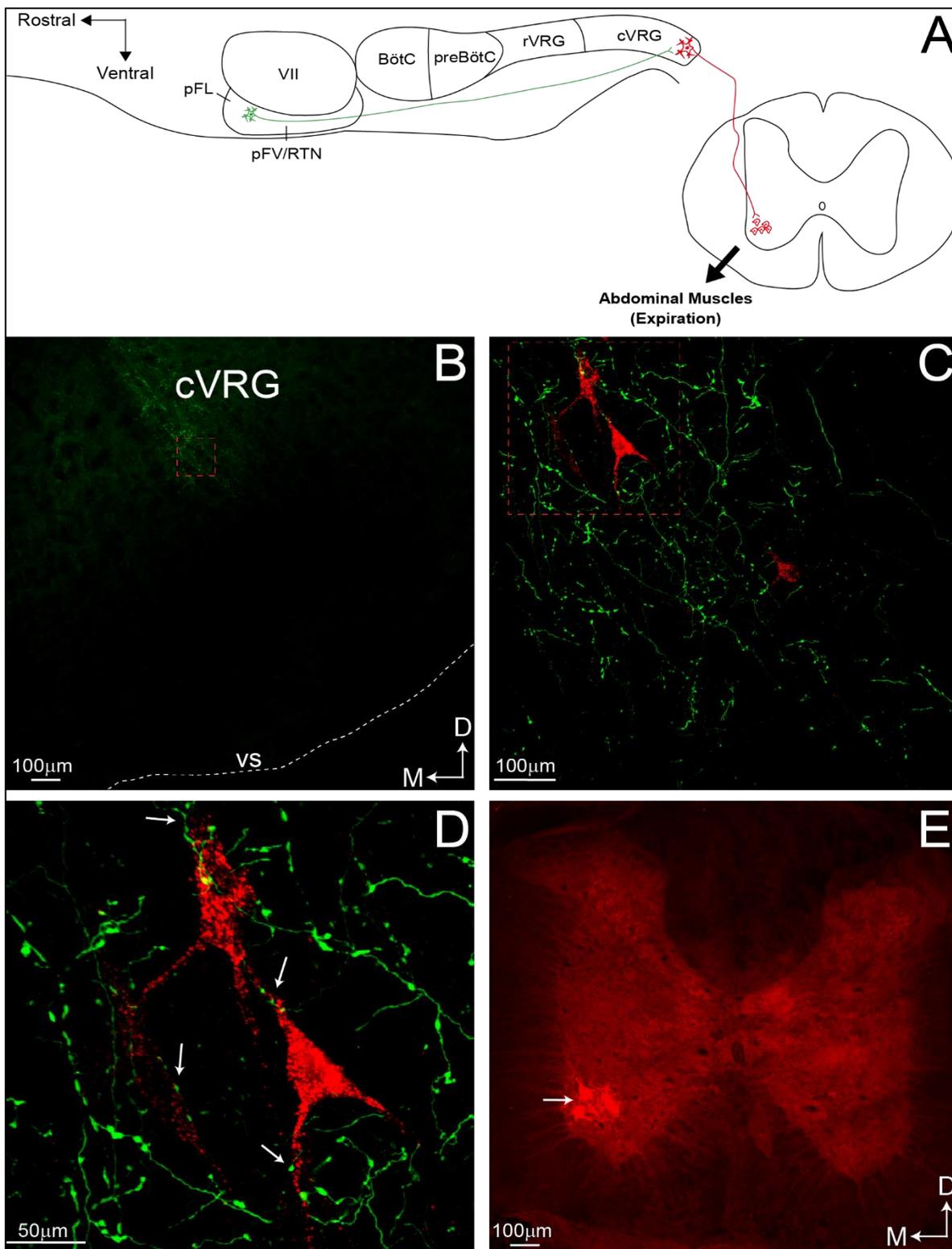


Figura 2. Projeções dos neurônios expiratórios da região pFL para o cVRG. (A) Representação esquemática de um corte sagital da superfície ventral do tronco encefálico de ratos ilustrando a projeção de um neurônio expiratório da região pFL (verde) para supostos neurônios pré-motores abdominais no cVRG, marcados retrogradamente com a CTB (vermelho), que se projetam para neurônios motores abdominais localizados no corno ventral da medula espinhal. BötC: Complexo Bötzinger, cVRG: Grupo respiratório ventral caudal, pFL: Região parafacial lateral, pFV/RTN: Região parafacial ventral/Núcleo Retrotrapezóide, preBötC: Complexo preBötzinger, rVRG: Grupo respiratório ventral rostral, VII: Núcleo motor facial. (B) Corte coronal (-14.10 mm do Bregma) do bulbo mostrando as projeções de um neurônio expiratório da região pFL (verde – biocitina) para o cVRG.

vs: superfície ventral do bulbo; D: dorsal; M: medial. (C) Magnificação do quadrado vermelho de A mostrando os supostos neurônios pré-motores abdominais marcados retrogradamente com CTB (vermelho) no cVRG. (D) Magnificação do quadrado vermelho de B mostrando posições próximas (setas) entre as fibras de um neurônio expiratório da região pFL e um suposto neurônio pré-motor abdominal. (E) Corte coronal da medula espinhal (T12) mostrando a localização da microinjeção de CTB (seta) no corno ventral (motor) para marcação de neurônios pré-motores no cVRG. V: ventral.

4.2. Trajetórias do potencial de membrana e transmissão sináptica para neurônios expiratórios da região pFL

Como mostrado na Figura 3 painel Ai, os neurônios expiratórios (23 neurônios de 23 animais) da região pFL apresentaram uma rápida despolarização (-51.2 ± 3.9 mV) que ocorreu imediatamente após o final da fase inspiratória (post-I) e um pacote despolarizante (-46.3 ± 3.4 mV) na E2 durante a normocapnia. Esses neurônios também apresentaram uma hiperpolarização decrescente durante a Insp (-58.3 ± 2.4 mV). Os efeitos da hipercapnia na trajetória do Vm desses 23 neurônios foram examinados (Figura 3, painéis Ai-D). A hipercapnia produziu uma significativa hiperpolarização do Vm ao longo da Insp (-72.5 ± 2.6 mV; $p < 0.0001$). O Vm na post-I (-45 ± 2.8 mV; $p < 0.0001$) e na E2 (-39.5 ± 3.1 mV; $p < 0.0001$) modificou para valores mais positivos. Este último foi seguido de uma série de potenciais de ação (27.4 ± 7.4 Hz) com um padrão de declínio de atividade (adaptação) no final da E2 (Figura 3, painéis Ai e Aii), consistente com o papel na AE.

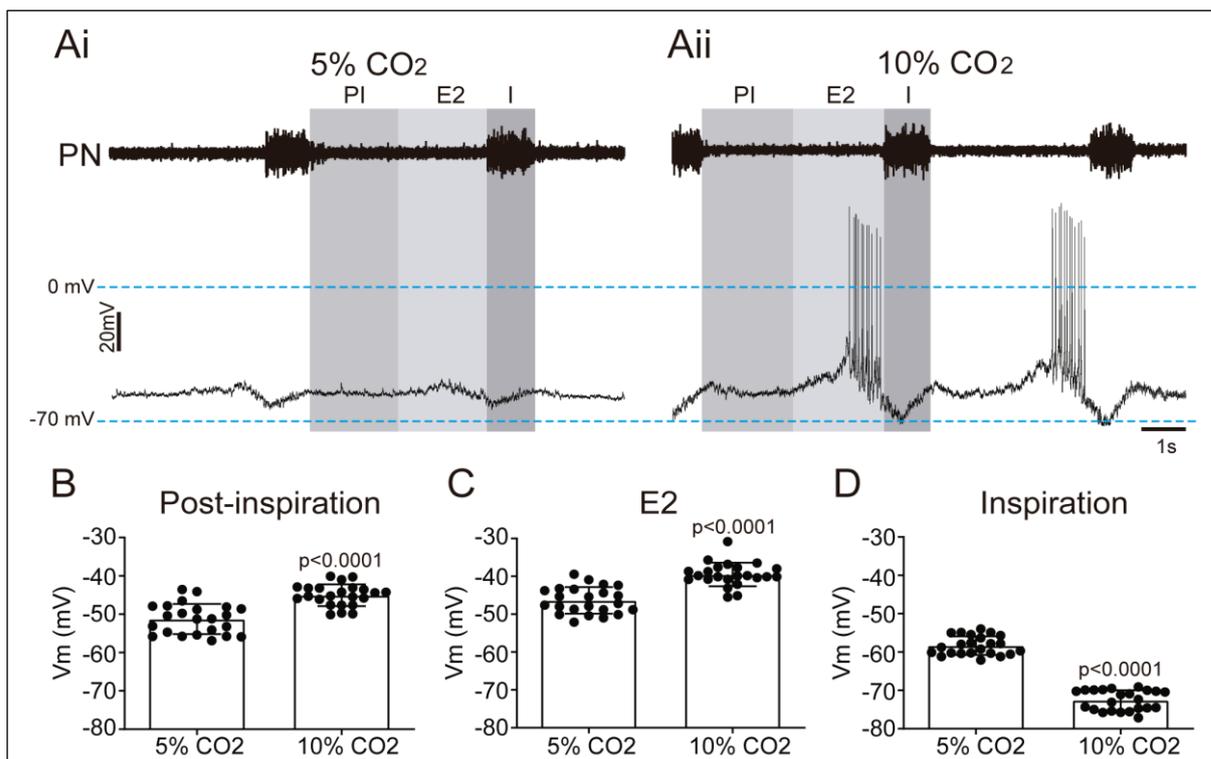


Figura 3. Trajetória do potencial de membrana dos neurônios expiratórios da região pFL durante normocapnia e hipercapnia. Registros originais da atividade do PN e registros em *current clamp* da trajetória de potencial de membrana (V_m) e potenciais de ação de um neurônio expiratório da região pFL durante normocapnia (5% CO_2 ; Ai) e hipercapnia (10% CO_2 ; Aii). Observe uma hiperpolarização durante a inspiração (I), despolarização na pós-inspiração (PI), bem como potenciais de ação no final da segunda fase da expiração (E2) durante hipercapnia. Dados agrupados do V_m durante a PI (B; teste-t de *Student* pareado), E2 (C; teste-t de *Student* pareado) e I (D; teste *Wilcoxon* pareado) de neurônios expiratórios da região pFL durante normocapnia e hipercapnia (23 neurônios de 23 animais). Observe que a hipercapnia despolarizou o V_m dos neurônios expiratórios da região pFL durante a PI e E2, mas o hiperpolarizou durante a I.

Em seguida nós determinamos os mecanismos sinápticos que atuam durante normocapnia e hipercapnia nos neurônios expiratórios da região pFL (16 neurônios de 16 animais). As sIPSCs GABAérgicas (6 neurônios de 6 animais) foram observadas somente durante a Insp (Figura 4, painéis Ai e Aii). Durante essa fase, a frequência das sIPSCs GABAérgicas aumentou na presença de hipercapnia (44.2 ± 8.7 vs 21.2 ± 5.5 Hz; $p=0.0009$), mas sua amplitude não foi alterada (-32.2 ± 5.9 vs -29.2 ± 4.4 pA; $p=0.46$; Figura 4, painéis Ai-Bii). Em contraste, as sIPSCs glicinérgicas (5 neurônios de 5 animais) foram observadas durante a Insp e a post-I (Figura 4, painéis C-Ciii). A frequência dessas sIPSCs aumentou na presença de hipercapnia durante a Insp (32.7 ± 8.8 vs 17.7 ± 5.2 Hz; $p=0.01$), enquanto reduziu durante a post-I (23 ± 7.1 vs 39.4 ± 12.6 Hz; $p=0.01$; Figura 4, painéis Ci-Dii). A amplitude das sIPSCs glicinérgicas durante a Insp (-32.9 ± 7.7 vs -28.9 ± 7.1 pA; $p=0.42$) e a post-I (-33 ± 7.8 vs -30.9 ± 5.4 pA; $p=0.61$) não foi afetada pela hipercapnia (Figura 4, painéis Ci-Cvi, Diii e Div). As sEPSCs glutamatérgicas (5 neurônios de 5 animais) foram observadas durante as diferentes fases do ciclo respiratório, mas nem sua frequência (13.6 ± 6.7 vs 12.4 ± 2.9 Hz; $p=0.75$) nem sua amplitude (-29.8 ± 7.2 vs -26.9 ± 3.5 pA; $p=0.56$; Figura 4, painéis Ei-Fii) foram alteradas pela hipercapnia.

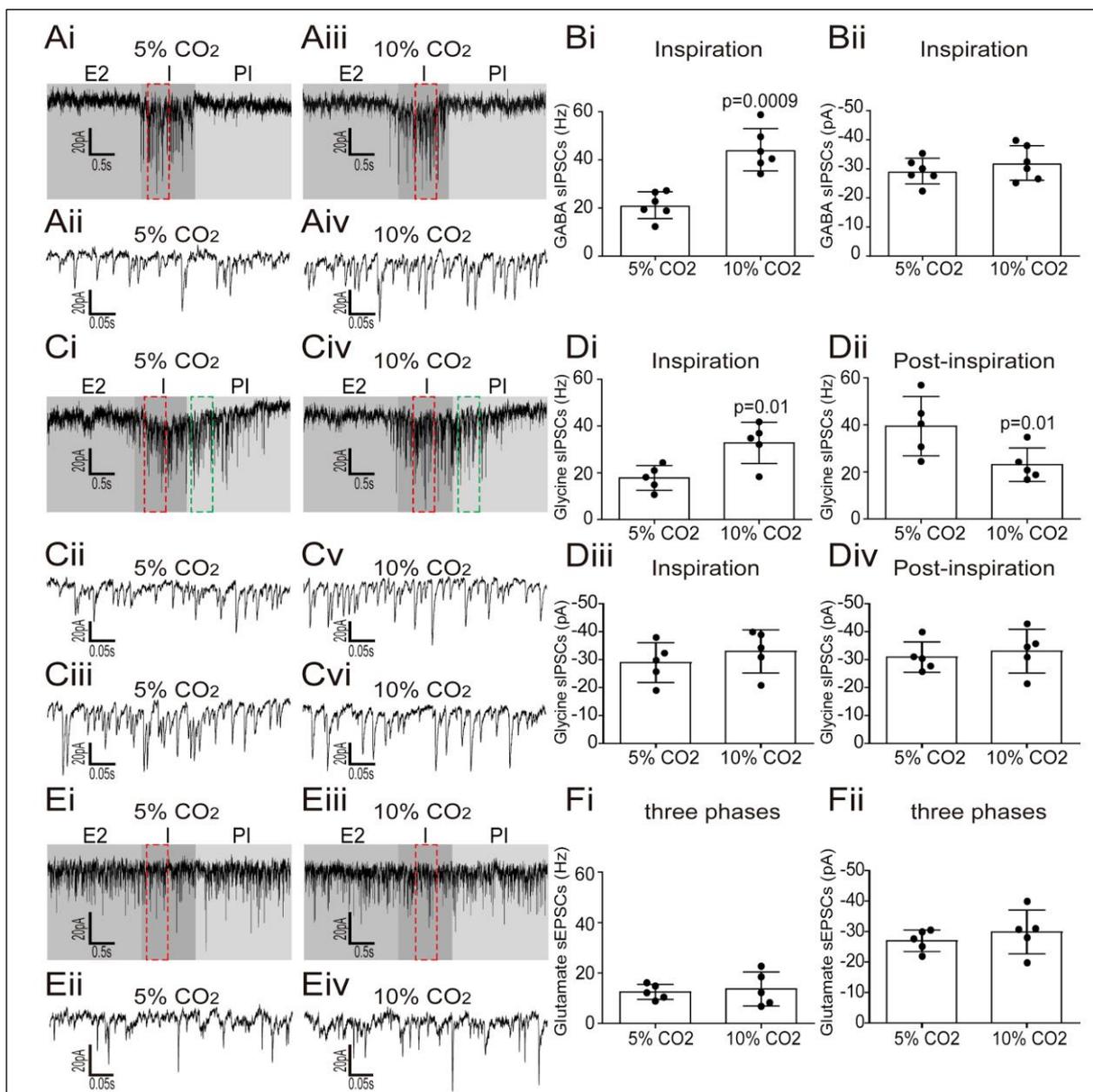


Figura 4. Transmissão sináptica inibitória e excitatória ao longo do ciclo respiratório para os neurônios expiratórios da região pFL durante normocapnia e hipercapnia. (Ai) Registros em *voltage clamp* das sIPSCs GABAérgicas durante normocapnia (5% CO₂). (Aii) Magnificação das sIPSCs GABAérgicas na inspiração (I) durante a normocapnia (retângulo vermelho em Ai). (Aiii) Registros em *voltage clamp* das sIPSCs GABAérgicas durante hipercapnia (10% CO₂). (Aii) Magnificação das sIPSCs GABAérgicas na I durante a hipercapnia (retângulo vermelho em Aiii). Dados agrupados da frequência (Bi; teste-t de *Student* pareado) e da amplitude (Bii; teste-t de *Student* pareado) das sIPSCs GABAérgicas durante normocapnia e hipercapnia (6 neurônios de 6 animais). Observe que a hipercapnia aumentou a frequência das sIPSCs GABAérgicas, mas não afetou sua amplitude. (Ci) Registros em *voltage clamp* das sIPSCs glicinérgicas durante normocapnia. (Cii) Magnificação das sIPSCs glicinérgicas na I durante a normocapnia (retângulo vermelho em Ci). (Ciii) Magnificação das sIPSCs glicinérgicas na pós-inspiração (PI) durante a normocapnia (retângulo verde em Ci). (Civ) Registros em *voltage clamp* das sIPSCs glicinérgicas durante hipercapnia. (Cv) Magnificação das sIPSCs glicinérgicas na I durante a hipercapnia (retângulo vermelho em Civ). Dados agrupados da frequência (Di e Dii; teste-t de *Student* pareado) e da amplitude (Diii e Div; teste-t de *Student* pareado) das sIPSCs glicinérgicas na I e PI, respectivamente, durante normocapnia e hipercapnia (5 neurônios de 5 animais). Observe que a hipercapnia aumentou a frequência das sIPSCs glicinérgicas na I, mas reduziu na PI. A amplitude das sIPSCs glicinérgicas não foi afetada durante a hipercapnia. (Ei) Registros em *voltage clamp* das sEPSCs glutamatérgicas durante normocapnia e sua magnificação (Eii; retângulo vermelho em Ei). Registros em *voltage clamp* das sEPSCs glutamatérgicas

durante hipercapnia (Eiii) e sua magnificação (Eiv; retângulo vermelho em Eiii). Dados agrupados da frequência (Fi; teste-t de *Student* pareado) e amplitude (Fii; teste-t de *Student* pareado) das sEPSCs glutamatérgicas durante normocapnia e hipercapnia (5 neurônios de 5 animais). As sEPSCs glutamatérgicas não foram afetadas pela hipercapnia. E2: segunda fase da expiração.

4.3. Propriedades eletrofisiológicas intrínsecas dos neurônios expiratórios da região pFL

Os neurônios expiratórios da região pFL tem capacitância de 32.9 ± 4.7 pF (65 neurônios de 65 animais). As propriedades eletrofisiológicas intrínsecas de 17 neurônios de 17 animais foram analisadas. Após o bloqueio da transmissão sináptica excitatória e inibitória rápida (veja Métodos), os neurônios passaram a apresentar potenciais de ação espontaneamente (8.5 ± 2.4 Hz); não observamos comportamento em *burst* em momento algum (Figura 5, painel A). Após o bloqueio da transmissão sináptica, os neurônios apresentaram RMP de -51.2 ± 4.2 mV, amplitude da AHP de 4.6 ± 1.1 mV, largura, limiar e amplitude do AP de 1.2 ± 0.4 ms, -31.6 ± 4.1 mV e 60.7 ± 9.6 mV, respectivamente (Figura 5, painel B). Quando testados com injeção de corrente despolarizante (2s, 100pA), esses neurônios apresentaram 73.7 ± 23 potenciais de ação (Figura 5, painel C), com um padrão de adaptação da frequência (Figura 5, painel D). A constante de tempo (ms) derivada de um único ajuste exponencial para a frequência instantânea e intervalo entre potenciais de ação foi de $667,5 \pm 100,3$ e $658 \pm 111,3$, respectivamente (Figura 5, painel D). Quando testados com injeções de correntes hiperpolarizantes, esses neurônios apresentaram R_i de 0.36 ± 0.1 G Ω (Figura 5, painel E). Potenciais de ação de alta frequência (*post-inhibitory rebound* – PIR), com um padrão de adaptação de frequência, foram observados após a liberação das injeções de correntes hiperpolarizantes (V_m a partir de -70 mV), tanto quando a liberação foi rápida (Δ : 42.3 ± 9.9 Hz) ou quando foi lenta (Δ : 41.3 ± 15.8 Hz) (Figura 5, painéis Fi e Fii). Adição de NiCl₂ (50 μ M; 4 neurônios de 4 animais), para bloquear os canais para Ca²⁺ LVA do tipo T, aboliu o PIR e reduziu o número de potenciais de ação ao final das injeções das correntes hiperpolarizantes (10 ± 1 vs 44.3 ± 6.8 Hz; $p=0.001$; teste-t de *Student*; Figura 5, painéis Fi e G). Com maiores amplitudes de corrente hiperpolarizantes, os neurônios expiratórios apresentaram um *sag* despolarizante (1.4 ± 0.5 vs 12 ± 2.4 mV; $p=0.003$; teste-t de *Student*; Figura 5, painel G), o qual foi eliminado após o bloqueio dos canais HCN usando o ZD7288 (40 μ M) (Figura 5, painel H).

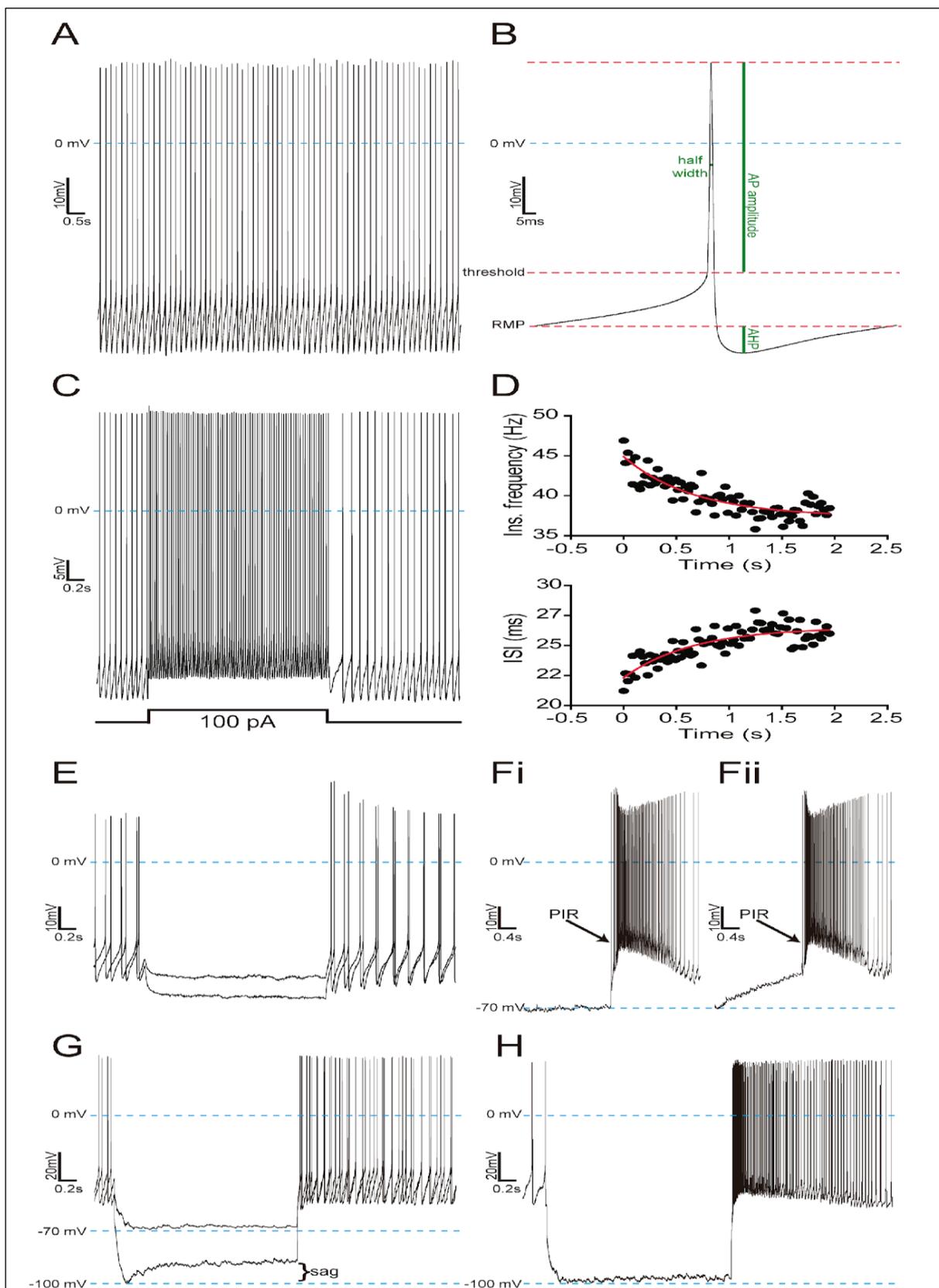


Figura 5. Propriedades eletrofisiológicas intrínsecas dos neurônios expiratórios da região pFL. (A) Potenciais de ação espontâneos dos neurônios expiratórios da região pFL após o bloqueio da transmissão sináptica rápida. (B) Média dos potenciais de ação do painel A ilustrando a AHP, RMP, e amplitude, metade e limiar do AP. (C) Potenciais de ação evocados em resposta a injeção de corrente despolarizante (excitabilidade) após o bloqueio da transmissão sináptica rápida no mesmo neurônio do

painel A. Note que a atividade regular é desencadeada quando o neurônio é despolarizado de seu RMP. (D) *Plots* da frequência de atividade instantânea *versus* o tempo (superior) e intervalo *inter-spike* (ISI) *versus* tempo (inferior), do neurônio em C, em resposta a corrente despolarizante. As constantes de tempo de decaída (superior) e subida (inferior) foram derivadas de curvas exponenciais únicas (linhas vermelhas). (E) Respostas do potencial de membrana (Vm) a injeções de correntes hiperpolarizantes (-20 e -40 pA), no mesmo neurônio do painel C, usado para calcular o R_i . Potenciais de ação de alta frequência (*post-inhibitory rebound* – PIR), com um padrão de adaptação de frequência, foram observados após uma corrente hiperpolarizante (corrente de polarização para -70mV) apresentando uma taxa de despolarização tanto quando a liberação foi rápida (Fi) como quando foi lenta (Fii) após o bloqueio da transmissão sináptica rápida, sugerindo a presença de canais para Ca^{2+} LVA do tipo T. (G) Respostas do Vm à injeções de correntes hiperpolarizantes (Vm em -70mV e -100mV), do mesmo neurônio do painel F, após a perfusão de $NiCl_2$ (50 μ M), o qual eliminou o PIR. Observe que com a injeção de corrente ainda mais hiperpolarizante (Vm em -100 mV), o Vm dos neurônios expiratórios apresentou uma mudança para valores mais positivos (*sag*) já que uma condutância dependente do tempo (HCN) foi lentamente ativada. (H) Respostas do Vm a injeções de correntes hiperpolarizantes (Vm em -100mV), em outro neurônio expiratório, após o bloqueio da transmissão sináptica rápida e a perfusão de ZD7288 (40 μ M), a qual reduziu significativamente o *sag*, mas não afetou o PIR.

4.4. Propriedades de membrana subliminares dos neurônios expiratórios da região pFL

Pulsos de voltagem hiperpolarizantes foram utilizados para ativar canais HCN em 5 neurônios de 5 animais, os quais revelaram correntes I_h (em 120 mV: -130.8 ± 40.2 pA; $V_{0.5}$: -106.1 ± 6.4 mV; k : -17.1 ± 3.5 ; Figura 6, painéis A e B). O citoplasma desses neurônios foi coletado e a expressão do mRNA dos canais HCN 1-4 foi avaliada. Observamos grande variedade na expressão de mRNA das isoformas dos canais HCN, embora o canal HCN 2 tenha sido o mais expresso nos neurônios expiratórios da região pFL (Tabela 1). Em outro grupo de 6 neurônios de 6 animais, canais para Ca^{2+} LVA do tipo T foram ativados usando pulsos de voltagem despolarizantes (Figura 6, painéis C). Em média, o pico de ativação de canais para Ca^{2+} LVA do tipo T em neurônios expiratórios foi de -20mV (-51 ± 10 pA) e os valores de $V_{0.5}$ e k foram -32.3 ± 1.5 mV e -7.7 ± 0.6 , respectivamente (Figura 6, painel D). As análises da expressão de mRNA revelaram que todos os neurônios expiratórios avaliados expressaram as isoformas Cav3.1 e 3.2 dos canais para Ca^{2+} LVA do tipo T, mas não a isoforma Cav3.3 (Tabela 2).

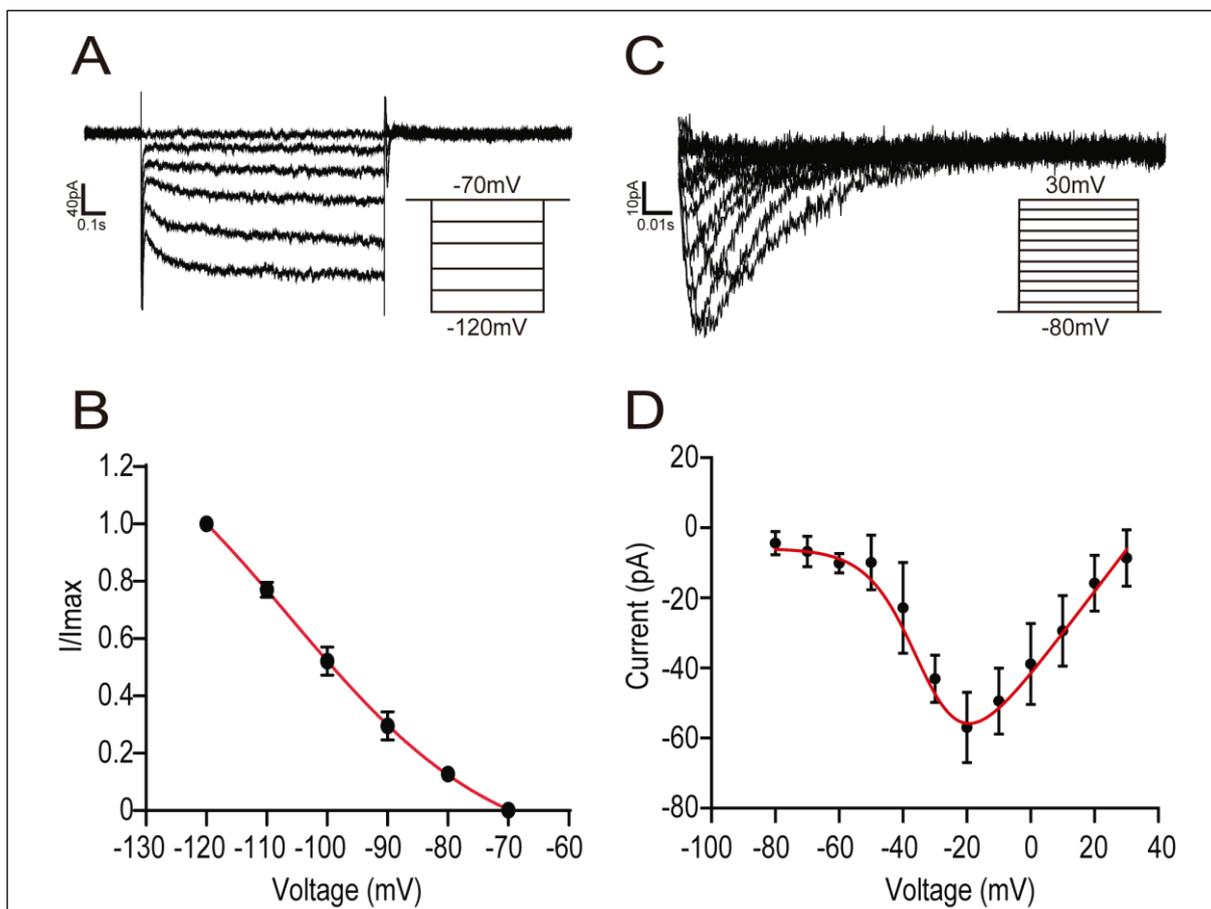


Figura 6. Canais HCN e para Ca^{2+} LVA do tipo T dos neurônios expiratórios da região pFL. (A) Pulsos de voltagem hiperpolarizantes (incrementos de -10mV), de um potencial fixado em -70mV , evocaram a corrente I_h dependente do tempo em um neurônio expiratório da região pFL após o bloqueio da transmissão sináptica rápida. (B) Relação corrente-voltagem da corrente normalizada da média da porção *steady-state* da corrente I_h (5 neurônios de 5 animais). A linha vermelha contínua corresponde a uma equação da forma que mostra a dependência de voltagem da corrente I_h . (C) Correntes de Ca^{2+} , mediadas por canais para Ca^{2+} LVA do tipo T, obtidas de outro neurônio expiratório da região pFL utilizando uma série de pulsos de voltagem despolarizantes (incrementos de 10mV) de uma condição hiperpolarizante de -80mV após o bloqueio da transmissão sináptica rápida. (D) Média do pico da amplitude das correntes evocadas em função do potencial de comando (6 neurônios de 6 animais). A linha vermelha contínua corresponde ao *fit* da função de Boltzmann mostrando a dependência de voltagem dessas correntes de Ca^{2+} .

Tabela 1. Proporção da expressão dos canais HCN nos neurônios expiratórios da região pFL

| Neurônios da região pFL | | | | | |
|-------------------------|-----|------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| HCN1 | | | 3.48 | 3.5 | |
| HCN2 | 2.8 | | 5.37 | 6.36 | 8.12 |
| HCN3 | | 7.79 | 3.6 | | 6.25 |
| HCN4 | | | 5.71 | | |

Cinco neurônios de cinco animais foram analisados. Os números representam o Ct dos canais iônicos, descritos no lado esquerdo da tabela para cada neurônio, o qual é normalizado pelo Ct do gene de referência ($\Delta Ct = Ct$ do canal iônico – Ct da β -actina). Os quadrados vazios indicam detecção abaixo do limiar.

Tabela 2. Proporção da expressão dos canais para Ca^{2+} LVA do tipo T nos neurônios expiratórios da região pFL

| Neurônios da região pFL | | | | | | |
|-------------------------|------|------|------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Ca _v 3.1 | 5.75 | 5.7 | 5.55 | 5.57 | 5.76 | 5.93 |
| Ca _v 3.2 | 7.73 | 7.58 | 7.7 | 7.74 | 9.73 | 9.73 |
| Ca _v 3.3 | | | | | | |

Seis neurônios de seis animais foram analisados. Os números representam o Ct dos canais iônicos, descritos no lado esquerdo da tabela para cada neurônio, o qual é normalizado pelo Ct do gene de referência ($\Delta Ct = Ct$ do canal iônico – Ct da β -actina). Os quadrados vazios indicam detecção abaixo do limiar.

Nós também avaliamos as propriedades de membrana subliminares de 10 neurônios expiratórios da região pFL de 10 animais utilizando rampas de voltagem lentas (30 mV/s; Figura 7, painel A). A relação corrente-voltagem dos neurônios expiratórios foi avaliada na presença de bloqueadores dos canais para Ca^{2+} e para K^+ , bem como dos canais não seletivos para cátions HCN. A relação corrente-voltagem foi linear em voltagens hiperpolarizadas e exibiu retificação de saída em voltagens despolarizadas (Figura 7, painel A). A g_{Leak} (0.7 ± 0.2 nS) foi determinada pela regressão linear da região passiva (-110 para -70 mV) da relação corrente-voltagem (Figura 7, painel A). A corrente total de vazamento em todos os neurônios examinados apresentou potencial de reversão (E_{Leak} - 0 intercepção de corrente) de -82 ± 2.5 mV (de -78.9 para -86.9 mV), a qual foi levemente mais despolarizada que o calculado para o E_{K^+} (-92.5 mV), indicando que a g_{Leak} foi dominada por K^+ (Figura 7, painel A). As análises da expressão do mRNA de única célula revelaram que neurônios expiratórios da região pFL expressaram canais TREK1 (4 neurônios de 4 animais) e Nalcn (6 neurônios de 6 animais), mas não TASK1 (4 neurônios de 4 animais), TASK2 (6 neurônios de 6 animais) ou TASK3 (4 neurônios de 4 animais) (Tabelas 3 e 4).

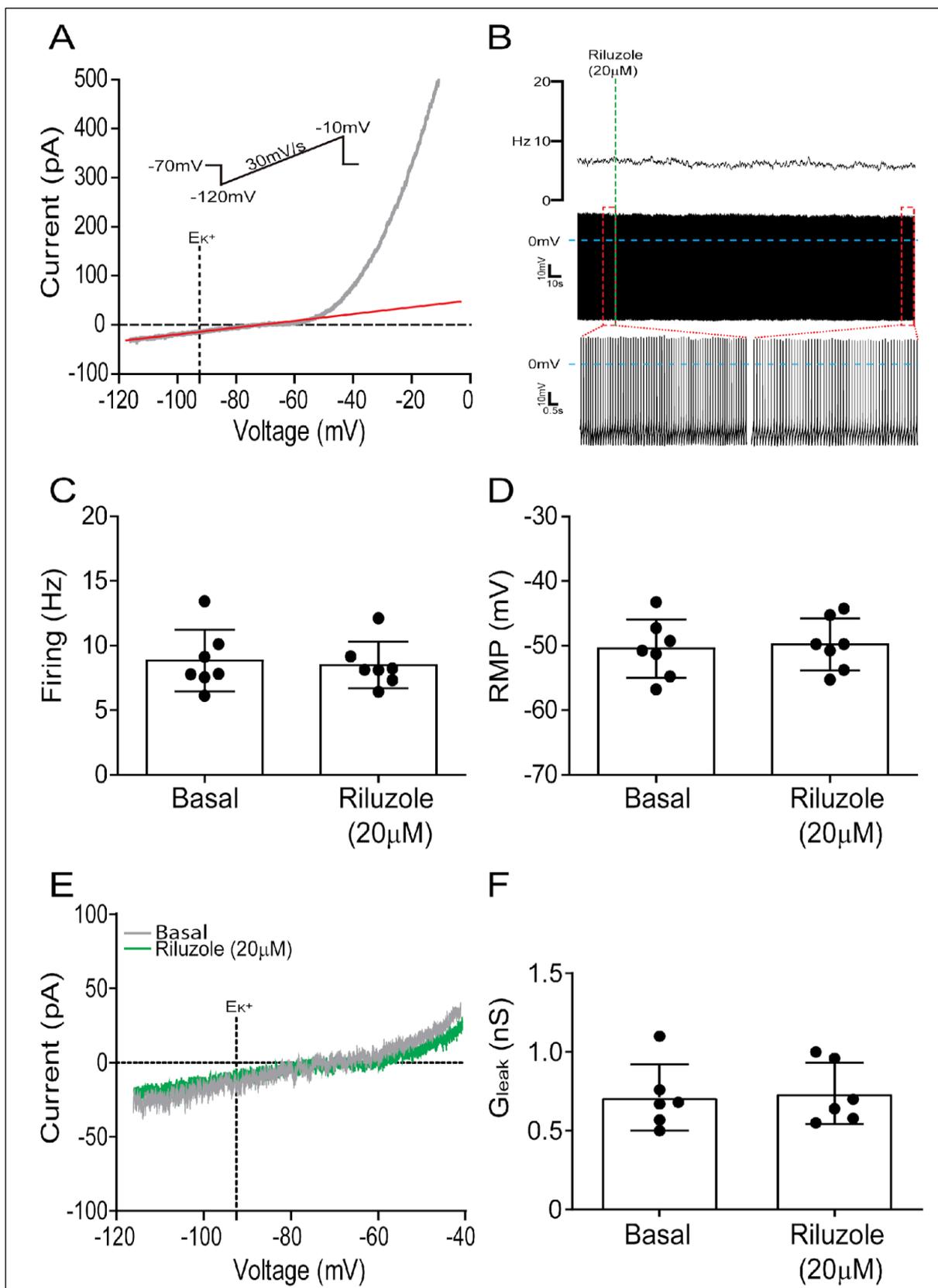


Figura 7. Correntes de vazamento dominadas por K^+ e ausência da I_{NaP} nos neurônios expiratórios da região pFL. (A) Relação corrente-voltagem de um neurônio expiratório da região pFL representativo em resposta ao protocolo de rampa de voltagem lenta na presença de bloqueadores da transmissão sináptica rápida, canais dependentes de voltagem para Ca^{2+} e K^+ , bem como dos canais HCN catiônicos não-seletivos. A g_{Leak} foi calculada pela regressão linear (linha vermelha) na região

linear da relação corrente-voltagem da membrana (-100 mV para -70 mV). O E_{K^+} (-92.51 mV) calculado para as condições de registro está indicado. Note a ausência de região negativa (corrente de entrada) entre -60mV e -40mV, sugerindo uma ausência da I_{NaP} . (B) Registros em *current clamp* e frequência de potenciais de ação instantâneos (Hz), após o bloqueio da transmissão sináptica rápida, de um neurônio expiratório da região pFL representativo durante normocapnia antes e depois a perfusão com riluzole (20 μ M). Magnificações de 10s do potencial de membrana e da frequência de potenciais de ação dos registros no final de cada condição experimental (antes e depois do riluzole – caixas vermelhas) são mostrados. Dados agrupados da frequência de potenciais de ação (C; teste-t de *Student* pareado) e RMP (D; teste-t de *Student* pareado) dos neurônios expiratórios durante normocapnia antes e depois do riluzole (7 neurônios de 7 animais). Note que o riluzole não afetou a frequência de potenciais de ação e a RMP dos neurônios expiratórios. (E) Relação corrente-voltagem de outro neurônio expiratório da região pFL representativo em resposta ao protocolo de rampa de voltagem lenta, na presença dos mesmos bloqueadores usados em A, antes e após o riluzole. (F) Dados agrupados da g_{Leak} dos neurônios expiratórios antes e após o riluzole (teste-t de *Student* pareado; 6 neurônios de 6 animais). Note que o riluzole não afetou a g_{Leak} dos neurônios expiratórios.

Tabela 3. Proporção da expressão dos canais de vazamento para K⁺ nos neurônios expiratórios da região pFL

| Neurônios da região pFL | | | | |
|-------------------------|------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| TASK1 | | | | |
| TASK3 | | | | |
| TREK1 | 4.35 | 4.45 | 8.67 | 8.47 |

Quatro neurônios de quatro animais foram analisados. Os números representam o Ct dos canais iônicos, descritos no lado esquerdo da tabela para cada neurônio, o qual é normalizado pelo Ct do gene de referência ($\Delta Ct = Ct$ do canal iônico – Ct da β -actina). Os quadrados vazios indicam detecção abaixo do limiar.

Tabela 4. Proporção da expressão dos canais de vazamento para Na⁺ e K⁺, bem como do receptor acoplado a proteína G ativado por H⁺, nos neurônios expiratórios da região pFL

| Neurônios da região pFL | | | | | | |
|-------------------------|------|------|------|------|------|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| TASK2 | | | | | | |
| Nalcn | 2.93 | 2.73 | 2.67 | 3.22 | 3.44 | 3.8 |
| GPR4 | | | | | | |

Seis neurônios de seis animais foram analisados. Os números representam o Ct dos canais iônicos/receptor, descritos no lado esquerdo da tabela para cada neurônio, o qual é normalizado pelo Ct do gene de referência ($\Delta Ct = Ct$ do canal iônico – Ct da β -actina). Os quadrados vazios indicam detecção abaixo do limiar.

Estudos prévios propuseram que canais para Na^+ dependentes de voltagem sensíveis a TTX, que medeiam a I_{NaP} , estavam envolvidos na atividade intrínseca dos neurônios expiratórios da região pFL de ratos jovens (MOLKOV et al., 2010; WITTMEIER et al., 2008). Entretanto, uma região negativa (corrente de entrada) entre -60mV e -40mV não foi observada na relação corrente-voltagem dos neurônios expiratórios da região pFL, sugerindo uma ausência da I_{NaP} (Figura 7, painéis A e E). Nós então avaliamos os efeitos do riluzole (20 μM), o qual inibe completamente a I_{NaP} em neurônios da superfície ventral do bulbo (DEL NEGRO et al., 2005; KOIZUMI; SMITH, 2008; MORAES et al., 2013), em 7 neurônios expiratórios de 7 animais após o bloqueio da transmissão sináptica (Figura 7, painel B). O riluzole não afetou a frequência de potenciais de ação (8.4 ± 1.8 vs 8.8 ± 2.3 Hz; $p=0.4$) e a RMP (-49.8 ± 4 vs -50.4 ± 4.5 mV; $p=0.76$) dos neurônios expiratórios, o que confirma a ausência da I_{NaP} . Adicionalmente, essa concentração de riluzole não afetou a g_{Leak} dominada por K^+ (0.7 ± 0.1 vs 0.7 ± 0.2 nS; $p=0.66$; 6 neurônios de 6 animais; Figura 7, painéis E e F).

4.5. Concentração intracelular de Ca^{2+} e a geração da atividade expiratória nos neurônios da região pFL

Considerando a expressão dos canais para Ca^{2+} LVA do tipo T e a presença do PIR nos neurônios expiratórios da região pFL, nós avaliamos o papel da $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular, usando alta concentração de BAPTA (30 mM), na geração da sua atividade expiratória em resposta à hipercapnia (Figura 8, painéis Ai-Aiii). Após a ruptura da membrana e estabilização da diálise por ~20min (6 neurônios de 6 animais), o BAPTA hiperpolarizou significativamente o V_m dos neurônios expiratórios na E2 (-53.3 ± 2.3 vs -39.3 ± 2.8 mV; $p=0.0001$), o que eliminou os potenciais de ação, sem afetar o V_m durante a Insp (-71.7 ± 2.7 vs -72.3 ± 2.1 mV; $p=0.31$) e a post-I (-45.3 ± 2.6 vs -46.6 ± 3.3 mV; $p=0.28$) em resposta a hipercapnia (Figura 8, painéis B-E). Esses resultados demonstram que a $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular determina a atividade expiratória dos neurônios da região pFL durante a hipercapnia.

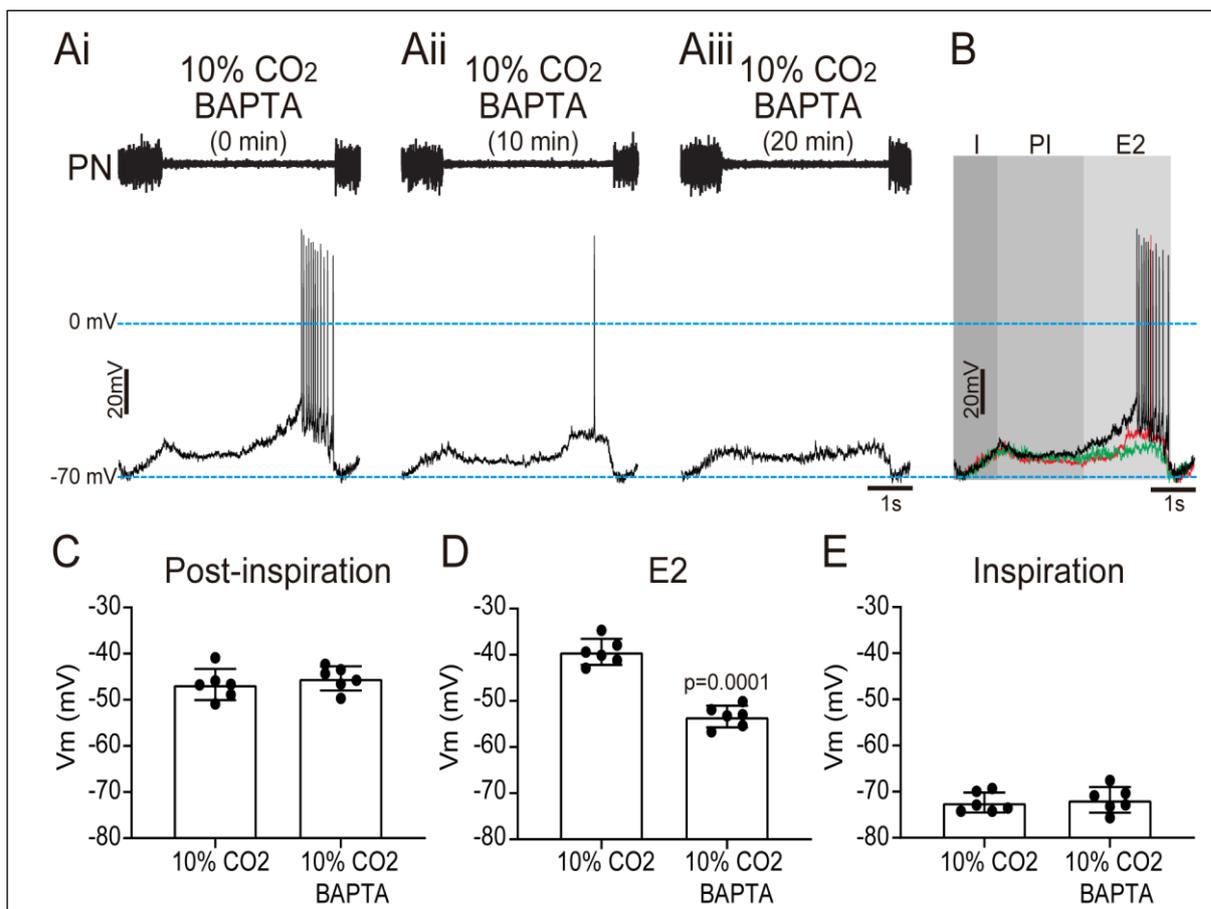


Figura 2. A $[Ca^{2+}]$ intracelular é importante para a atividade expiratória dos neurônios da região pFL. Registros originais da atividade do PN e registros em *current clamp* da trajetória do potencial de membrana (V_m) e potenciais de ação de um neurônio expiratório da região pFL durante hipercapnia (10% CO₂) antes (Ai), dez (Aii) e vinte (Aiii) minutos após a diálise intracelular do BAPTA em alta concentração (30 mM). (B) Sobreposição da trajetória do V_m e potenciais de ação do mesmo neurônio expiratório de A antes (preto), dez (vermelho) e vinte (verde) minutos após a diálise de BAPTA. Note que uma vez que o BAPTA foi introduzido no citosol do neurônio, via ruptura do selo (0 min), uma progressiva hiperpolarização do V_m do neurônio na segunda fase da expiração (E2) foi observada, o que eliminou os potenciais de ação nesta fase. Dados agrupados do V_m durante a pós-inspiração (C; teste-t de *Student* pareado), E2 (D; teste-t de *Student* pareado) e inspiração (E; teste-t de *Student* pareado) dos neurônios expiratórios da região pFL imediatamente após a ruptura do selo e 20 minutos após a diálise intracelular do BAPTA durante a hipercapnia (6 neurônios de 6 animais). Note que a diálise do BAPTA hiperpolarizou o V_m dos neurônios expiratórios durante a E2, sem afetá-lo durante a inspiração (I) e a pós-inspiração (PI).

4.6. Ausência de sensibilidade intrínseca ao CO₂/[H⁺] dos neurônios expiratórios da região pFL

Para testar se neurônios expiratórios da região pFL são sensores intrínsecos ao CO₂/[H⁺], nós expusemos esses neurônios a hipercapnia/acidose e hipocapnia/alcalose alterando o CO₂ (7 neurônios de 7 animais) ou o pH (6 neurônios de 6 animais) das soluções de perfusão tamponadas com HCO₃⁻ e HEPES na presença dos bloqueadores da transmissão sináptica rápida para eliminar a influência da rede neuronal no tronco cerebral. Um exemplo de um neurônio expiratório é mostrado na Figura 9, painel A. Esse neurônio tinha frequência de ~8 Hz em solução de perfusão padrão, que foi aerada com 5% CO₂ (normocapnia) e tamponada com 24 mM de HCO₃⁻. A frequência de potenciais de ação e o RMP não alteraram quando o CO₂ foi aumentado para 10% [hipercapnia; (frequência de potenciais de ação: 8.4 ± 3.4 vs 8.5 ± 3.3 Hz; p>0.99) (RMP: -51.7 ± 4.1 vs -52.6 ± 4.5 mV; p>0.99)] ou diminuído para 1% [(hipocapnia; (frequência de potenciais de ação: 8.2 ± 3.3 vs 8.5 ± 3.3 Hz; p=0.54) (RMP: -50.8 ± 4.1 vs -52.6 ± 4.5 mV; p=0.79)], indicando que os neurônios expiratórios da região pFL não possuem sensibilidade intrínseca ao CO₂ (Figura 9, painéis A-D).

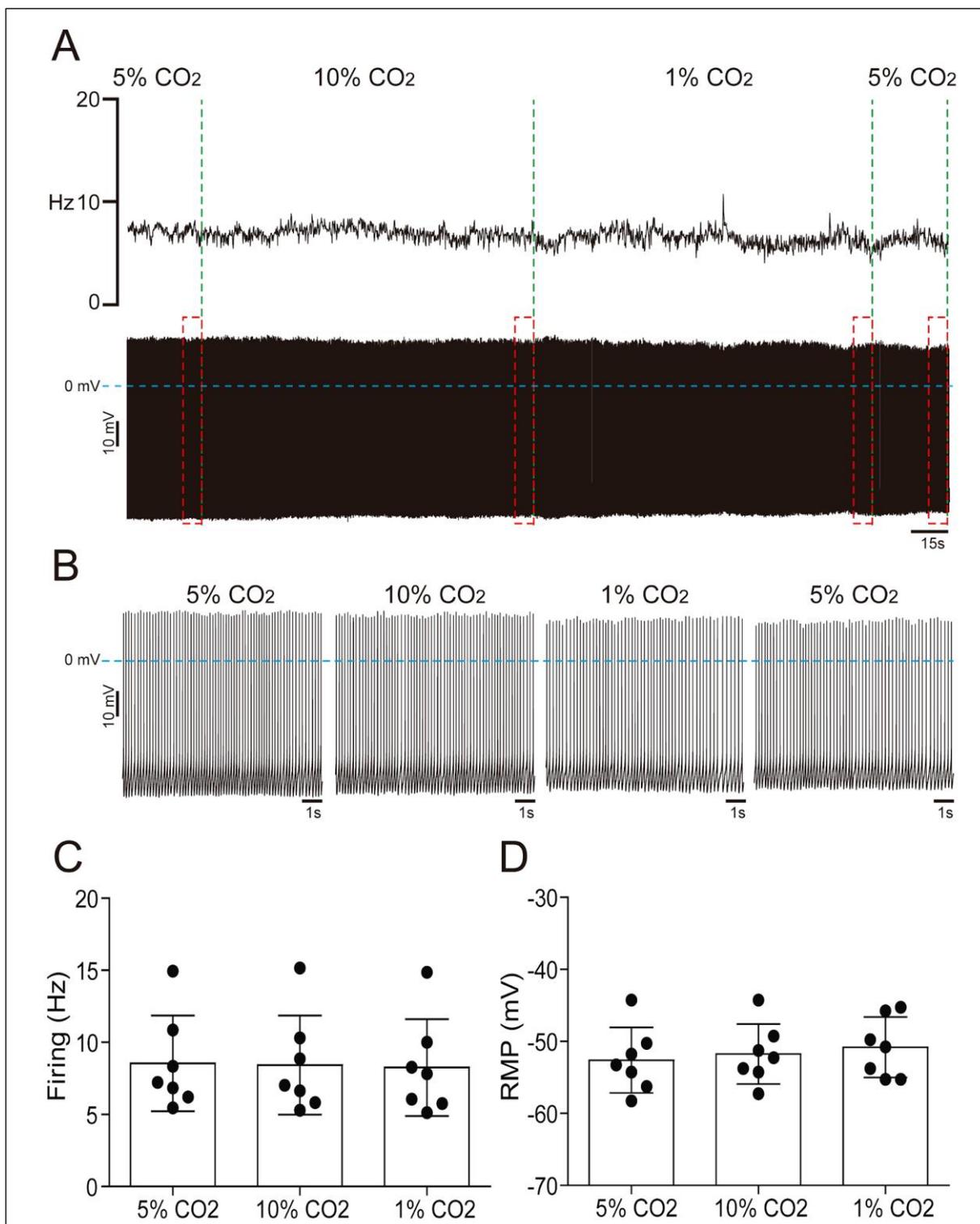


Figura 3 Ausência de sensibilidade intrínseca ao CO₂ dos neurônios expiratórios da região pFL. (A) Registros em *current clamp* e frequência de potenciais de ação instantânea (Hz) de um neurônio expiratório da região pFL representativo durante normocapnia (5% CO₂), hipercapnia (10% CO₂) e hipocapnia (1% CO₂) após o bloqueio da transmissão sináptica rápida. (B) Magnificações de 10 s dos registros de potencial de membrana e frequência de potenciais de ação no final de cada condição experimental (caixas vermelhas em A). Dados agrupados da frequência de potenciais de ação (C; ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*) e RMP (D; ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*) dos neurônios expiratórios durante normocapnia, hipercapnia e hipocapnia (7 neurônios de 7 animais). Note que a hipercapnia ou a hipocapnia não afetou a frequência de potenciais de ação ou RMP dos neurônios expiratórios.

Outro exemplo de um neurônio expiratório é mostrado na Figura 10 painel A. Esse neurônio tinha frequência de ~7 Hz em solução de perfusão tamponada com HEPES com pH ajustado para 7.4. A frequência de potenciais de ação e o RMP não alteraram quando o pH foi diminuído para 7.1 [acidose; (frequência de potenciais de ação: 7.1 ± 1.6 vs 6.8 ± 1.5 Hz; $p > 0.99$) (RMP: -50.6 ± 1.7 vs -51.2 ± 1.7 mV; $p > 0.99$)] ou aumentado para 8.1 [alcalose; (frequência de potenciais de ação: 7.2 ± 1.7 vs 6.8 ± 1.5 Hz; $p = 0.85$) (RMP: -51 ± 2.2 vs -51.2 ± 1.7 mV; $p > 0.99$)], indicando que os neurônios expiratórios da região pFL não possuem sensibilidade intrínseca ao pH (Figura 10, painéis A-D). Adicionalmente, as análises de célula única da expressão do mRNA revelaram que os neurônios expiratórios da região pFL não expressam GPR4 (6 neurônios de 6 animais; Tabela 4), os quais tem sido associados com a “quimiossensibilidade” de neurônios em regiões vizinhas (KUMAR et al., 2015).

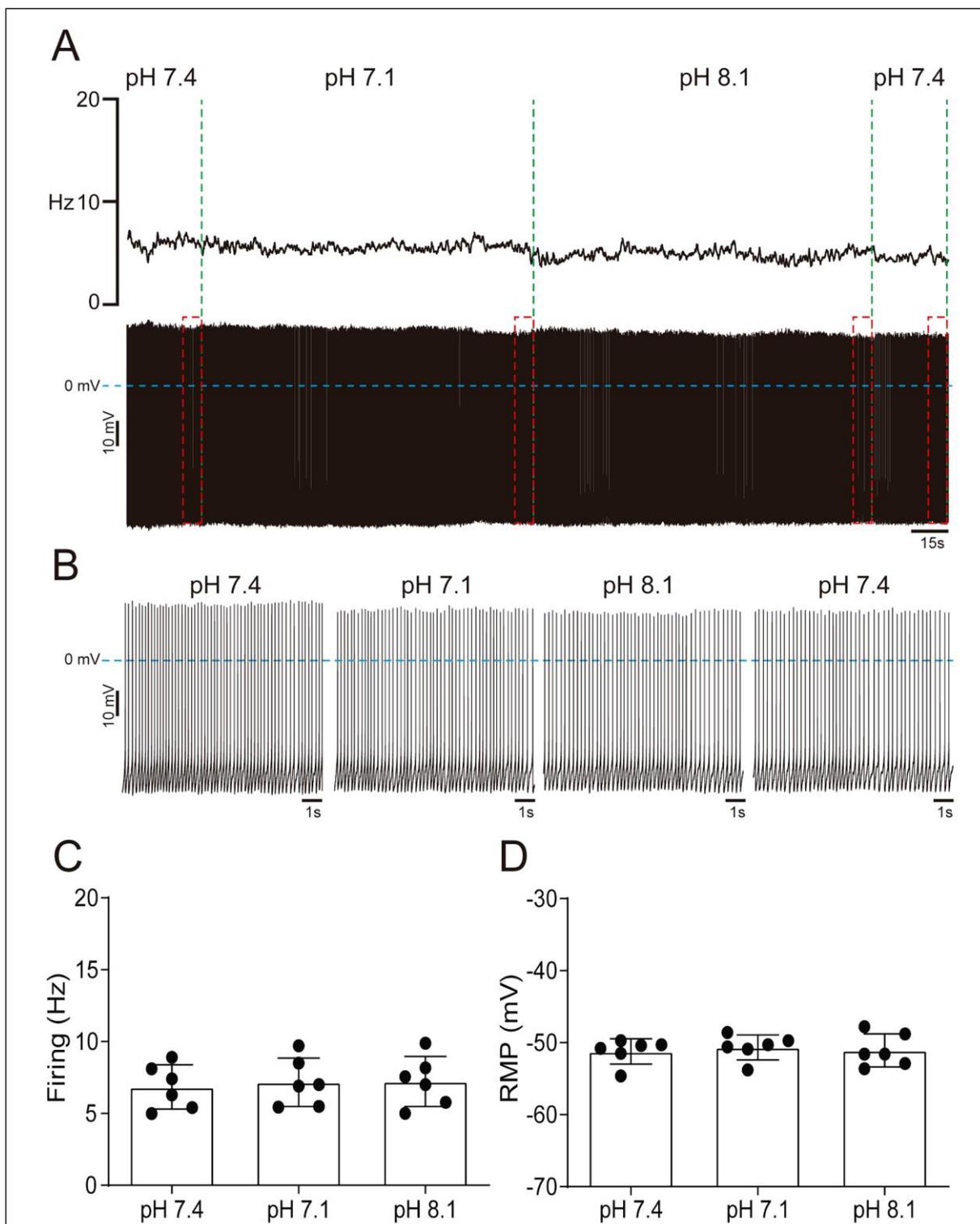


Figura 4 Ausência de sensibilidade intrínseca ao $[H^+]$ dos neurônios expiratórios da região pFL. (A) Registros em *current clamp* e frequência de potenciais de ação instantânea (Hz) de um neurônio expiratório da região pFL representativo em uma solução de perfusão tamponada com HEPES com o pH ajustado para 7.4, 7.1 (acidose) e 8.1 (alcalose) após o bloqueio da transmissão sináptica rápida. (B) Magnificações de 10 s do registro do potencial de membrana e frequência de potenciais de ação no final de cada condição experimental (caixas vermelhas em A). Dados agrupados da frequência de potenciais de ação (C; ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*) e RMP (D; ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*) de neurônios expiratórios durante pH 7.4, 7.1 e 8.1 (6 neurônios de 6 animais). Note que a acidose ou a alcalose não afetou a frequência de potenciais de ação ou RMP dos neurônios expiratórios.

Registramos 6 neurônios do RTN de 6 animais. Todos os neurônios registrados estavam localizados na região parafacial, no aspecto ventral e medial do núcleo motor facial e rostral a porção final caudal do núcleo motor facial (de 11.40 a 11.50 mm caudal ao bregma), 10–400 μm abaixo da superfície ventral e 1.6-1.8 lateral à linha média (Figura 11, painel A). Esses 6 neurônios expressaram tanto a proteína como o mRNA para Phox2b, bem como mRNA para Nmb (Figura 11, painéis B e C). A hipercapnia produziu um aumento significativo na sua frequência de potenciais de ação (11.7 ± 1.4 vs 2.8 ± 0.5 Hz; $p < 0.0001$); comportamento em *burst* não foi observado em nenhuma fase do ciclo respiratório (Figura 11, painéis Di-Dii). A seguir, nós testamos se esses 6 neurônios do RTN são sensores intrínsecos ao CO_2 pela exposição dos mesmos à hipercapnia (10% CO_2) utilizando uma solução de perfusão tamponada com HCO_3^- na presença de bloqueadores da transmissão sináptica rápida. Um exemplo de neurônios do RTN é mostrado na Figura 12, painel A. Esse neurônio apresentou frequência de potenciais de ação de ~ 4 Hz em solução tamponada com HCO_3^- aerada com 5% de CO_2 (normocapnia). A hipercapnia aumentou sua frequência de potenciais de ação (13.2 ± 2.2 vs 3.9 ± 1.1 Hz; $p < 0.0001$) e despolarizou o RMP (-49.6 ± 2.1 vs -57.8 ± 1.9 mV; $p = 0.0009$), indicando que os neurônios do RTN registrados possuem sensibilidade intrínseca ao CO_2 (Figura 12, painéis A-D). Sua frequência de potenciais de ação (4.4 ± 1 vs 3.9 ± 1.1 Hz; $p > 0.99$) e RMP (-56.7 ± 3.5 vs -57.8 ± 1.9 mV; $p > 0.99$) foram normalizadas pela reexposição dos mesmos à normocapnia (Figura 12, painéis A-D). Adicionalmente, as análises de célula única da expressão do mRNA revelaram que esses neurônios do RTN expressam TASK2 e GPR4 (6 neurônios de 6 animais; Tabela 5).

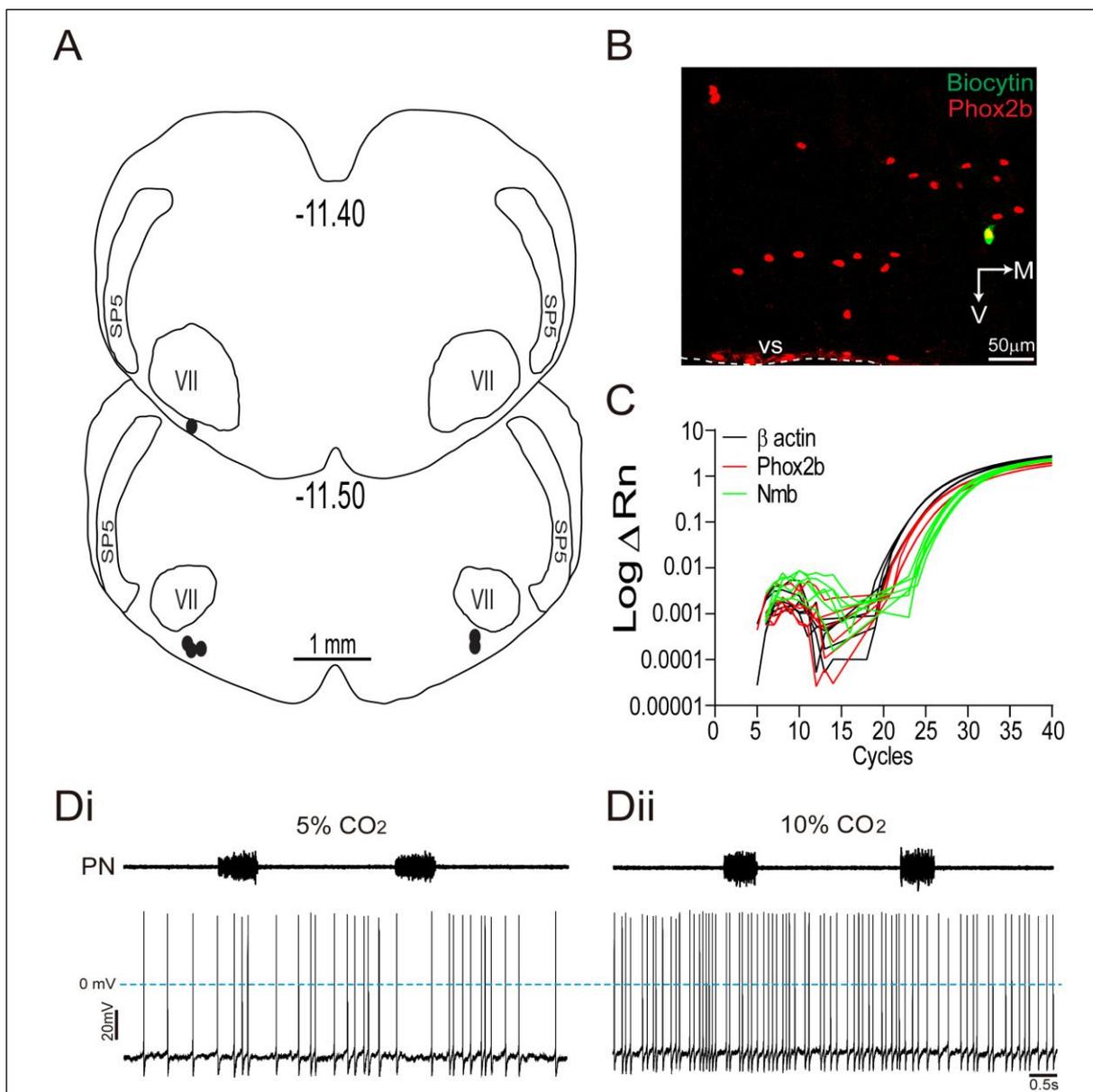


Figura 5 Localização e fenótipo dos neurônios do RTN e os efeitos da hipercapnia na sua frequência de potenciais de ação. (A) Desenhos esquemáticos de seções coronais do tronco cerebral mostrando a localização dos neurônios do RTN registrados (-11.40 mm e -11.50 mm do Bregma; 200-100 μ m rostral ao polo caudal do núcleo motor facial - VII) seguindo coordenadas publicadas (PAXINOS; WATSON, 2006). SP5: trato trigeminal espinhal. (B) Corte coronal do bulbo (-11.50 mm do Bregma; 100 μ m rostral ao polo caudal do VII) mostrando um neurônio representativo do RTN marcado com biocitina (verde) e imunofluorescência para Phox2b (vermelho). Note a marcação de Phox2b no núcleo do neurônio do RTN marcado (amarelo). vs: superfície ventral do bulbo; V: ventral; M: medial. (C) Média dos pontos de amplificação de qRT-PCR para β actina, Phox2b e Nmb de 6 neurônios do RTN de 6 animais. A emissão fluorescente (Δ Rn) é plotada contra o número de ciclos. Note que esses neurônios expressam Phox2b e Nmb. Registros originais da atividade do PN e registros em *current clamp* do potencial de membrana e potenciais de ação de um neurônio do RTN durante normocapnia (5% CO₂; Di) e hipercapnia (10% CO₂; Dii). Note o aumento da frequência de potenciais de ação durante a hipercapnia, indicando a sensibilidade ao CO₂.

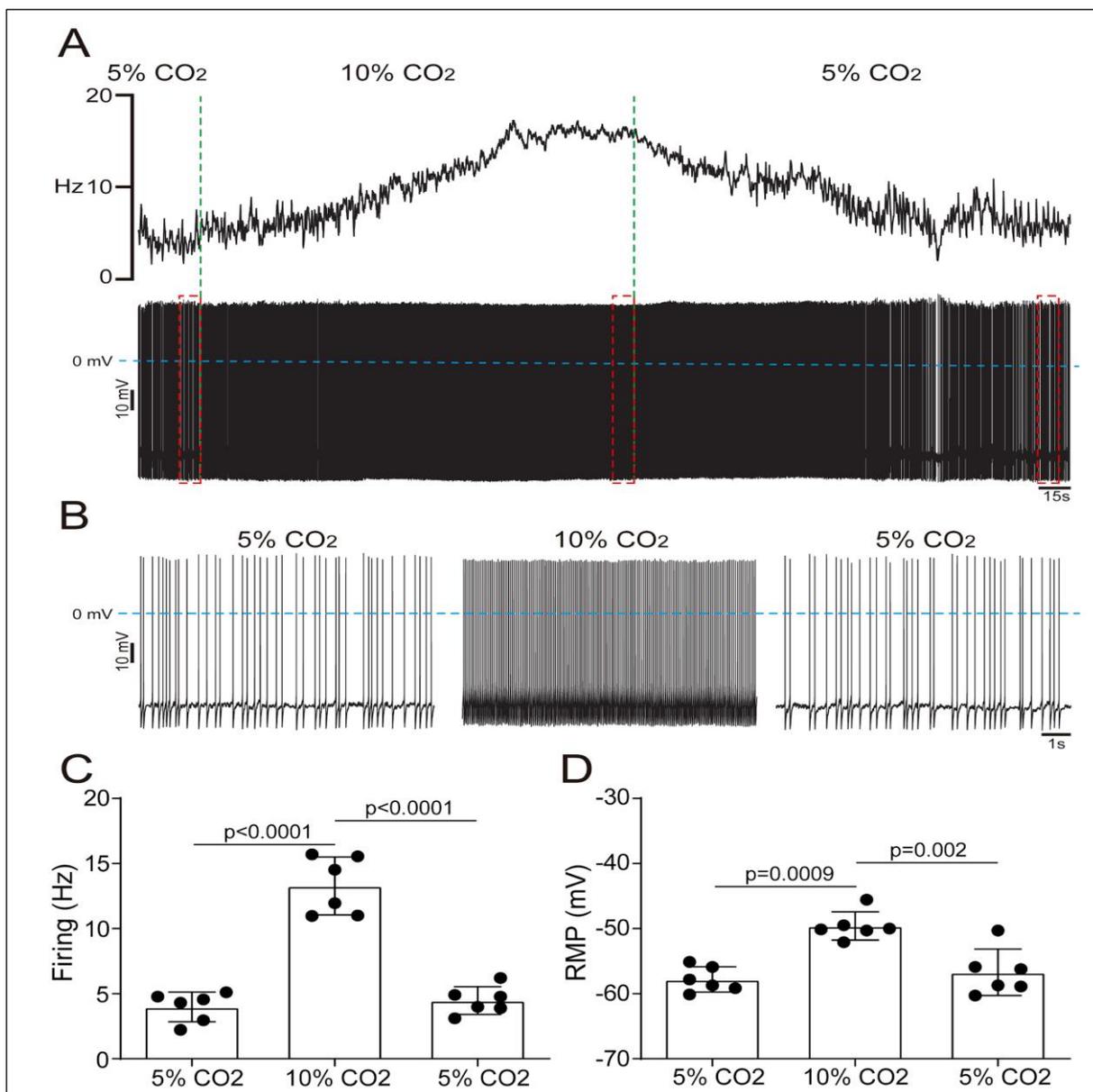


Figura 6 Sensibilidade intrínseca ao CO₂ dos neurônios do RTN. (A) Registros em *current clamp* e frequência de potenciais de ação instantânea (Hz) de um neurônio do RTN representativo durante normocapnia (5% CO₂) e hipercapnia (10% CO₂) após o bloqueio da transmissão sináptica rápida. (B) Magnificações de 10 s dos registros do potencial de membrana e de potenciais de ação no final de cada condição experimental (quadrados vermelhos em A). Dados agrupados da frequência de potenciais de ação (C; ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*) e RMP (D; ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*) dos neurônios do RTN durante normocapnia e hipercapnia (6 neurônios de 6 animais). Note que a hipercapnia aumentou a frequência de potenciais de ação e despolarizou o RMP dos neurônios do RTN, indicando sua sensibilidade intrínseca ao CO₂.

Tabela 5. Proporção da expressão do canal de vazamento para K⁺ e do receptor acoplado a proteína G ativado por H⁺ nos neurônios do RTN

| Neurônios do RTN | | | | | | |
|------------------|------|------|------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| TASK2 | 2.95 | 2.65 | 2.59 | 2.61 | 2.37 | 2.3 |
| GPR4 | 3.32 | 3.2 | 3.02 | 3.13 | 2.96 | 2.83 |

Seis neurônios de seis animais foram analisados. Os números representam o Ct do canal iônico/receptor, descritos no lado esquerdo da tabela para cada neurônio, o qual é normalizado pelo Ct do gene de referência ($\Delta Ct = Ct$ do canal iônico ou receptor – Ct da β -actina). Os quadrados vazios indicam detecção abaixo do limiar.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Nós demonstramos que os neurônios expiratórios da região pFL são glutamatérgicos, mas não expressam TH, ChAT ou os marcadores de neurônios do ePF, pFRG e RTN (Phox2b, Nmb, TASK ou GPR4), e que a inibição pós-sináptica rítmica relacionada a respiração (glicinérgica e GABAérgica) suprime sua atividade em normocapnia. Os mecanismos para o seu comportamento em *burst* no final da E2 durante a hipercapnia envolve a desinibição pós-sináptica e não excitação sináptica direta. Canais para Ca^{2+} LVA do tipo T, $[Ca^{2+}]$ intracelular e o PIR foram observados como moduladores de sua atividade. Adicionalmente, não observamos atividade de *burst* intrínseca ou sensibilidade intrínseca ao $CO_2/[H^+]$ após o bloqueio da transmissão sináptica rápida.

Neurônios expiratórios da região pFL são silentes (hiperpolarizados) em normocapnia devido a inibição pós-sináptica. Isso é consistente com estudos anteriores que mostraram que a desinibição bilateral da região pFL evoca atividade neuronal expiratória em *burst* localmente (DE BRITTO; MORAES, 2017; PAGLIARDINI et al., 2011). Experimentos em *voltage-clamp* revelaram a presença de inibição sináptica GABAérgica durante a Insp e a post-I. Essa modulação sináptica determina as oscilações relacionadas a respiração no Vm dos neurônios expiratórios da região pFL durante a normocapnia. Uma possível origem desses eventos sinápticos durante a Insp é o preBötC, que contem neurônios GABAérgicos e glicinérgicos que se projetam para a região pFL (BIANCARDI et al., 2021; KOIZUMI et al., 2013; YANG; FELDMAN, 2018). A hipercapnia aumenta a frequência de potenciais de ação dos neurônios inspiratórios do preBötC direta ou indiretamente via ativação de quimiorreceptores centrais (ABBOTT et al., 2009; GUYENET, 2014; KOIZUMI et al., 2010; SOLOMON; EDELMAN; O'NEAL, 2000). Portanto, o aumento da inibição sináptica para neurônios expiratórios da região pFL durante a Insp em resposta a hipercapnia pode ser relacionada a ativação dos neurônios inspiratórios GABAérgicos e glicinérgicos no preBötC.

O complexo Bötzinger (BötC) contem neurônios pós-inspiratórios que estão envolvidos com o controle da duração da fase expiratória (DEL NEGRO; FUNK; FELDMAN, 2018; RICHTER; SMITH, 2014). Esses neurônios são predominantemente glicinérgicos em ratos (EZURE; TANAKA; KONDO, 2003). Então, nós propomos que os neurônios pós-inspiratórios inibitórios glicinérgicos do

BötC produzem a inibição fásica dos neurônios expiratórios da região pFL durante a post-I. Isso é consistente com dados recentes que mostraram que a ativação do BötC eliminou a AE (FLOR et al., 2020) e que neurônios glicinérgicos do BötC projetam-se para a região pFL (BIANCARDI et al., 2021). Baseados em nossos dados eletrofisiológicos, nós sugerimos que essas conexões inibitórias previnem a atividade de *burst* dos neurônios expiratórios da região pFL até o final da E2 durante a hipercapnia e mantém esses neurônios silentes durante normocapnia. Durante a hipercapnia esses neurônios expiratórios escapam da inibição glicinérgica durante a post-I, gerando atividade de *burst* no final da E2. Nós propomos que esses neurônios pós-inspiratórios inibitórios glicinérgicos do BötC são diretamente hiperpolarizados por hipercapnia (KAWAI et al., 1996), então, reduzindo a inibição sináptica para neurônios expiratórios da região pFL durante esta fase do ciclo respiratório e a duração da post-I (ABDALA et al., 2009b; DE BRITTO; MORAES, 2017). É importante mencionar que a região pFL contem interneurônios GABAérgicos e glicinérgicos (BIANCARDI et al., 2021) e uma rede inibitória local também pode contribuir para o silenciamento dos neurônios expiratórios durante a normocapnia, embora seus padrões de atividade (tônico ou modulado pela respiração) ainda não tenham sido descritos.

Nossos estudos demonstram que a atividade em *burst* e a despolarização dos neurônios do pFL no final da E2 não é dependente da presença de excitação sináptica uma vez que o aumento das sEPSCs não foi observado em nenhuma fase do ciclo respiratório durante a hipercapnia. Além disso, é improvável que esses sEPSCs estejam modulando a atividade expiratória durante a hipercapnia devido a aumentos no R_i , como consequência da desinibição, caso contrário, a frequência de potenciais de ação também deveria ocorrer durante a post-I, quando a frequência das sIPSCs glicinérgicas foi reduzida. Embora não possamos descartar a presença das sEPSCs em dendritos distais, nós estamos confiantes que a excitação sináptica não é importante para a atividade de *burst* dos neurônios da região pFL uma vez que um antagonista de receptores glutamatérgicos ionotrópicos aplicado localmente não afetou sua frequência de potenciais de ação (DE BRITTO; MORAES, 2017). Por outro lado, um estudo recente identificou fortes projeções de neurônios glutamatérgicos do RTN positivos para Phox2b para a região pFL (BIANCARDI et al., 2021) e essas projeções tem sido propostas como evidencia anatômica direta da modulação excitatória de quimiorreceptores centrais mediando a AE (HUCKSTEPP

et al., 2015; TAKAKURA; MALHEIROS-LIMA; MOREIRA, 2021; ZOCCAL et al., 2018). Baseados em nossos dados eletrofisiológicos, é mais provável que os neurônios do RTN que expressam Phox2b mediem a AE via conexões com outros neurônios da região pFL, que não esses expiratórios, ou até mesmo por conexões diretas com neurônios bulbo espinhais pré-motores no cVRG, como recentemente demonstrado (SOUZA et al., 2020).

Estudos recentes *in silico* propuseram um mecanismo dependente da I_{NaP} para o suposto comportamento de *burst* dos neurônios expiratórios da região pFL em ratos jovens (ABDALA et al., 2009b; MOLKOV et al., 2010; WITTMEIER et al., 2008). Nossos experimentos mostram ausência de atividade ritmogênica intrínseca em *burst* e da I_{NaP} em neurônios expiratórios da região pFL de ratos jovens. Adicionalmente, o riluzole em 20 μ M, o qual elimina a I_{NaP} (DEL NEGRO et al., 2005; KOIZUMI; SMITH, 2008; MORAES et al., 2013) e ativa canais TREK2 (KIM; KANG; HAN, 2011) em outros neurônios, não afetou a atividade tônica e o g_{Leak} dos neurônios expiratórios da região pFL após o bloqueio da transmissão sináptica rápida. Portanto, o surgimento da atividade fásica dos neurônios expiratórios da região pFL induzida por hipercapnia não depende de oscilações neuronais intrínsecas, o que é diferente dos mecanismos demonstrados em neurônios inspiratórios oscilatórios do preBötC *in vitro* (KOIZUMI; SMITH, 2008; SMITH et al., 1991) e da geração da respiração ofegante (*gaspig*) *in situ* (PATON, 1996; ST.-JOHN et al., 2009). Isso é consistente com dados recentes mostrando que a região pFL não induz atividade expiratória fásica (AE) na ausência da atividade do preBötC (HUCKSTEPP et al., 2016). Apesar de valores similares de capacitância, os neurônios expiratórios glutamatérgicos da região pFL são mais despolarizados e tem maior R_i que os neurônios inspiratórios glutamatérgicos do preBötC (KOIZUMI et al., 2013). Essas diferenças podem ser explicadas por valores altos de g_{Leak} dominada por K^+ descrita em neurônios glutamatérgicos do preBötC (KOIZUMI et al., 2013). Portanto, os dados celulares demonstram que essas duas populações neuronais têm propriedades eletrofisiológicas distintas que determinam a sua geração de *burst*, sendo uma intrínseca (preBötC) e a outra condicional (pFL).

Neurônios expiratórios da região pFL expressam mRNA para TREK1 e apresentam uma corrente de vazamento clássica, a qual é essencialmente linear em uma faixa de voltagem subliminar, após o bloqueio de uma série de canais dependentes de voltagem. Os nossos dados sugerem que há uma pequena

contribuição da corrente catiônica de entrada que se opõe a corrente de saída de K^+ , determinando o E_{leak} . Essa corrente catiônica de entrada pode surgir de uma condutância para cátion não-seletiva mediada pelo canal $Nalc_n$, o qual é expresso em neurônios do RTN e do preBötC (SHI et al., 2016; YEH et al., 2017), e revelada por nós em neurônios expiratórios da região pFL. Correntes de vazamento dominadas por K^+ desempenham papel importante no controle do RMP, propriedades do AP, excitabilidade neuronal e são alvo para ação de neuromoduladores (BAYLISS; SIROIS; TALLEY, 2003; LESAGE, 2003; TALLEY et al., 2000). Correntes de vazamento para K^+ são frequentemente mediadas por subunidades de canais K2P (PATEL; HONORÉ, 2001). Entre eles, os canais TASK são abundantemente expressos no tronco cerebral e medeiam o principal componente da g_{Leak} , bem como a sensibilidade ao $CO_2/[H^+]$, em neurônios respiratórios e motoneurônios (BAYLISS et al., 2001, 2015; BERG et al., 2004; KOIZUMI et al., 2010; LESAGE, 2003; WANG et al., 2013; WASHBURN et al., 2002; WASHBURN; BAYLISS; GUYENET, 2003). Porém, a expressão de mRNA dos TASK1, TASK2 e TASK3 não foi observada nos neurônios expiratórios da região pFL, reforçando a nossa conclusão de que eles não são quimiossensíveis.

Nós registramos a I_h e descrevemos a presença do sag despolarizante nos neurônios expiratórios da região pFL. Essa corrente pode estar envolvida na integração dos eventos sinápticos excitatórios e na prevenção da hiperpolarização prolongada ou excessiva em resposta a eventos sinápticos inibitórios nos neurônios expiratórios da região pFL, como demonstrado em outros neurônios (MACCAFERRI et al., 1993; MAGEE, 1999). Nós também descrevemos a presença de quatro isoformas do canal HCN (HCN 1-4), as quais diferem em propriedades de ativação e desativação e sensibilidade a voltagem e cAMP (COMBE; GASPARINI, 2021), sugerindo que os canais HCN podem formar heterômeros nos neurônios expiratórios da região pFL. Os canais HCN também são alvos para ação de neuromoduladores da geração central da AE. A ativação de receptores muscarínicos na região pFL recruta neurônios expiratórios e induz AE em ratos (BOUTIN; ALSAHAFI; PAGLIARDINI, 2017). Esses receptores, mediados pela ativação de fosfolipase C, aumentam diretamente a abertura dos canais HCN1 e HCN2 (PIAN et al., 2007). Portanto, a possível implicação funcional da modulação dos canais HCN pela acetilcolina na região pFL parece ter alguma similaridade com os efeitos da redução

da inibição pós-sináptica para os neurônios expiratórios em resposta a hipercapnia (aumento na excitabilidade neuronal).

Uma despolarização seguida por *bursts* de potenciais de ação (PIR), bem como correntes de Ca^{2+} mediadas por canais LVA e as isoformas Cav3.1/3.2 dos canais para Ca^{2+} do tipo T também foram observadas nos neurônios expiratórios da região pFL. O PIR desempenha papel importante no padrão respiratório rítmico pela contribuição da iniciação do *burst* seguida da inibição neuronal (MORAES; MACHADO, 2015; RICHTER et al., 1993; SUN; BERKOWITZ; PILOWSKY, 2008). Estudos anteriores demonstraram que a ativação dos canais para Ca^{2+} LVA do tipo T medeia o PIR (MATSUSHIMA et al., 1993; TEGNÉR et al., 1997), enquanto que o *knockout* da isoforma Cav3.1 aboliu esse fenômeno (KIM et al., 2001). Nossos experimentos revelaram que a isoforma Cav3.2 está mediando o PIR nos neurônios expiratórios da região pFL, uma vez que esta é a única isoforma dos canais para Ca^{2+} LVA do tipo T sensível à 50 μM de NiCl_2 (KANG et al., 2006). Canais para Ca^{2+} LVA do tipo T normalmente são ativados entre -70mV e -50mV (PEREZ-REYES, 2003) com as curvas de ativação e inativação produzindo uma janela de corrente (faixa de voltagens na qual esses canais podem abrir, mas não inativar completamente) com pico em -37mV (COSTA; VARANDA, 2007; PEREZ-REYES, 2003). Isso indica que uma fração dos canais está apta para abrir nesta voltagem, a qual é muito próxima da voltagem registrada durante a E2 (-39 mV), imediatamente antes do *burst* dos neurônios expiratórios da região pFL durante a hipercapnia. É possível que a ativação dos canais para Ca^{2+} LVA do tipo T, acompanhada da desinibição pós-sináptica, induza o PIR na E2 em neurônios expiratórios da região pFL, levando o V_m próximo ao limiar para geração de potenciais de ação. Nós analisamos o papel da $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular na geração dos *bursts* pelos neurônios expiratórios durante a hipercapnia usando alta concentração de BAPTA. Isso aboliu o *burst*, sem afetar o V_m durante a *Insp* e a *post-I*. Esses dados demonstraram que a $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular contribui predominantemente para a geração de *burst* na E2 impulsionando a transformação da desinibição pós-sináptica para despolarização da membrana. Nós não podemos descartar a contribuição da corrente catiônica não-específica ativada por Ca^{2+} (I_{CAN}), a qual está envolvida com a atividade em *burst* dos neurônios inspiratórios do preBötC (PACE et al., 2007) e é diretamente ativada por canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem (REKLING; FELDMAN, 1997); uma questão que requer estudos adicionais. A presença de correntes de Ca^{2+} nos

neurônios expiratórios também pode ativar canais para K^+ modulados pelo Ca^{2+} de alta condutância, os quais controlam a frequência de potenciais de ação neuronal gerando adaptação de sua frequência (LIN et al., 2014; MORAES; MACHADO; PATON, 2014), a qual nós encontramos em neurônios da região pFL.

O pFRG e o RTN contém neurônios sensíveis ao $CO_2/[H^+]$ (MULKEY et al., 2004; ONIMARU; IKEDA; KAWAKAMI, 2008). Esses neurônios expressam Phox2b, Nmb, são glutamatérgicos e projetam-se para as regiões geradoras do padrão respiratório no tronco cerebral (ONIMARU; IKEDA; KAWAKAMI, 2008; SHI et al., 2017; STORNETTA et al., 2006). Ativação dos neurônios Phox2b e Nmb potencializa a atividade respiratória em ratos adultos e em preparações *in vitro* de ratos neonatos (ABBOTT et al., 2009; IKEDA et al., 2019; SOUZA et al., 2020). Isso é consistente com o papel proposto para sensores centrais ao $CO_2/[H^+]$ que funcionam para gerar modulação excitatória tônica para o gerador do padrão respiratório do tronco cerebral (GUYENET, 2014). Nós observamos que os neurônios expiratórios da região pFL são glutamatérgicos e não possuem sensibilidade intrínseca ao $CO_2/[H^+]$ em ratos jovens. Eles estão localizados mais lateralmente em relação aos neurônios Phox2b/Nmb sensíveis ao $CO_2/[H^+]$ e não expressam Phox2b (DE BRITTO; MORAES, 2017) ou Nmb. Adicionalmente, a expressão de canais iônicos e receptores sensíveis ao $CO_2/[H^+]$ (TASK e GPR4) não foram observados nos neurônios expiratórios. Considerando que a ativação dos neurônios Phox2b/Nmb do RTN aumenta a respiração, também por evocar a AE em ratos (SOUZA et al., 2020), é possível que um subgrupo dos neurônios expiratórios da região pFL insensíveis ao $CO_2/[H^+]$ expressem níveis muito baixos de mRNA para Phox2b e Nmb, os quais não foram detectados em nossas análises pelo PCR de uma única célula, embora a proteína Phox2b nunca tenha sido observada nesses neurônios (DE BRITTO; MORAES, 2017). Entretanto, a vasta maioria dos neurônios Nmb transfectados no estudo de Souza *et al.* (2020) estavam localizados mais medial e caudalmente que os neurônios expiratórios da região pFL registrados no nosso estudo. Portanto, as diferenças funcionais (quimiossensibilidade) e moleculares (fenótipo) entre neurônios expiratórios da região pFL e neurônios do RTN descritas aqui reforçam as conclusões de que essas regiões desempenham papel distintos no controle da respiração (PISANSKI; PAGLIARDINI, 2018; TAKAKURA; MALHEIROS-LIMA; MOREIRA, 2021). Estudos anteriores demonstraram que a integridade da região pFL é importante para a expressão da AE em ratos (ABDALA et al., 2009b; DE

BRITTO; MORAES, 2017; HUCKSTEPP et al., 2015, 2018). Entretanto, até o momento, nenhum estudo demonstrou as projeções dos neurônios expiratórios da região pFL. Nós encontramos que esses neurônios possuem projeções ipsilaterais para o cVRG com posições próximas a supostos neurônios pré-motores abdominais; isso é consistente com um papel na AE. Agora, novos estudos são requeridos para investigar se os alvos no cVRG dos neurônios Phox2b/Nmb do RTN e dos neurônios expiratórios da região pFL são diferentes e quais consequências funcionais isso tem.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Neste capítulo concluímos que os neurônios expiratórios da região pFL são glutamatérgicos, mas não quimiossensíveis (ex: ausência de sensibilidade intrínseca ao $\text{CO}_2/[\text{H}^+]$), que a desinibição pós-sináptica fásica relacionada a respiração (glicinérgica) determina seu comportamento em *burst* no final da E2 durante hipercapnia e que a isoforma Cav3.2 dos canais para Ca^{2+} LVA do tipo T e a $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular determinam seu padrão de atividade fásica, mas atividade intrínseca de *burst* não foi observada.

Portanto, a desinibição pós-sináptica dos neurônios expiratórios e suas propriedades eletrofisiológicas distintas desempenham papéis essenciais na geração de oscilações expiratórias na região pFL de ratos em resposta a hipercapnia.

Capítulo III

Contribuição dos neurônios da região parafacial lateral para a modulação expiratória da atividade simpática e da função cardiovascular

RESUMO

MAGALHÃES, Karolyne Silva. **Neurônios da Região parafacial lateral: características eletrofisiológicas, geração da expiração ativa e modulação da atividade simpática e função cardiovascular.** Capítulo III: Contribuição dos neurônios da região parafacial lateral para a modulação expiratória da atividade simpática e da função cardiovascular. 217 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2023.

O ciclo respiratório em repouso apresenta uma fase inspiratória ativa, enquanto a fase expiratória é passiva do ponto de vista mecânico. A expiração ativa (AE) é recrutada sob aumento da demanda respiratória, resultando em um mecanismo compensatório essencial para aumentar a ventilação pulmonar. Uma série de estudos demonstrou que os neurônios da região parafacial lateral (pFL) são importantes para gerar a AE e que a AE aumenta a atividade simpática em condições de elevada demanda respiratória. Sabe-se que os neurônios pré-simpáticos do bulbo rostral ventrolateral (RVLM), modulados pela respiração, contribuem para a atividade vasomotora simpática. Além disso, os neurônios do RVLM aumentam sua atividade simultaneamente com a AE em condições de aumento da demanda respiratória. No entanto, o envolvimento dos neurônios da região pFL no controle da função cardiovascular ainda é desconhecido. Neste capítulo, nós investigamos a participação dos neurônios da região pFL na modulação expiratória dos neurônios pré-simpáticos do RVLM e da atividade simpática, e conseqüentemente, da função cardiovascular de ratos. Para isso, os neurônios da região pFL de ratos foram ativados por meio da optogenética e farmacogenética, em experimentos *in situ*, *in vitro* e *in vivo*, após transfecção com vetor viral adeno-associado (AAV) para expressar a *channelrhodopsin 2* (ChR2) ou os receptores exclusivamente ativados por drogas projetadas (DREADDs) - HM3D(Gq). A fotoestimulação provocou aumento da atividade dos neurônios da região pFL que expressavam a ChR2, bem como evocou a AE e alterou o padrão respiratório (redução da frequência respiratória (fR) e da duração da inspiração (DI), aumento da duração da expiração (DE)) de preparações *in situ* de ratos. Além disso, a fotoestimulação dos neurônios da região pFL foi capaz de aumentar a atividade simpática, simultaneamente com a AE, a amplitude da modulação respiratória da pressão arterial (ondas de Traube-Hering) e evocou a modulação expiratória dos neurônios pré-simpáticos catecolaminérgicos do RVLM. Em relação aos experimentos com a farmacogenética, os registros *in vitro* em fatias agudas do bulbo confirmaram que a superfusão de N-óxido de clozapina (CNO) estimulou os neurônios da região pFL que expressavam o HM3D(Gq). Nos experimentos *in vivo* em ratos não anestesiados, a injeção intraperitoneal de CNO diminuiu a DI e aumentou a DE, mas não provocou alteração da fR de ratos que expressavam o HM3D(Gq) em neurônios da região pFL. Adicionalmente, o CNO aumentou a pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e pressão arterial média, mas não provocou alteração da frequência cardíaca. Por outro lado, o veículo do CNO não provocou alterações respiratórias e cardiovasculares em ratos que expressavam o HM3D(Gq) nos neurônios da região pFL. Por fim, o CNO não foi capaz de provocar alterações cardiovasculares em ratos que não expressavam o HM3D(Gq) nos neurônios da região pFL. Em conjunto, esses dados indicam que os neurônios da região pFL contribuem para a modulação expiratória dos neurônios pré-simpáticos catecolaminérgicos do RVLM e da atividade simpática, bem como da função vascular de ratos.

Palavras-chaves: Região parafacial lateral. Acoplamento simpático-respiratório. Expiração ativa. Função vascular.

ABSTRACT

MAGALHÃES, Karolyne Silva. **Lateral parafacial region neurons: electrophysiological characteristics, active expiration generation and modulation of sympathetic activity and cardiovascular function.** Chapter III: Contribution of neurons in the lateral parafacial region to the expiratory modulation of sympathetic activity and cardiovascular function. 217 p. Thesis (Doctorate) – School of Medicine of Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2023.

The respiratory cycle at rest has an active inspiratory phase, while the expiratory phase is passive from a mechanical point of view. Active expiration (AE) is recruited under increased respiratory demand, resulting in an essential compensatory mechanism to increase pulmonary ventilation. Several studies have shown that neurons in the lateral parafacial (pFL) region are important for generating AE and that AE increases sympathetic activity under conditions of high respiratory demand. It is known that pre-sympathetic neurons in the rostral ventrolateral medulla (RVLM), modulated by respiration, contribute to sympathetic vasomotor activity. In addition, RVLM neurons increase their activity simultaneously with AE under conditions of increased respiratory demand. However, the involvement of pFL neurons in the control of cardiovascular function is still unknown. In this chapter, we investigated the involvement of pFL neurons in the expiratory modulation of RVLM pre-sympathetic neurons and sympathetic activity, and consequently in the cardiovascular function of rats. To this end, pFL neurons of rats were activated using optogenetics and pharmacogenetics, in *in situ*, *in vitro* and *in vivo* experiments, after transfection with adeno-associated viral vector (AAV) to express channelrhodopsin 2 (ChR2) or Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs (DREADDs) - HM3D(Gq). Photostimulation produced an increase in the activity of neurons in the pFL region expressing ChR2, as well as evoked AE and changed the respiratory pattern [reduced respiratory rate (fR) and duration of inspiration (DI) and increased duration of expiration (DE)] of *in situ* preparations from rats. In addition, photostimulation of neurons in the pFL region was able to increase sympathetic activity simultaneously with AE, the amplitude of respiratory modulation of blood pressure (Traube-Hering waves) and evoked expiratory modulation of catecholaminergic presympathetic neurons in the RVLM. Regarding the pharmacogenetic experiments, *in vitro* recordings in acute medullary slices confirmed that clozapine N-oxide (CNO) superfusion activated neurons in the pFL region expressing HM3D(Gq). In *in vivo* experiments using unanesthetized rats, intraperitoneal injection of CNO decreased DI and increased DE, but did not affect the fR of rats expressing HM3D(Gq) in neurons of the pFL region. In addition, CNO increased systolic blood pressure, diastolic blood pressure and mean arterial pressure, but did not change the heart rate. On the other hand, the CNO vehicle did not produce respiratory or cardiovascular changes in rats expressing HM3D(Gq) in neurons of the pFL region. Finally, CNO was unable to affect the cardiovascular parameters of rats that did not express HM3D(Gq) in neurons of the pFL region. Taken together, these data indicate that pFL neurons contribute to expiratory modulation of RVLM catecholaminergic pre-sympathetic neurons and sympathetic activity, as well as vascular function in rats.

Keywords: Lateral parafacial region. Sympathetic-respiratory coupling. Active expiration. Vascular function.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O ciclo respiratório em repouso apresenta uma fase inspiratória ativa, enquanto que a expiração é um processo passivo do ponto de vista mecânico (DEL NEGRO; FUNK; FELDMAN, 2018; SMITH, 2022). A expiração ativa (AE) é recrutada com o aumento da demanda respiratória, resultando em um mecanismo compensatório essencial para aumentar a ventilação pulmonar (JENKIN; MILSOM, 2014). Uma série de estudos tem demonstrado que neurônios da região pFL são importantes para gerar a AE em resposta ao aumento da demanda respiratória como em situações de hipercapnia/acidose e hipóxia (ABDALA et al., 2009b; JANCZEWSKI; FELDMAN, 2006; MORAES; ZOCCAL; MACHADO, 2012c).

A interação entre os sistemas respiratório e cardiovascular tem sido estudada desde a segunda metade do século XIX, a qual observou-se inicialmente oscilações respiratórias da pressão arterial, posteriormente denominadas ondas Traube-Hering (THW) (HERING, 1869; TRAUBE, 1865). Essas oscilações provêm de contrações fásicas da vasculatura arterial devido à atividade rítmica do sistema autonômico simpático (BRONK et al., 1936). Parte da atividade rítmica do sistema simpático é devido ao acoplamento simpático-respiratório, caracterizado pela modulação respiratória da atividade simpática, a qual foi observada pela primeira vez em 1932 por Adrian e Bronk. Esses autores observaram aumento da atividade simpática cervical no final da inspiração (Insp) em coelhos anestesiados (ADRIAN; BRONK; PHILLIPS, 1932). Na década de 80, observou-se que os nervos simpáticos cervicais e lombares apresentam oscilações rítmicas durante a pós-inspiração (post-I), com diminuição da atividade durante a Insp, em ratos anestesiados e vagotomizados, sugerindo que a modulação respiratória da atividade simpática é gerada no sistema nervoso central (HASELTON; GUYENET, 1989; NUMAO et al., 1987). De fato, anos mais tarde, observou-se que a apneia de origem central foi capaz de diminuir a atividade do nervo simpático torácico (tSN), associada à redução da pressão arterial e eliminação das THW (SIMMS et al., 2009). Simms e colaboradores (2009) observaram que a restauração da eupneia foi capaz de restaurar a modulação respiratória do tSN, com aumentos dos níveis da pressão arterial e reestabelecimento das ondas de THW. Sendo assim, a interação entre esses dois sistemas é importante para garantir a perfusão adequada de O₂ e nutrientes para o

organismo, bem como garantir a eliminação de CO₂ e metabólitos (SIMMS et al., 2010; ZOCCAL; PATON; MACHADO, 2009).

É bem estabelecido que o bulbo rostral ventrolateral (RVLM) contém neurônios pré-simpáticos bulbo-espinhais catecolaminérgicos (C1) e não catecolaminérgicos (KANJHAN et al., 1995; MORAES et al., 2013; SCHREIHOFER; GUYENET, 1997; STORNETTA et al., 2002). Ambos os neurônios C1 e não C1 são glutamatérgicos, mas somente os neurônios C1 são adrenérgicos (HOKFELT et al., 1974), e alguns expressam o fator de transcrição Phox2b (ABBOTT et al., 2013; MARINA et al., 2010). Os neurônios pré-simpáticos do RVLM projetam-se diretamente para neurônios simpáticos pré-ganglionares localizados na coluna intermédia lateral da medula espinhal, que por sua vez, são responsáveis pela atividade vasomotora simpática (DAMPNEY et al., 2003; GUYENET; STORNETTA, 2022). Na década de 80, Dampney e colaboradores observaram que a excitação dos neurônios do RVLM, por meio de microinjeções de glutamato de sódio ou estimulação elétrica, foi capaz de aumentar a pressão arterial (DAMPNEY, 1981; DAMPNEY et al., 1982). Por outro lado, microinjeções de GABA, ou a lesão bilateral do RVLM, causaram redução da pressão arterial e bradicardia (ROSS et al., 1984). Anos mais tarde, por meio de registros intracelulares e extracelulares, observou-se diferentes subtipos de neurônios pré-simpáticos no RVLM, os quais apresentavam diferentes padrões de frequência de potenciais de ação de acordo com fase do ciclo respiratório (HASELTON; GUYENET, 1989; MORAES et al., 2013). Entre os diferentes padrões de atividade observados nos neurônios do RVLM, alguns deles aumentam sua atividade na Insp/post-I, podendo assim determinar o padrão de modulação respiratória em vários ramos dos nervos vasomotores simpáticos (HASELTON; GUYENET, 1989; MACHADO; ZOCCAL; MORAES, 2017; MORAES et al., 2013; NUMAO et al., 1987).

Os diferentes padrões de modulação respiratória observados nos neurônios do RVLM podem ser explicados pela transmissão sináptica direta de diferentes neurônios respiratórios. Dessa forma, existem algumas evidências sobre a origem da modulação respiratória da atividade simpática (Figura 1). Recentemente, Menuet e colaboradores identificaram que a modulação inspiratória dos neurônios pré-simpáticos do RVLM parece ser mediada pela transmissão sináptica direta dos neurônios do complexo pré-Bötzinger (preBötC). Neste sentido, a fotoinibição dos

neurônios do preBötC reduziu a atividade vasomotora simpática (MENUET et al., 2020). Adicionalmente, em condições basais, os neurônios localizados na região dorsolateral da ponte desempenham um papel importante nas oscilações respiratórias da atividade simpática. Baekey e colaboradores (2010) observaram que transecções pontino-bulbares eliminaram a modulação respiratória da atividade simpática. Esses autores sugeriram que os neurônios localizados na região dorsolateral da ponte podem modular diretamente a atividade dos neurônios pré-simpáticos do RVLM via transmissão sináptica excitatória direta (BAEKEY et al., 2010).

O acoplamento simpático-respiratório aumenta em condições de desafios respiratórios, tais como durante a hipercapnia (MOLKOV et al., 2011), hipóxia aguda (BRAGA et al., 2007; DICK et al., 2004; MORAES et al., 2012), e hipóxia crônica intermitente (CIH) (MORAES; ZOCCAL; MACHADO, 2012a; ZOCCAL et al., 2008), para gerar um ajuste acoplado dos sistemas cardiovascular e respiratório nessas condições. Como dito anteriormente, essas condições experimentais recrutam a AE e produzem aumento simultâneo na atividade vasomotora simpática no final da segunda fase da expiração (E2) (MOLKOV et al., 2011; MORAES; ZOCCAL; MACHADO, 2012a; ZOCCAL et al., 2008). Essa alteração no padrão da modulação respiratória da atividade vasomotora simpática também aumenta a amplitude das THW (MORAES et al., 2012). Além disso, os neurônios pré-simpáticos do RVLM de ratos expostos à CIH apresentam aumento na frequência dos potenciais de ação e na excitação sináptica excitatória simultaneamente com a AE (MORAES et al., 2013). Em conjunto, esses dados sugerem que os neurônios expiratórios da região pFL envolvidos na geração da AE modulam os neurônios pré-simpáticos do RVLM de ratos em condições de desafios respiratórios (MACHADO; ZOCCAL; MORAES, 2017; MOLKOV et al., 2011).

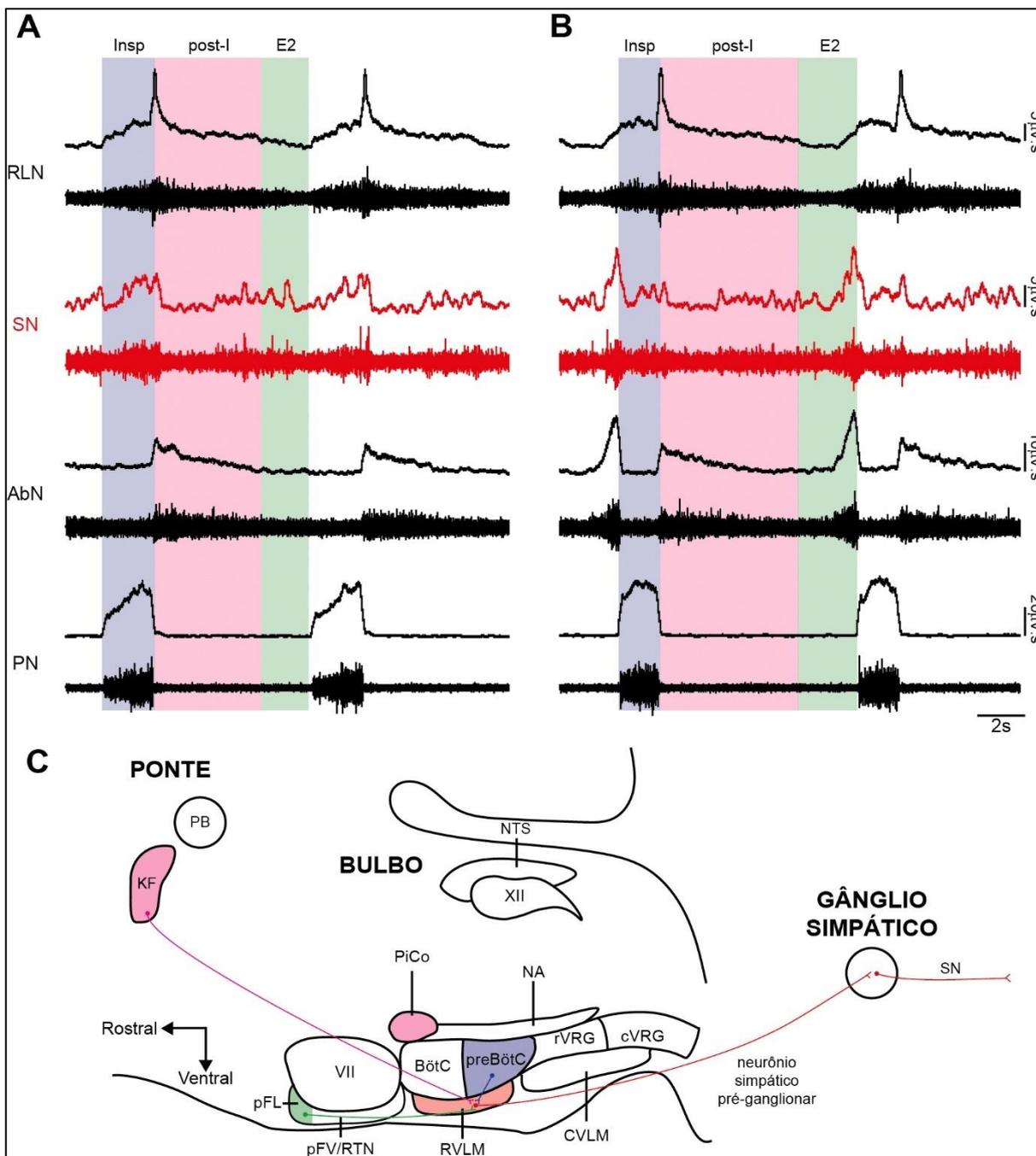


Figura 1. Padrão respiratório e atividade simpática de ratos e modelo esquemático dos possíveis núcleos respiratórios e simpático do tronco encefálico envolvidos com a geração da modulação respiratória da atividade simpática. Registros integrados e originais das atividades dos nervos laríngeo recorrente (RLN), simpático (SN), abdominal (AbN) e frênico (PN) de preparações *in situ* de um rato mantido em normóxia (A) e um rato exposto a hipóxia crônica intermitente (CIH) (B), mostrando as três fases do ciclo respiratório: inspiração (Insp, em azul), pós-inspiração (post-I, em rosa) e segunda fase da expiração (E2, em verde). Observe a presença da atividade motora elevada no final da E2 no AbN - expiração ativa (AE) - e a simpato-excitação simultânea no SN em ratos expostos à CIH. (C) Representação esquemática de um corte sagital do tronco encefálico de rato contendo as regiões envolvidas na geração central do padrão respiratório e da atividade vasomotora simpática. Os núcleos envolvidos com a geração da Insp (Complexo preBötzingler - preBötC), post-I (Kölliker-Fuse - KF e Complexo Pós-Inspiratório - PiCo) e da AE (região parafacial lateral - pFL) estão destacados em azul, rosa e verde, respectivamente. Já a atividade vasomotora simpática é dependente da atividade dos neurônios pré-simpáticos localizados no bulbo rostral ventrolateral (RVLM). Propõe-se que a modulação Insp e post-I da atividade simpática é dependente das projeções dos neurônios do preBötC

e do KF com os neurônios pré-simpáticos do RVLM. Por outro lado, em condições de aumento da demanda respiratória, ou condições patológicas como no modelo de CIH, acredita-se que a modulação expiratória da atividade simpática é dependente dos neurônios expiratórios da região pFL (BAEKEY et al., 2010; MACHADO; ZOCCAL; MORAES, 2017; MENUET et al., 2020; MOLKOV et al., 2011). BötC: Complexo Bötzingger, cVRG: Grupo respiratório ventral caudal, NA: Núcleo Ambíguos, NTS: Núcleo do Trato Solitário, PB: Núcleo Parabraquial, pFV/RTN: Região parafacial ventral/Núcleo Retrotrapezóide, rVRG: Grupo respiratório ventral rostral, VII: Núcleo motor facial, XII: Núcleo Hipoglosso.

O acoplamento simpático-respiratório anormal pode ter implicações patológicas, como no desenvolvimento da hipertensão arterial (MACHADO; ZOCCAL; MORAES, 2017; MORAES; MACHADO; ZOCCAL, 2014). Por exemplo, indivíduos que sofrem de apneia obstrutiva do sono (OSA), os quais são expostos à episódios de CIH, apresentam alteração da modulação respiratória da atividade simpática, observada no deslocamento do pico da atividade simpática ao longo do ciclo respiratório, e podem desenvolver hipertensão arterial (DEMPSEY et al., 2010). Adicionalmente, indivíduos pré-hipertensos apresentam aumento da modulação respiratória da pressão arterial (MENUET et al., 2017). Considerando que as alterações na modulação expiratória da atividade vasomotora simpática afetam os níveis de pressão arterial e podem contribuir com o desenvolvimento da hipertensão arterial, torna-se essencial investigar a origem da modulação expiratória da atividade simpática. Considerando seu papel na geração da AE, é fundamental investigar o papel dos neurônios da região pFL na modulação da atividade simpática e da função cardiovascular. Neste capítulo, levantamos a hipótese de que a ativação dos neurônios da região pFL produz modulação expiratória dos neurônios pré-simpáticos do RVLM e da atividade simpática, determinando assim a função vascular de ratos. Os dados obtidos podem ajudar a esclarecer o papel dos neurônios da região pFL como possível substrato patológico para o desenvolvimento de distúrbios cardiovasculares, como a hipertensão arterial.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos da ativação dos neurônios da região pFL sobre o padrão respiratório, a atividade dos neurônios pré-simpáticos do RVLM, a atividade simpática, pressão arterial e frequência cardíaca de ratos.

2.2. Objetivos específicos

- 2.2.1.** Investigar o efeito da ativação dos neurônios da região pFL no padrão respiratório de preparações *in situ* ratos.
- 2.2.2.** Investigar o efeito da ativação dos neurônios da região pFL na atividade simpática e nas THW de preparações *in situ* ratos.
- 2.2.3.** Investigar o efeito da ativação dos neurônios da região pFL na atividade dos neurônios pré-simpáticos do RVLM de preparações *in situ* ratos.
- 2.2.4.** Investigar o efeito da ativação dos neurônios da região pFL nos parâmetros respiratórios de ratos não anestesiados com livre movimentação.
- 2.2.5.** Investigar o efeito da ativação dos neurônios da região pFL nos parâmetros cardiovasculares de ratos não anestesiados com livre movimentação.

Métodos

3. MÉTODOS

3.1. Animais e aprovação ética

Utilizamos 39 ratos machos Wistar (25 nos estudos *in situ*, 3 nos estudos *in vitro* e 11 nos estudos *in vivo*; 4 semanas de idade) provenientes do Serviço de Biotério do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP), Brasil. O Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, aprovou todos os protocolos de Experimentação Animal (nº 3/2019). Os animais foram alojados em um ciclo claro/escuro de 12 horas a uma temperatura constante (22 ± 1 °C) com acesso *ad libitum* a ração padrão para ratos e água.

3.2. Vetores virais

Nos experimentos com preparações *in situ*, o vírus adeno-associado (AAV) que expressa a *channelrhodopsin 2* (ChR2), e a proteína fluorescente YFP, sob o controle do promotor sinapsina (Syn-ChR2-YFP) foi produzido, caracterizado e titulado na Addgene (Watertown, MA, USA). A ChR2 é um canal para cátion não seletivo capaz de absorver a luz no comprimento de onda de 473 nm, causando uma mudança conformacional que permite o influxo de cátions. Quando expressos em neurônios, sua abertura gera rápida despolarização, que pode desencadear potenciais de ação (CARTER et al., 2022). Um AAV que expressa a YFP sob o controle do promotor sinapsina, mas não expressa a proteína sensível à luz (Syn-YFP, Addgene), também foi usado para os experimentos controle. Em experimentos *in vitro* e *in vivo*, utilizamos o AAV para expressar os receptores projetados para ativação exclusiva por drogas projetadas (DREADDs), e a proteína fluorescente mCherry, também sob o controle do promotor sinapsina (Syn-HM3D(Gq)-mCherry; Addgene). O receptor HM3D(Gq) é uma modificação do receptor muscarínico M3 de humanos acoplado a proteína Gq. Dessa forma, a ativação da sua via de sinalização intracelular leva à excitabilidade neuronal, que pode desencadear potenciais de ação quando expressos em neurônios (CARTER et al., 2022). Um AAV que expressa mCherry sob o controle do promotor sinapsina, mas não expressa os DREADDs (Syn-mCherry, Addgene), também foi usado para os experimentos controle.

3.2.1. Expressão gênica na região pFL

Para transfectar os neurônios da região pFL, ratos Wistar machos (50-60g – 3 semanas) foram anestesiados com Cetamina (75 mg.kg⁻¹i.p.) e Xilazina (5 mg.kg⁻¹i.p.) (Agener União, São Paulo, SP, Brasil), tornando-os insensíveis a beliscões na cauda na pata. Os ratos foram colocados em um aparelho estereotáxico (David Kopf, Tujunga, CA, USA). Uma microinjeção unilateral (200 nL, durante 5 minutos) de Syn-ChR2-YFP ou Syn-YFP para os experimentos *in situ*, Syn-HM3D(Gq)-mCherry ou Syn-mCherry, para os experimentos *in vitro* e *in vivo*, foi aplicada na região pFL (Picospritzer II; Parker Instruments, Hollis, NH, USA). As injeções foram feitas a -2,4 mm caudal de Lambda, ± 2,1 mm lateral da linha média e -9,4 mm abaixo da superfície do cérebro. A pipeta foi deixada no local por 10 minutos após a injeção para minimizar o refluxo do vírus. A pele foi suturada no final da cirurgia e os ratos foram tratados com flunixin analgésica e antipirética (1 mg.kg⁻¹; Banamine; Schering-Plow, São Paulo, SP, Brasil) e 0.1 ml de antibiótico veterinário (1.2 milhão de UI; Pentabiotic Veterinarian; Fort Dodge, Campinas, Brasil) por meio de injeções intramusculares.

3.3. Experimentos *in vitro*

3.3.1. Procedimentos Cirúrgicos

21 dias após os procedimentos cirúrgicos para transfecção dos neurônios da região pFL com o AAV Syn-HM3D(Gq)-mCherry, os ratos foram profundamente anestesiados com isoflurano (5%; Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brasil), tornando-os insensíveis a beliscões na cauda na pata. Após serem decapitados com guilhotina, o tronco encefálico foi retirado rapidamente e transferido para uma solução de Ringer gelada (~0° C) contendo (em mM): 121 NaCl, 2.5 KCl, 1 MgCl₂, 1.25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 20 glicose, constantemente saturada com 5% de CO₂ e 95% de O₂ para oxigenação e manutenção do pH em 7.4. Fatias coronais (250µm) do bulbo contendo a região pFL foram obtidas utilizando um vibrátomo (Leica VT 1200S, Nussloch, Alemanha). As fatias foram incubadas em solução de Ringer à 33° C por 30 minutos e depois permaneceram à 23° C até o final dos experimentos. As fatias foram transferidas para uma câmara de registro (70µl) e foram continuamente superfundidas (2 ml por minuto) com solução de Ringer contendo (em mM): 121 NaCl, 4 KCl, 1 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 10 glicose saturada com 5% de CO₂ e 95% de O₂.

3.3.2. Aquisição dos sinais eletrofisiológicos

As fatias foram imobilizadas na câmara de registro por uma rede de fios de *nylon* montada sobre uma armação de platina e os neurônios da região pFL foram visualizados por meio de um microscópio (BX-51, Olympus, Tóquio, Japão) equipado com óptica de contraste de interferência diferencial e infravermelho (DIC-IR), acoplado a uma câmera sensível aos comprimentos de onda próximos ao infravermelho (C11440; ORCA-Flash 4.0, LT3, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japão), a qual estava conectada a um monitor de vídeo. Somente os neurônios da região pFL que apresentavam marcação para mCherry (comprimento de onda de excitação 597 nm e de emissão 610 nm; X-Cite 120LED Boost, Excelitas, CA, USA), ou seja, que expressavam o receptor HM3D(Gq), foram registrados durante os experimentos. O potencial de membrana em repouso (RMP), foi registrado por meio da técnica de *whole-cell patch-clamp*. Os eletrodos de borosilicato de vidro (O.D 1.5 mm, I.D 0.86 mm, Sutter Instruments, CA, USA) foram confeccionados utilizando-se um estirador horizontal (P-97 Puller, Sutter Instruments) e preenchidos com solução contendo (em mM): 135 Gluconato de potássio, 10 KCl, 2 Mg-ATP, 0.25 Na-GTP, 1 EGTA, 10 HEPES, 1 MgCl₂, 0.3 CaCl₂, pH 7.4 ajustada com KOH e resistência de ponta entre 4 e 5 MΩ.

Foi aplicada pressão positiva no eletrodo de registro para evitar a adesão de impurezas. Após a ponta do eletrodo de registro encostar na membrana, a pressão positiva foi removida, e pressão negativa foi aplicada até que a configuração de *whole cell* fosse obtida. Os registros foram realizados após um período de estabilização de 5 minutos após a obtenção da configuração de *whole cell*. Os sinais foram adquiridos (10 KHz; 2 KHz low pass) por um amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) conectado a um computador via a interface A/D (DIGIDATA 1440, Molecular Devices). O software pClamp 10 (Molecular Devices) foi utilizado para a aquisição dos sinais.

O RMP e a frequência dos potenciais de ação dos neurônios da região pFL foram avaliados antes e durante a superfusão de N-óxido de clozapina (CNO; 10 μM; Tocris Bioscience, Abingdon, UK) por 5 minutos na presença dos bloqueadores da transmissão sináptica rápida: picrotoxina (antagonista dos receptores GABA_A; 30 μM; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), estricnina (antagonista dos receptores glicinérgicos; 1 μM; Sigma-Aldrich), 6-cyano-7-nitroquinoxaline- 2,3-dione (CNQX; antagonista dos receptores AMPA/kainato; 10 μM; Sigma-Aldrich) e d-2-amino-5-

phosphonovalerate (AP5; antagonista dos receptores NMDA, 20 μ M; Sigma-Aldrich). O CNO foi dissolvido em Dimethyl sulfoxide (DMSO – 0.02%; Sigma-Aldrich) e então, diluído na solução de superfusão.

3.3.3 Análise dos dados

Os dados foram analisados utilizando o software Clampfit 10 (Molecular Devices). Para análise do RMP, aplicamos um histograma cumulativo (largura de caixa de 0.5s) dos valores do potencial de membrana nos últimos 30s dos registros antes e durante a superfusão de CNO (PIRES DA SILVA et al., 2016). A média da frequência dos potenciais de ação também foi obtida nos últimos 30s dos registros antes e durante a superfusão de CNO.

3.4. Experimentos *in situ*

3.4.1. Procedimentos Cirúrgicos

Usando a preparação *in situ* conforme descrito anteriormente (PATON, 1996), os ratos foram profundamente anestesiados com isoflurano (5%), 21 dias após os procedimentos cirúrgicos para a transfecção dos neurônios da região pFL com os AAVs Syn-ChR2-YFP ou Syn-YFP. Após confirmar a ausência de respostas ao pinçamento da pata e a supressão da respiração, os ratos foram seccionados abaixo do diafragma, e a parte superior do corpo foi colocada em solução de Ringer gelada contendo (em mM): 125 NaCl, 24 NaHCO₃, 3 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.25 MgSO₄, 1.25 KH₂PO₄ e 10 glicose. As preparações foram descerebradas e a superfície ventral do tronco cerebral foi exposta (DE BRITTO; MORAES, 2017; MAGALHÃES et al., 2021). As preparações foram transferidas para uma câmara de registro, e a aorta descendente foi canulada com um cateter de duplo lúmen. A preparação foi perfundida utilizando uma bomba peristáltica 502 s (Watson-Marlow, Falmouth, UK), com fluxo de 21-25 mL/min, com a solução de Ringer descrita anteriormente, saturada com 5% de CO₂ e 95% de O₂. O perfusato continha um agente oncótico (1.25% de polietilenoglicol; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e bloqueador neuromuscular (brometo de vecurônio, 3-4 μ g/ml; Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda.). Para aumentar a pressão de perfusão (PP) foi adicionado 70 μ l de vasopressina (4 μ M; Sigma-Aldrich) ao perfusato.

3.4.2. Aquisição dos sinais eletrofisiológicos

Todos os registros dos nervos motores (1700 amplifier; A-M Systems, Sequim, WA, USA) foram obtidos com eletrodos de vidro de sucção bipolar conectados a micromanipuladores (YOU-1, Narishige, Setagaya, Japan). O HN e o SLN foram dissecados no nível cervical, seccionados e suas atividades eferentes registradas. O nervo abdominal (AbN) foi isolado dos músculos retro-abdominais no nível torácico (T12), seccionado distalmente e sua atividade registrada, enquanto o nervo frênico (PN) foi registrado no lado esquerdo da caixa torácica. O tSN foi registrado na cadeia simpática torácica ao nível de T8-T12. Os nervos motores respiratórios e simpático foram registrados em unidades absolutas (μV). A PP foi registrada por um dos lúmens do cateter de perfusão conectado a um transdutor de pressão (Modelo PT 300; Grass, MA, USA).

Os registros extracelulares de célula única às cegas dos neurônios da região pFL e dos neurônios C1 do RVLM foram obtidos (Axopatch-200B) com eletrodos de vidro (10-30 M Ω), conforme descrito anteriormente (MORAES et al., 2012; MORAES; ZOCCAL; MACHADO, 2012b). Analisamos as alterações na frequência dos potenciais de ação dos neurônios da região pFL e C1 em resposta à fotoestimulação dos neurônios da região pFL utilizando a optogenética (ver abaixo). Nessa abordagem experimental, foi possível registrar as alterações no campo elétrico devido às correntes iônicas envolvidas na gênese do potencial de ação. Os eletrodos foram conectados a um micromanipulador (PatchStar; Scientifica, Uckfield, UK) e, em seguida, posicionados em direção à região correspondente (pFL ou RVLM) na superfície ventral do bulbo sob controle visual (Microscópio; Seiler, St Louis, MO, USA) com base em referências anatômicas (corpo trapezoide, raízes do nervo hipoglosso e artéria basilar) e coordenadas da região pFL (DE BRITTO; MORAES, 2017; MAGALHÃES et al., 2021) e do RVLM (DA SILVA et al., 2022), conforme descrito anteriormente. O traçador neural biocitina (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) foi usado (1.5% na solução de pipeta) para marcação justacelular dos neurônios registrados (pulsos de 200 ms, 1,0-4,0 nA em 2,5 Hz por 1-5 min). A frequência dos potenciais de ação dos neurônios da região pFL em resposta a fotoestimulação de curta duração foi avaliada na presença dos bloqueadores da transmissão sináptica rápida descritos acima: picrotoxina, estriçnina, CNQX e AP5.

Todos os sinais foram amplificados, filtrados (0.1 - 5 KHz) e adquiridos (PP: 0.5 KHz; Nervo: 5KHz; Neurônio: 10KHz), utilizando um conversor analógico/digital (CED

1401; Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK), em um computador com o software Spike 2 (Cambridge Electronic Design).

3.4.3. Estimulação optogenética

Uma fibra óptica (núcleo de 400 μm ; Thorlabs, Newton, NJ, USA) conectada a um LED de 470 nm (M470F3; Thorlabs) foi posicionada na região pFL para estimular os neurônios transfectados. Um medidor de luz (medidor de potência de fibra PM20A; Thorlabs) foi usado para medir a intensidade da luz, ajustada em 10 mW. O protocolo de estimulação optogenética consistiu em pulsos de 10 ms, com frequência de 20 Hz, durante 0.2, 0.25 ou 20s.

3.4.4. Análise dos dados

As atividades dos nervos motores respiratórios e simpático registrados foram analisadas em sinais retificados e integrados (constante de tempo de 50 ms), usando o software Spike 2, nas diferentes fases do ciclo respiratório (DE BRITTO; MORAES, 2017). A atividade basal do PN foi avaliada por sua frequência (frequência respiratória - fR), duração (duração da inspiração - DI) e amplitude (μV). Os intervalos de tempo entre as atividades do PN foram considerados como duração da expiração (DE). A duração da pré-inspiração (pre-I) do SLN e do HN foi analisada por sua relação com o início da atividade do PN. A duração da atividade pós-inspiratória do SLN também foi quantificada. A AE foi determinada quando a atividade do AbN no final da segunda fase da expiração (E2) foi maior (μV) do que a sua atividade na pós-inspiração (post-I), e a sua amplitude foi determinada em μV . A atividade do tSN em cada fase do ciclo respiratório foi obtida pela medida individual da área sob a curva e normalizada pela área total das três fases respiratórias juntas. Neste caso, a expiração foi dividida em duas fases de durações semelhantes (post-I e E2) devido à ausência do registro da atividade pós-inspiratória no SLN. A amplitude das THW foi analisada pela diferença entre os níveis mais baixos e mais altos da PP ao longo da inspiração e expiração. A frequência dos potenciais de ação dos neurônios da região pFL e pré-simpáticos do RVLM também foi analisada. As variáveis descritas acima foram analisadas e reportadas ao longo de 20s antes, durante e depois à fotoestimulação dos neurônios da região pFL.

Para a análise da fotoestimulação dos neurônios da região pFL nas diferentes fases do ciclo respiratório, separamos duas frações do ciclo respiratório total (0-360°),

sendo a fase inspiratória correspondente à 0 a 120° e expiratória à 121 a 360°. Realizamos protocolos de fotoestimulação por 0.25s e agrupamos as respostas a cada 45° para facilitar a análise. Para análise do efeito da fotoestimulação nas diferentes fases da respiração na duração do ciclo respiratório, na DI e DE, analisamos estas variáveis, nas diferentes fases da respiração, no ciclo respiratório em que houve a fotoestimulação (N), bem como no ciclo respiratório imediatamente anterior (N-1). Sendo assim, os dados estão reportados como N:N-1 (Figura 6, painéis C a E). As alterações do tSN (%) e da AE (%) em resposta à fotoestimulação (0.25s) dos neurônios da região pFL nas diferentes fases do ciclo respiratório foram analisadas durante o período de fotoestimulação e apresentadas como o delta de variação comparado com o mesmo período do ciclo respiratório de mesma duração imediatamente antes da fotoestimulação (Figura 6, painel F). As alterações na frequência dos potenciais de ação dos neurônios da região pFL também foram reportadas como o delta de variação comparada com o período de mesma duração imediatamente antes da fotoestimulação (20s).

3.4.5. Histologia e imunofluorescência

No final dos experimentos, o tronco encefálico das preparações transfectadas foi removido e fixado em 4% de paraformaldeído (PFA - Sigma-Aldrich) durante 24 h. Em seguida, os troncos encefálicos foram transferidos para uma solução de sacarose a 30%. Foram realizados cortes coronais (50 µm de espessura) em toda a região do pFL e do RVLM. Os cortes foram coletados em uma solução crioprotetora [0.1 M solução de salina tamponada com fosfato (PBS), 0.3% etileno glicol e 0.2% glicerol] e armazenado à 20° C antes do processamento. Os cortes foram bloqueados e permeabilizados em PBS (0.1 M) contendo 5% de albumina de soro bovino fetal (Sigma-Aldrich) e 0.1% de Triton X-100 por 1 hora em temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS, os cortes foram incubados com os anticorpos primários anti-GFP de galinha (1:5000; Abcam; Cambridge, MA, USA), anti-Phox2b de coelho (1:800; doação de J.-F. Brunet, Ecole Normale Supérieure, Paris, França) e anti-TH de camundongo (1:1000; Millipore, Burlington, MA, USA) por 24 h em temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS, os cortes foram incubados com os anticorpos secundários anti-galinha de cabra conjugado com Alexa 488 (1:1000; Molecular Probes), anti-camundongo de burro conjugado com Alexa 647 (1:1000; Molecular Probes), anti-coelho de burro conjugado com Alexa 543 e estreptavidina conjugada

com Alexa 405 (1:1000; Molecular Probes) por 4 h em temperatura ambiente. Os cortes foram lavados três vezes em PBS e montados em Fluoromount (Sigma-Aldrich). As imagens foram capturadas em um microscópio confocal Leica TCS SP5 equipado com lasers de 405, 488, 543 e 633 nm e detecção de comprimento de onda de emissão ajustável. A análise da localização dos neurônios transfectados na região pFL (12 a 11 mm caudal ao Bregma), e dos neurônios registrados na região pFL e no RVLM, foi feita em cada rato.

3.5. Experimentos *in vivo*

3.5.1. Implante dos eletrodos para registro da atividade do músculo diafragma

O eletromiograma (EMG) do músculo diafragma (DiaEMG) foi utilizado para avaliar as atividades inspiratória e expiratória dos ratos. 21 dias após os procedimentos cirúrgicos para transfecção dos neurônios da região pFL com os AAVs Syn-HM3D(Gq)-mCherry ou Syn-mCherry, os animais foram submetidos a um procedimento cirúrgico para implantar eletrodos bipolares de aço inoxidável revestidos de teflon (Tipo 316, A-M Systems). Depois de verificar a profundidade da anestesia (mistura de cetamina/xilazina; i.p.), pinçando a pata, os eletrodos foram implantados no músculo diafragma por meio de uma incisão na região direita do abdômen. Os fios foram posicionados sob a pele dos animais, entre as escápulas, e conectados a uma tomada elétrica, conforme descrito anteriormente (MORAES et al., 2013). Como anteriormente, o analgésico e antipirético flunixinina foi administrado ao final desse procedimento cirúrgico.

3.5.2. Implante de cateter arterial

7 dias após o implante dos eletrodos no músculo diafragma, realizamos a cirurgia de implantação de cateter na artéria femoral. Um cateter de polietileno (Tubo PE-10 conectado ao tubo PE-50; Clay Adams, Parsippany, NJ, USA) foi inserido na aorta femoral para registrar a pressão arterial pulsátil (PAP). A extremidade externa da cânula foi ocluída com um pino de metal para evitar o fluxo sanguíneo. Um trocater foi utilizado para acomodar o cateter subcutaneamente e exteriorizá-lo entre as escápulas, onde foi suturada à pele. Após a cirurgia, repetimos o tratamento descrito na seção acima.

3.5.3. Registro dos parâmetros cardiovasculares e do DiaEMG

Um dia após o implante do cateter arterial, realizamos registros simultâneos dos parâmetros cardiovasculares e do DiaEMG por dois dias consecutivos em animais não anestesiados com livre movimentação. Cada rato foi mantido em uma caixa de armazenamento e alocado em uma sala de registro para adaptação 1 hora antes dos registros. Em seguida, fios finos e flexíveis foram gentilmente conectados ao soquete e ao amplificador (Animal Bio Amp FE136; ADInstruments, Bella Vista, NSW, Austrália), para medida do DiaEMG, e a cânula arterial foi conectada a um transdutor de pressão (MLT0380; ADInstruments), que, por sua vez, foi conectado a um amplificador (Bridge Amp ML221; ADInstruments). O sinal do DiaEMG foi filtrado por passagem de banda de 0.3 a 5KHz. Todos os sinais foram adquiridos por um sistema de aquisição (PAP: 1kHz; DiaEMG: 5kHz; PowerLab 4/25 ML845; ADInstruments), por meio do software LabChart (v.7; ADInstruments). A PAP e o DiaEMG foram registrados simultaneamente por pelo menos 30 minutos para obter os valores em condições basais. Posteriormente, todos os ratos receberam injeções intraperitoneais (i.p.) de CNO (1mg/kg), para ativar os HM3D(Gq) ou de DMSO (0.02% - veículo do CNO) em dias alternados e em ordem aleatória. Em seguida, medimos os parâmetros descritos acima aos 30, 45 e 60 minutos após as injeções de CNO ou DMSO.

3.5.4. Análise dos dados

O DiaEMG foi registrado em unidades absolutas (μV), e as análises foram realizadas em sinais retificados e integrados (constante de tempo de 50 ms) usando o software Spike 2. A frequência respiratória (fR) foi avaliada pela atividade do DiaEMG. A DI foi definida pela duração da atividade do DiaEMG, enquanto os intervalos entre as atividades do DiaEMG definiram a DE. A amplitude do DiaEMG foi definida como amplitude inspiratória. Os valores de pressão arterial sistólica (SAP), pressão arterial diastólica (DAP), pressão arterial média (MAP) e frequência cardíaca (HR) foram derivados dos sinais da PAP por meio do software LabChart. Os parâmetros respiratórios e cardiovasculares foram analisados em trechos de 30s em condições basais, 30, 45 e 60 min após as injeções de CNO ou DMSO.

3.5.5. Histologia e imunofluorescência

No final dos experimentos, os ratos foram perfundidos com PBS (0.1M) e 4% PFA. Os troncos encefálicos foram removidos e fixados em 4% PFA por 24 h. A seguir, foram transferidos para uma solução de sacarose a 30%. Foram realizados cortes coronais (50 μ m de espessura) em toda a região do pFL. Os cortes foram coletados em uma solução crioprotetora, como descrito acima, e armazenado à 20° C antes do processamento. Os cortes foram bloqueados e permeabilizados em PBS (0.1 M) contendo 5% de albumina de soro bovino fetal e 0.1% de Triton X-100 por 1 hora em temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS, os cortes foram incubados com os anticorpos primários anti-ChAT de cabra (1:250; Millipore) e anti-mCherry de camundongo (1:1000; Millipore) por 24h em temperatura ambiente, para confirmar a transfecção dos neurônios da região pFL (Syn-HM3D(Gq)-mCherry ou Syn-mCherry). Após três lavagens com PBS, os cortes foram incubados com os anticorpos secundários anti-cabra de burro conjugada com Alexa 488 (1:250; Molecular Probes) e anti-camundongo de burro conjugada com Cy5 (1:250; Abcam), por 4 h em temperatura ambiente. As seções foram lavadas três vezes em PBS e montadas em Fluoromount (Sigma). As imagens foram capturadas em um microscópio confocal Leica TCS SP5 equipado com lasers de 488 e 633 nm e detecção de comprimento de onda de emissão ajustável. A análise da localização dos neurônios transfectados na região pFL (12 a 11 mm caudal ao Bregma) foi feita em cada rato.

3.6. Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão. A distribuição dos dados foi testada utilizando o teste de normalidade *Shapiro-Wilk* antes da comparação pela análise do teste paramétrico ANOVA *One-way* (com medidas repetidas) e pós-teste de *Bonferroni* ou do teste não-paramétrico de *Friedman* e pós teste de *Dunn* de acordo com o protocolo experimental (GraphPad Prism 8, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). O nível de significância adotado foi de $p < 0.05$.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Experimentos *in situ*

4.1.1. Transfecção de neurônios da região pFL

Para verificar se os neurônios localizados no pFL foram efetivamente transfectados, analisamos a superfície ventral do bulbo, de 20 ratos transfectados com ChR2-YFP e 5 ratos transfectados com YFP, de 12 a 11 mm caudal ao Bregma. Analisamos a região ao redor do núcleo motor facial, que incluía as regiões ventromedial e ventrolateral. A região se estendia do trato piramidal ao trato espinhal do trigêmeo (SP5), médio-lateralmente, e dorso-ventralmente da superfície ventral do bulbo até o aspecto dorsal do núcleo motor facial. O número de neurônios positivos para YFP, em torno do aspecto lateral do núcleo motor facial (utilizando o meio do núcleo motor facial como referência), foi de 118.8 ± 19.64 para ChR2-YFP e 134.8 ± 23.31 para YFP por animal (Figura 2, painéis A e B), que inclui a região pFL. Apenas alguns neurônios da região ventromedial também expressaram YFP ao longo da região analisada (11.7 ± 4.32 para ChR2-YFP e 9.8 ± 3.34 para YFP).

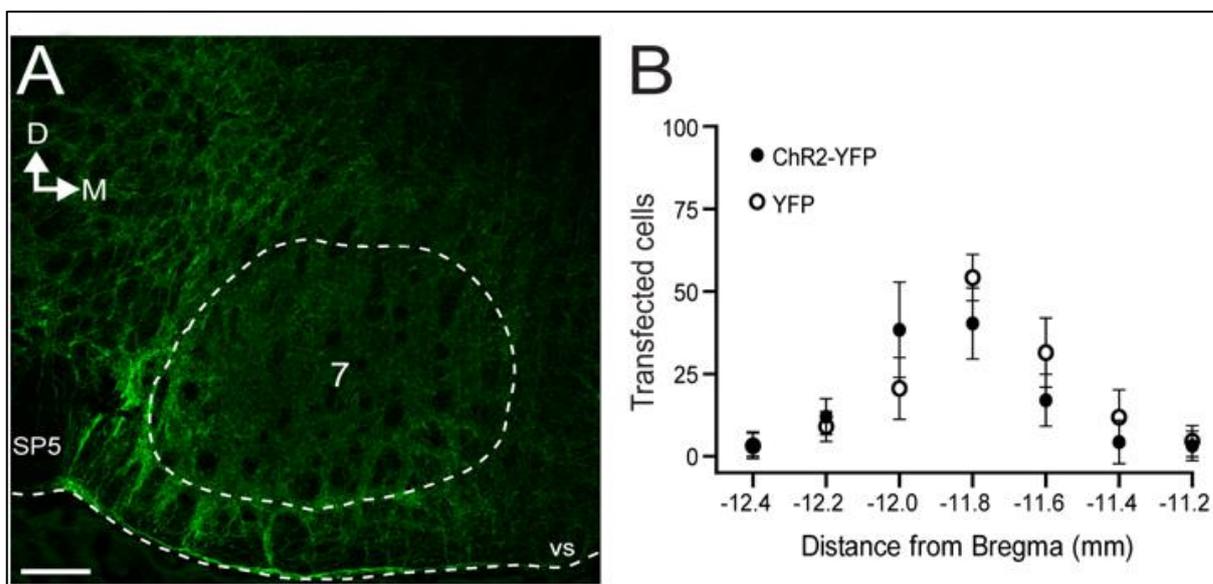


Figura 2. Transfecção dos neurônios da região pFL. Corte coronal do bulbo de um rato (11.8 mm caudal ao Bregma), transfectado com ChR2-YFP, mostrando a expressão da ChR2, por meio da análise da YFP (verde), nos neurônios da região pFL (A). Escala: 250 μ m. D: dorsal. M: medial. vs: superfície ventral do bulbo. 7: núcleo motor facial. SP5: trato trigeminal espinhal. Dados agrupados do número de neurônios da região pFL de ratos transfectados com ChR2-YFP e YFP (B). Os números no eixo x indicam a distância em relação ao Bregma.

4.1.2. Fotoestimulação dos neurônios ChR2-YFP positivos da região pFL

Analizamos o efeito da fotoestimulação durante 20s na atividade dos neurônios da região pFL. Encontramos dois tipos de neurônios na região pFL que foram excitados, com aumentos na frequência dos potenciais de ação, em resposta à fotoestimulação: i) neurônios que eram silentes em condições basais e que foram excitados com aumentos na frequência dos potenciais de ação (Δ : 22.2 ± 3.55 Hz; 5 neurônios de 5 animais) exclusivamente no final da E2, imediatamente antes do início da atividade do PN (Figura 3, painel A), e; ii) neurônios que eram tonicamente ativos, sem aparente modulação respiratória, e que foram excitados com aumentos na frequência dos potenciais de ação (Δ : 20.77 ± 1.76 Hz; 7 neurônios de 7 animais), de forma sustentada, durante todo o período de fotoestimulação (Figura 3, painel C). Após o bloqueio da transmissão sináptica rápida, a fotoestimulação durante 0.2s evocou potenciais de ação durante todo o período, seguido de um período silente, em ambos os tipos de neurônios registrados (Figura 3, painéis Bi e Di). A magnificação de um período de fotoestimulação, após o bloqueio da transmissão sináptica rápida, mostrou que cada pulso de luz (10 ms) evocou um único potencial de ação, validando o protocolo de estimulação optogenética. Observe que os neurônios registrados, identificados pela presença da biocitina (em azul), expressam a YFP (em verde), e conseqüentemente a ChR2, mas não expressam Phox2B (em vermelho; Figura 3, painéis Bii e Dii). Esses dados demonstram que o protocolo de fotoestimulação aplicado excita os neurônios da região pFL ChR2-YFP-positivos, com a geração de um potencial de ação a cada pulso de luz.

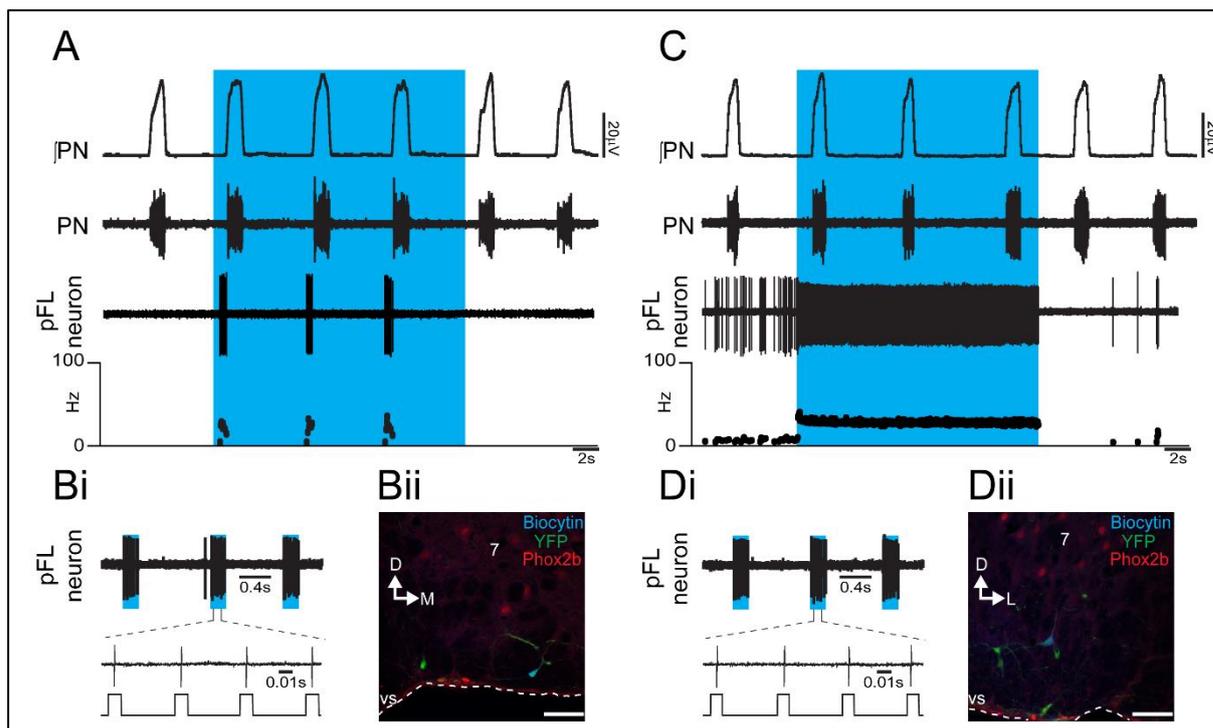


Figura 3. Efeito da fotoestimulação na atividade dos neurônios do pFL. Registros integrado (j) e original da atividade do PN, registro extracelular, bem como da frequência instantânea dos potenciais de ação de um neurônio silente da região pFL (A), mostrando que a fotoestimulação da região pFL com pulsos de luz de 10 ms e 20 Hz por 20s evocou potenciais de ação no final da E2. Note na magnificação do registro extracelular em Bi que a fotoestimulação de curta duração (0.2s) evocou um potencial de ação para cada pulso de luz, seguido de um período silente, após o bloqueio da transmissão sináptica rápida. Exemplo de um neurônio da região pFL silente (Bii) marcado com biocitina (azul), após o registro extracelular, expressando YFP (verde), mas não Phox2b (vermelho). Escala: 50 μ m. D: dorsal. M: medial. vs: superfície ventral do bulbo. 7: núcleo motor facial. Registros integrado (j) e original da atividade do PN, registro extracelular, bem como da frequência instantânea dos potenciais de ação de um neurônio tonicamente ativo da região pFL (C), mostrando que a fotoestimulação da região pFL com pulsos de luz de 10 ms e 20 Hz por 20s aumentou a frequência dos potenciais de ação sem modulação respiratória. Note na magnificação do registro extracelular em Di que a fotoestimulação de curta duração (0.2s) evocou um potencial de ação para cada pulso de luz, seguido de um período silente, após o bloqueio da transmissão sináptica rápida. Exemplo de um neurônio da região pFL tonicamente ativo (Dii) marcado com biocitina (azul), após o registro extracelular, expressando YFP (verde), mas não Phox2b (vermelho). Escala: 50 μ m.

4.1.3. Efeitos da fotoestimulação dos neurônios da região pFL no padrão respiratório

A fotoestimulação dos neurônios da região pFL por 20s provocou alterações significativas no padrão respiratório das preparações *in situ* de ratos transfectados com ChR2-YFP (Figura 4, painéis A, Bi e Bii; 5 animais). Durante o período de fotoestimulação, observamos a redução da fR (0.21 ± 0.02 vs. 0.31 ± 0.02 Hz; $p < 0.001$; Figura 4, painel C), mas não da amplitude do PN (29.54 ± 5.9 vs. 29.26 ± 5.22 μ V; $p > 0.99$; Figura 4, painel D). Além disso, a fotoestimulação diminuiu a DI (0.67 ± 0.16 vs. 1.29 ± 0.08 s; $p = 0.0001$; Figura 4, painel E), mas aumentou a DE (7.22 ± 0.48 vs. 5.24 ± 0.24 s; $p < 0.0001$; Figura 4, painel F), a amplitude da AE (13.33 ± 3.26 vs. 3.1 ± 1.07 μ V; $p = 0.0003$; Figura 4, painel G), a duração pre-I do HN (0.52 ± 0.09 vs. 0.21 ± 0.04 s; $p = 0.0003$; Figura 4, painel H) e do SLN (0.5 ± 0.17 vs. 0.11 ± 0.02 s; $p = 0.0009$, Figura 4, painel I). Por outro lado, a duração da post-I do SLN (4.49 ± 0.2 vs. 4.56 ± 0.26 s; $p > 0.99$; Figura 4, painel J) não foi afetada pela fotoestimulação dos neurônios da região pFL. Esses dados demonstram que a fotoestimulação dos neurônios da região pFL evocou AE e alterações no padrão respiratório em preparações *in situ* de ratos semelhantes aquelas evocadas por desafios respiratórios, tais como a hipercapnia/acidose (ABDALA et al., 2009b; DE BRITTO; MORAES, 2017; MAGALHÃES et al., 2020; MOLKOV et al., 2010).

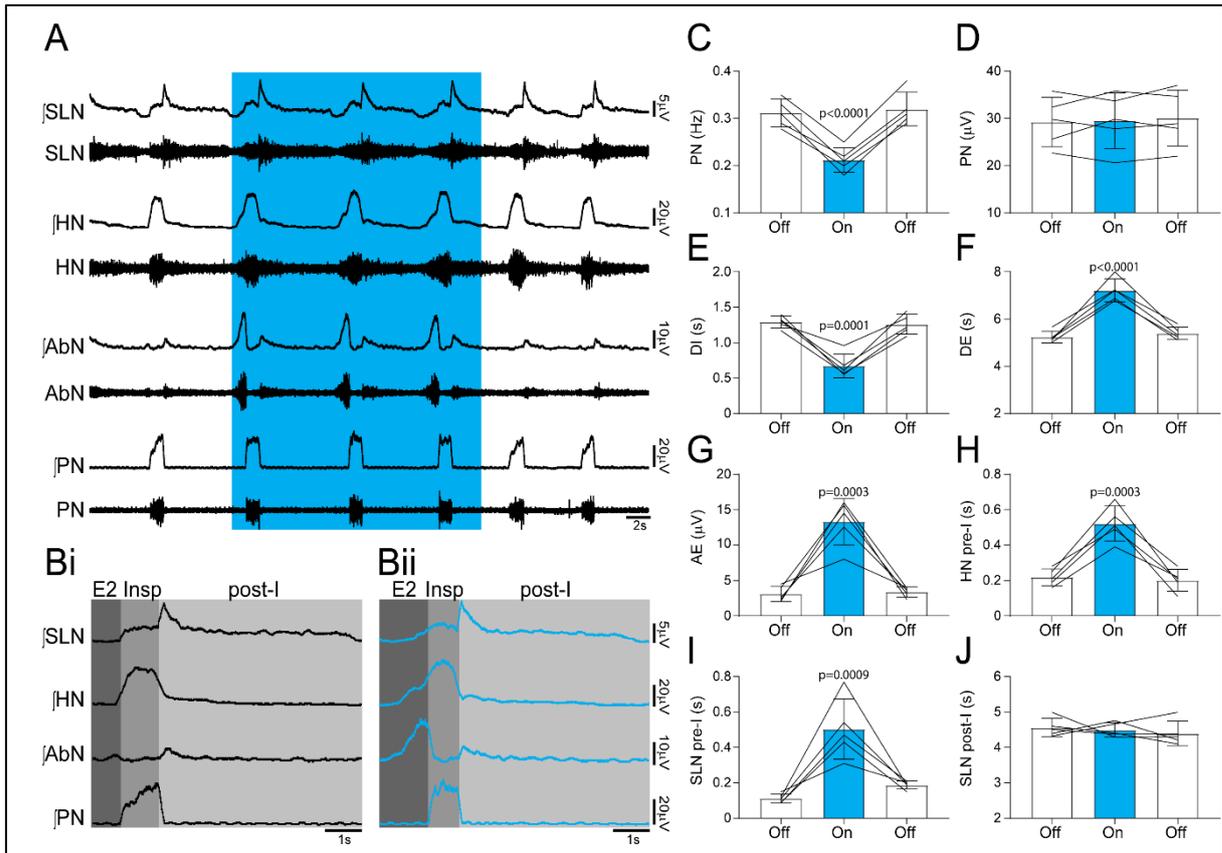


Figura 7 Efeito da fotoestimulação dos neurônios da região pFL no padrão respiratório. Registros integrados (J) e originais da atividade dos SLN, HN, AbN e PN antes e durante a fotoestimulação dos neurônios da região pFL durante 20s (10 ms; 20 Hz) em preparações *in situ* de ratos transfectados com o AAV Syn-ChR2-YFP (A). Note na média dos registros dos nervos respiratórios que a fotoestimulação dos neurônios da região pFL provocou a redução da frequência do PN e da DI, além de aumentos da DE, da amplitude da AE e da duração pre-I dos HN e SLN. Dados agrupados mostrando os efeitos da fotoestimulação dos neurônios da região pFL na frequência do PN (C; ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*), na amplitude do PN (D; ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*), na DI (E; ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*), na DE (F; ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*), na amplitude da AE (G; ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*), na duração pre-I do HN (H; ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*), na duração pre-I do SLN (I; ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*) e na duração post-I do SLN (J; ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*).

4.1.4. Efeitos da fotoestimulação dos neurônios da região pFL na atividade simpática e na amplitude das ondas de Traube-Hering

Após demonstrar que a ativação dos neurônios da região pFL evoca AE e alterações no padrão respiratório em preparações *in situ* de ratos, analisamos os efeitos da fotoestimulação destes neurônios durante 20s na atividade do tSN e na amplitude das THW (Figura 5, painel A; 5 animais). A fotoestimulação dos neurônios da região pFL provocou aumento da atividade do tSN durante a E2 (12.8 ± 4.98 vs. 3.6 ± 1.1 %; $p=0.001$; Figura 5, painéis Bi, Bii e E), mas não durante a Insp (51.88 ± 13.94 vs. 55.63 ± 14.51 %; $p=0.08$; Figura 5, painéis Bi, Bii e C) ou a post-I (23.96 ± 4.85 vs. 26.95 ± 4.85 %; $p=0.07$; Figura 5, painéis Bi, Bii e D). Além disso, a fotoestimulação dos neurônios da região pFL foi capaz de aumentar a amplitude das THW (9.29 ± 2.29 vs. 3.67 ± 1.19 %; $p=0.001$; Figura 5, painéis Bi, Bii e F). Esses dados demonstram que ativação dos neurônios da região pFL evoca a modulação expiratória, no final da E2, na atividade simpática, impactando na amplitude das THW.

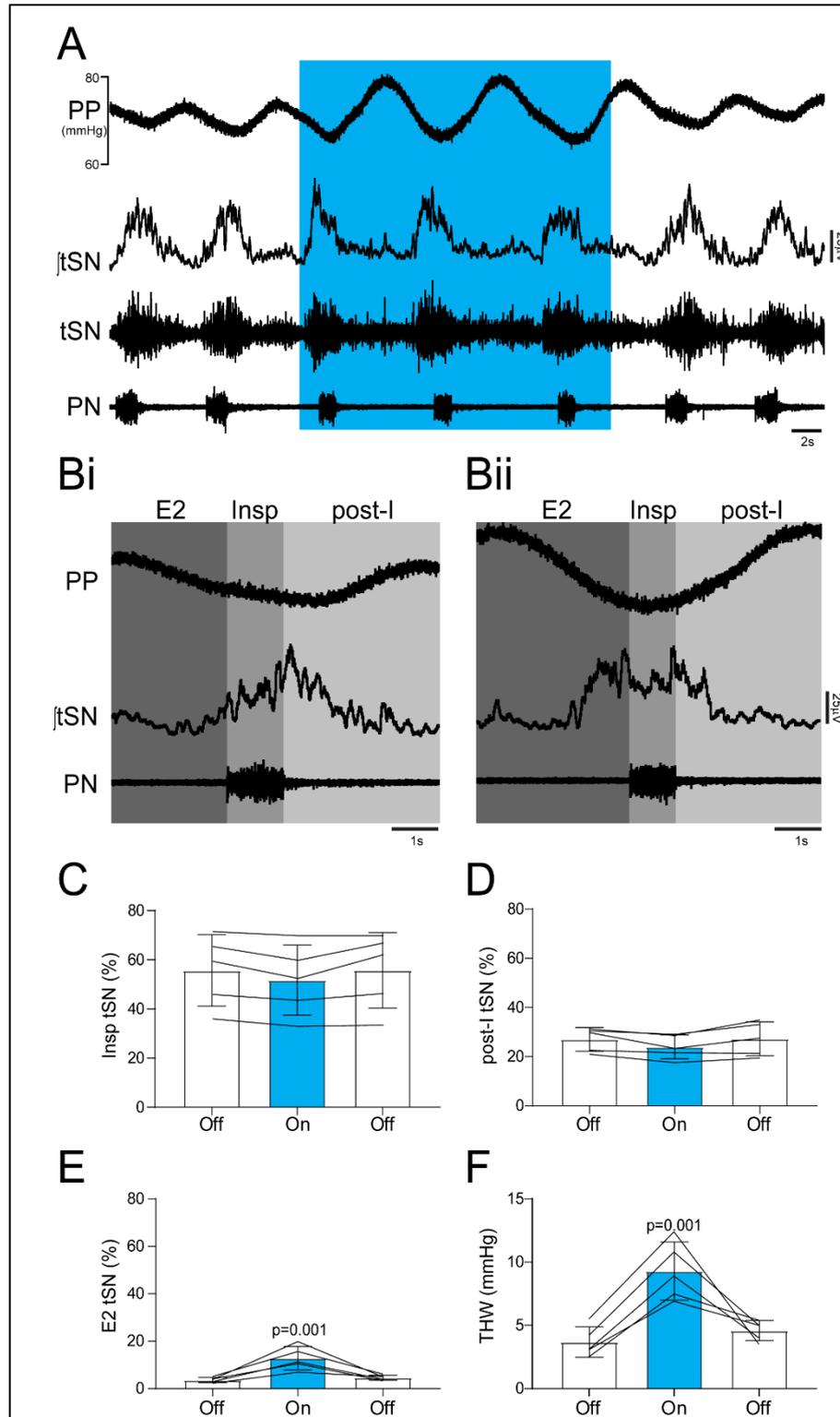


Figura 8 Efeitos da fotoestimulação dos neurônios da região pFL na atividade simpática e na amplitude das THW. (A) Registros originais da PP e do PN, bem como, registros integrado (j) e original da atividade do tSN, mostrando os efeitos da fotoestimulação dos neurônios da região pFL, com pulsos de luz de 10 ms, 20 Hz durante 20 s, em preparações *in situ* de ratos transfectados com ChR2-YFP. Note nas médias dos registros da PP, do tSN e do PN antes (Bi) e durante a fotoestimulação (Bii) o aumento da amplitude das THW, além do aumento da atividade do tSN no final da E2. Dados agrupados mostrando os efeitos da fotoestimulação dos neurônios da região

pFL na atividade do tSN durante a Insp (C; ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*), durante a post-I (D; ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*) e durante a E2 (E; ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*), bem como na amplitude das THW (F; ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*).

A seguir, investigamos se a fotoestimulação dos neurônios da região pFL é capaz de evocar a AE, e aumento simultâneo da atividade simpática, nas diferentes fases do ciclo respiratório (Figura 6, painel A; 5 animais transfectados com ChR2 e 5 animais transfectados com YFP). A fotoestimulação dos neurônios da região pFL ao longo de 0.25s durante a Insp inibiu a atividade do PN e evocou a AE (recrutamento do AbN), com o aumento simultâneo do tSN (Figura 6, painéis A e Bi). A AE, e o aumento do tSN, também foram observados quando a fotoestimulação ocorreu durante a post-I ou a E2 (Figura 6, painéis A e Bii). Histogramas de fase (0-360°) representando o ciclo respiratório (Insp: 0-120°; expiração: 121-360°) demonstraram que a fotoestimulação dos neurônios da região pFL, ao longo do ciclo respiratório, reduziu tanto a duração do ciclo respiratório [(90°: 0.28 ± 0.11 vs. 1.05 ± 0.06 ; $p < 0.0001$) (315°: 0.9 ± 0.1 vs. 1.08 ± 0.07 ; $p = 0.01$) Figura 6, painéis A-C)] quanto a DE [(90°: 0.1 ± 0.05 vs. 1.04 ± 0.06 ; $p < 0.0001$) (315°: 0.84 ± 0.14 vs. 1.06 ± 0.08 ; $p = 0.01$); Figura 6, painéis A-Bii e E)] em preparações *in situ* de ratos transfectados com ChR2-YFP em comparação com preparações de ratos transfectados somente com a YFP. A DI só foi reduzida quando a fotoestimulação ocorreu durante a Insp [(90°: 0.24 ± 0.11 vs. 1.03 ± 0.05 ; $p < 0.0001$) (315°: 0.89 ± 0.14 vs. 1.03 ± 0.07 ; $p = 0.1$) Figura 6, painéis A-Bii e D)]. Interessantemente, observamos que as alterações (Δ) na AE [(E2: 176.8 ± 18.32 %) (Insp: 172.3 ± 27.77 %) (post-I: 163.5 ± 22.47 %); $p > 0.99$], e na atividade do tSN [(E2: 132.5 ± 12.5 %) (Insp: 119.5 ± 11.4 %) (post-I: 129.5 ± 11.1 %); $p = 0.21$, $p > 0.99$ e $p = 0.4$, respectivamente], em resposta a fotoestimulação dos neurônios da região pFL são semelhantes independentemente da fase do ciclo respiratório (Figura 6, painéis A-Bii e F; 6 animais).

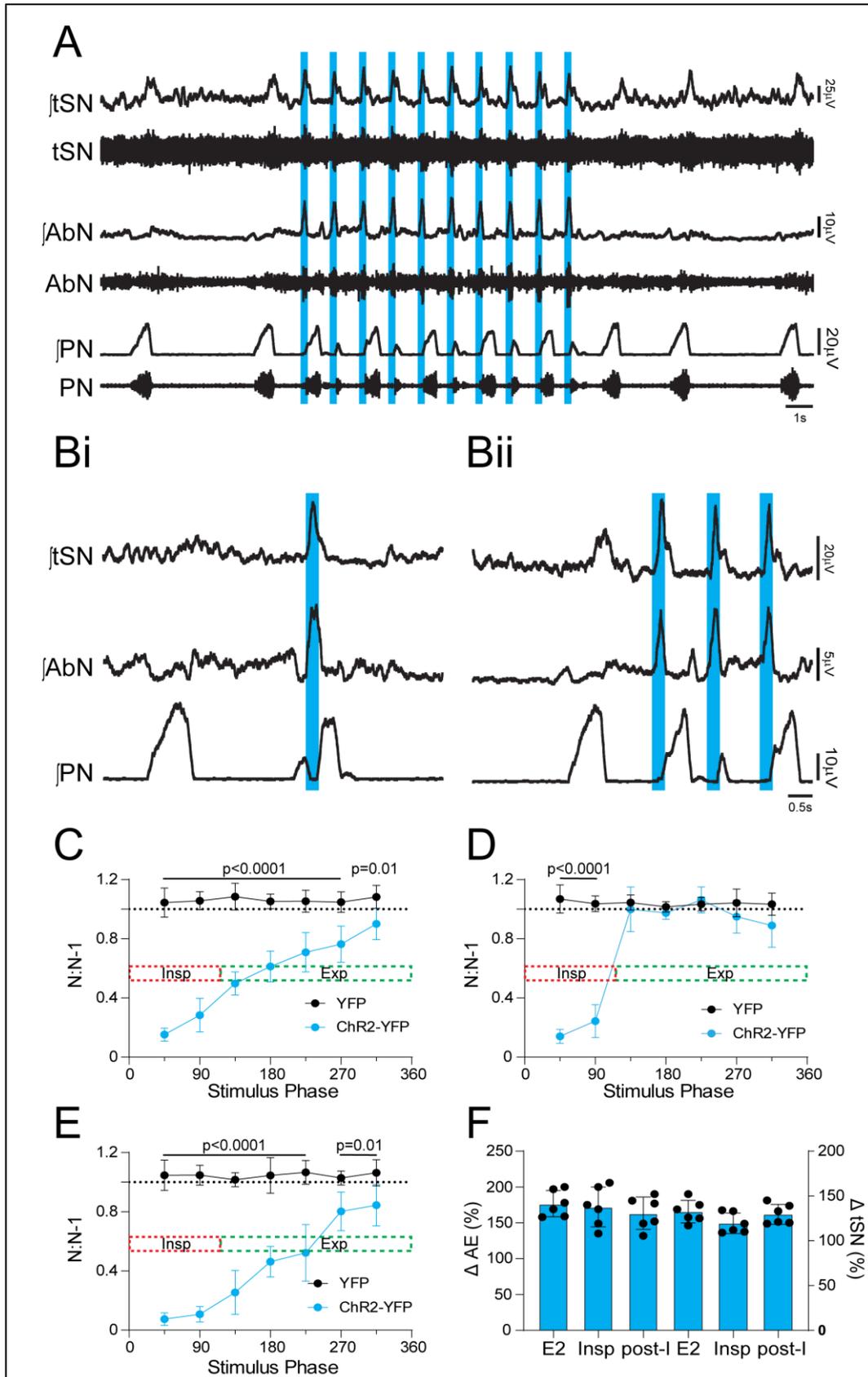


Figura 9 Efeitos da fotoestimulação dos neurônios da região pFL nas diferentes fases do ciclo respiratório na AE e na atividade simpática. Registros integrados (j) e originais das atividades dos tSN, AbN e PN, de uma preparação *in situ* de rato transfectado com ChR2-YFP, mostrando os efeitos da fotoestimulação dos neurônios da região pFL

durante 0.25s (10 ms; 20 Hz) nas diferentes fases do ciclo respiratório (A). Note nas magnificações dos nervos respiratórios e simpático que a fotoestimulação de curta duração durante a Insp inibiu a atividade do PN e evocou a AE e aumentos simultâneos da atividade do tSN (Bi). A fotoestimulação durante a post-I ou E2 também evocou a AE e aumentos da atividade do tSN (Bii). Histogramas de fases do ciclo respiratório (0-360°) demonstrando os efeitos da fotoestimulação dos neurônios da região pFL durante a Insp (0 a 120°) e durante a expiração (121 a 360°) na duração do ciclo respiratório (C; ANOVA *Two-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*) na DI (D; ANOVA *Two-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*) e na DE (E; ANOVA *Two-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*) nas preparações *in situ* de ratos transfectados com ChR2-YFP e YFP. Dados agrupados dos efeitos da fotoestimulação dos neurônios da região pFL na atividade dos AbN (AE) e tSN durante as diferentes fases do ciclo respiratório (F; ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*).

4.1.5. Efeitos da fotoestimulação dos neurônios da região pFL na atividade dos neurônios pré-simpáticos C1 do RVLM

Analizamos os efeitos da fotoestimulação dos neurônios da região pFL, durante 20s, na atividade dos neurônios pré-simpáticos C1 do RVLM (Figura 7, painel A). Registramos 6 neurônios no RVLM (6 animais) que apresentaram aumentos da frequência dos potenciais de ação durante a Insp, simultaneamente com a atividade do PN, como indicativo de neurônios pré-simpáticos catecolaminérgicos (C1), conforme demonstrado anteriormente (Moraes et al., 2013; Moraes et al., 2017). A fotoestimulação dos neurônios da região pFL provocou aumentos da frequência dos potenciais de ação (35.65 ± 4.08 vs. 21.83 ± 2.15 Hz; $p=0.005$) dos neurônios do RVLM com modulação na Insp, simultaneamente com aumento da atividade dos tSN e AbN (AE) no final da E2 (Figura 7, painéis A - C). Assim como descrito anteriormente (Moraes et al., 2013; Moraes et al., 2017), os neurônios do RVLM com modulação durante a Insp expressam TH (C1), mas não Phox2B (Figura 7, painel D). Analizamos também as projeções dos neurônios da região pFL transfectados com ChR2-YFP e observamos posições próximas entre os botões axonais dos neurônios da YFP-positivos provenientes da região pFL e o soma dos neurônios TH-positivos do RVLM (Figura 7, painel E). Esses dados demonstram que o aumento da modulação expiratória da atividade simpática e da amplitude das THW em resposta a fotoestimulação dos neurônios da região pFL são mediados pelas projeções para os neurônios pré-simpáticos C1 do RVLM.

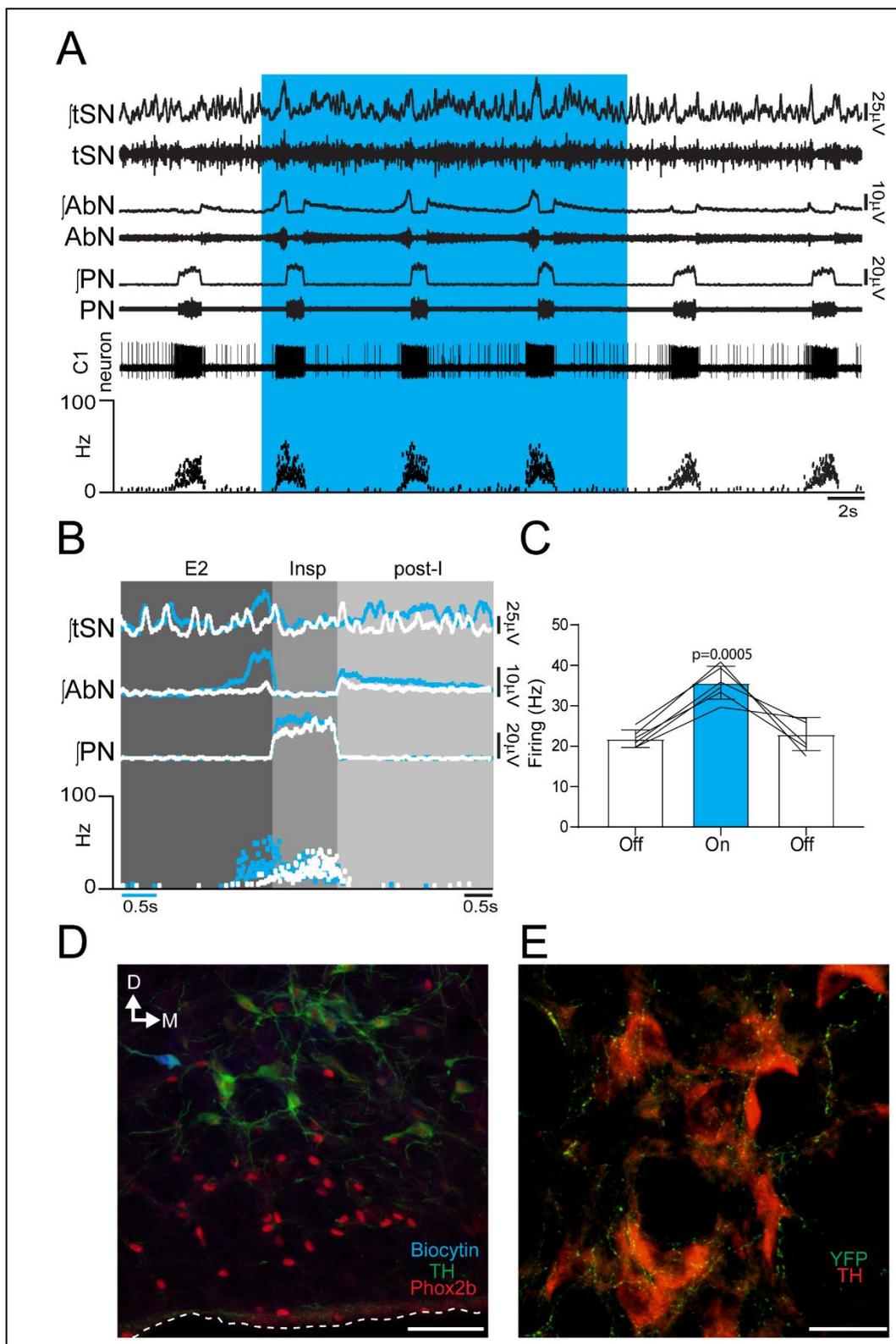


Figura 10 Efeitos da fotoestimulação dos neurônios da região pFL na atividade dos neurônios pré-simpáticos do RVLM. Registros integrados (j) e originais das atividades dos tSN, AbN e PN e registro extracelular de um neurônio do RVLM, modulado pela Insp, antes e durante a fotoestimulação dos neurônios da região pFL durante 20s (10 ms; 20 Hz) em uma preparação *in situ* de rato transfectado com ChR2-YFP (A). Observe, na média dos registros dos nervos respiratórios e do neurônio do RVLM antes (branco), e durante a fotoestimulação (azul), que a ativação dos neurônios da região pFL evocou a AE e aumento simultâneo da atividade do tSN e do neurônio do RVLM no final da E2 (B).

Dados agrupados mostrando os efeitos da fotoestimulação dos neurônios da região pFL na frequência dos potenciais de ação dos neurônios do RVLM com modulação na Insp (C; ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*). (D) Exemplo de um neurônio do RVLM registrado, com modulação na Insp, marcado com biocitina (azul), expressando TH (verde), mas não Phox2b (vermelho). Escala: 50 μm . D: dorsal. M: medial. (E) Aposições próximas entre os axônios dos neurônios da região pFL transfectados com ChR2-YFP (verde) e os somas dos neurônios TH-positivos (vermelho) localizados no RVLM. Escala: 25 μm .

Considerando que a fotoestimulação dos neurônios da região pFL excitou os neurônios pré-simpáticos C1 do RVLM para aumentar a atividade simpática durante a expiração, bem como a amplitude das THW, de preparações *in situ* de ratos, decidimos investigar os efeitos da estimulação química e sustentada dos neurônios da região pFL na função cardiovascular de ratos com livre movimentação (*in vivo*) utilizando os DREADDs.

4.2. Experimentos *in vitro* e *in vivo*

4.2.1. Transfecção dos neurônios da região pFL

Para verificar se os neurônios localizados na região pFL foram efetivamente transfectados, analisamos a superfície ventral do bulbo, de 10 ratos transfectados com HM3D(Gq)-mCherry e 4 ratos transfectados com mCherry, de 12 a 11 mm caudal ao Bregma. Analisamos a região ao redor do núcleo motor facial, que incluía as regiões ventromedial e ventrolateral. Assim como nos experimentos *in situ* descritos acima, a região se estendia do SP5, médio-lateralmente, e dorso-ventralmente da superfície ventral do bulbo até o aspecto dorsal do núcleo motor facial. O número de neurônios positivos para mCherry, em torno do aspecto lateral do núcleo motor facial (utilizando o meio do núcleo motor facial como referência), foi de 137.3 ± 22.61 para HM3D(Gq)-mCherry e 130 ± 27.54 para mCherry por animal (Figura 8, painéis A – D), que inclui a região pFL. Apenas alguns neurônios da região ventromedial também expressaram mCherry ao longo da região analisada (12.9 ± 3.12 para HM3D(Gq)-mCherry e 10.09 ± 3.34 para mCherry). Além disso, alguns motoneurônios Chat-positivos também expressaram mCherry ao longo da região analisada (32.2 ± 8.55 para HM3D(Gq)-mCherry e 37.33 ± 9.54 para mCherry; Figura 8, painéis A - C).

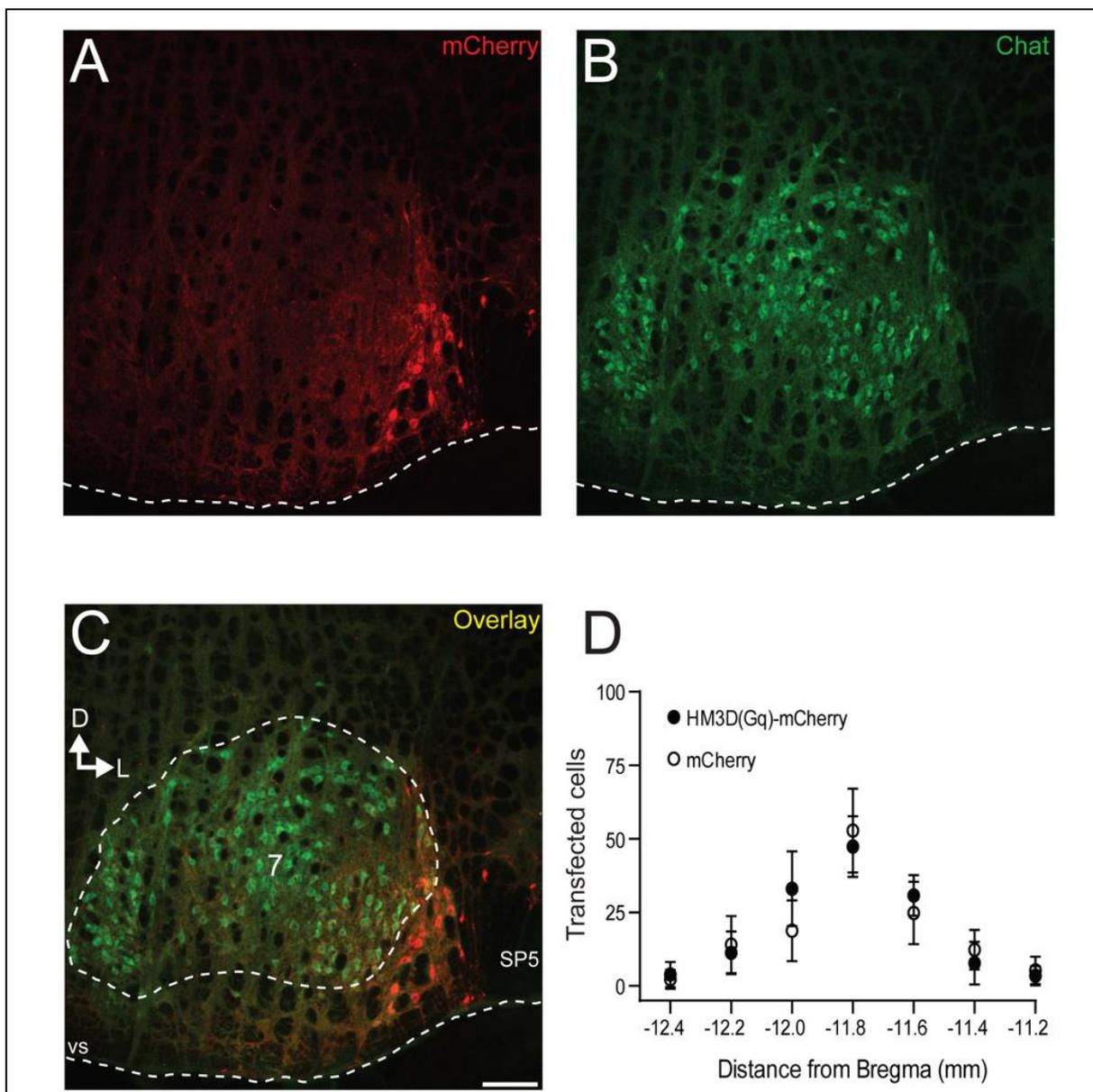


Figura 11 Transfecção dos neurônios da região pFL . Corte coronal do bulbo de um rato (11.8 mm caudal ao Bregma), transfectado com HM3D(Gq)-mCherry, mostrando a expressão do HM3D(Gq), por meio da análise da mCherry (vermelho; A), nos neurônios da região pFL, e os motoneurônios Chat-positivos (B) do núcleo motor facial (7). Note na sobreposição das imagens a presença de alguns poucos motoneurônios Chat-positivos transfectados com HM3D(Gq)-mCherry (amarelo; C). Escala: 100 μ m. D: dorsal. L: lateral. vs: superfície ventral do bulbo. SP5: trato trigeminal espinhal. Dados agrupados do número de neurônios da região pFL de ratos transfectados com HM3D(Gq)-mCherry e mCherry (B). Os números no eixo x indicam a distância em relação ao Bregma.

4.2.2. Efeitos do CNO nas características eletrofisiológicas dos neurônios HM3D(Gq)-mCherry positivos da região pFL

Inicialmente, decidimos investigar as respostas eletrofisiológicas ao CNO (10uM) dos neurônios da região pFL (5 neurônios de 3 animais), em fatias do bulbo de ratos transfectados para expressar o constructo HM3D(Gq)-mCherry nessa região. Observamos que a superfusão de CNO aumentou a frequência dos potenciais de ação (10.18 ± 2.32 vs. 5.69 ± 1.87 Hz; $p=0.006$) e despolarizou o RMP (-47.34 ± 2.57 vs. -52.02 ± 2.24 mV; $p=0.0003$) dos neurônios da região pFL que expressavam o constructo HM3D(Gq)-mCherry (Figura 9, painéis B-D). Dessa forma, concluímos que o CNO ativa os neurônios da região pFL que expressam os DREADDs excitatórios [HM3D(Gq)].

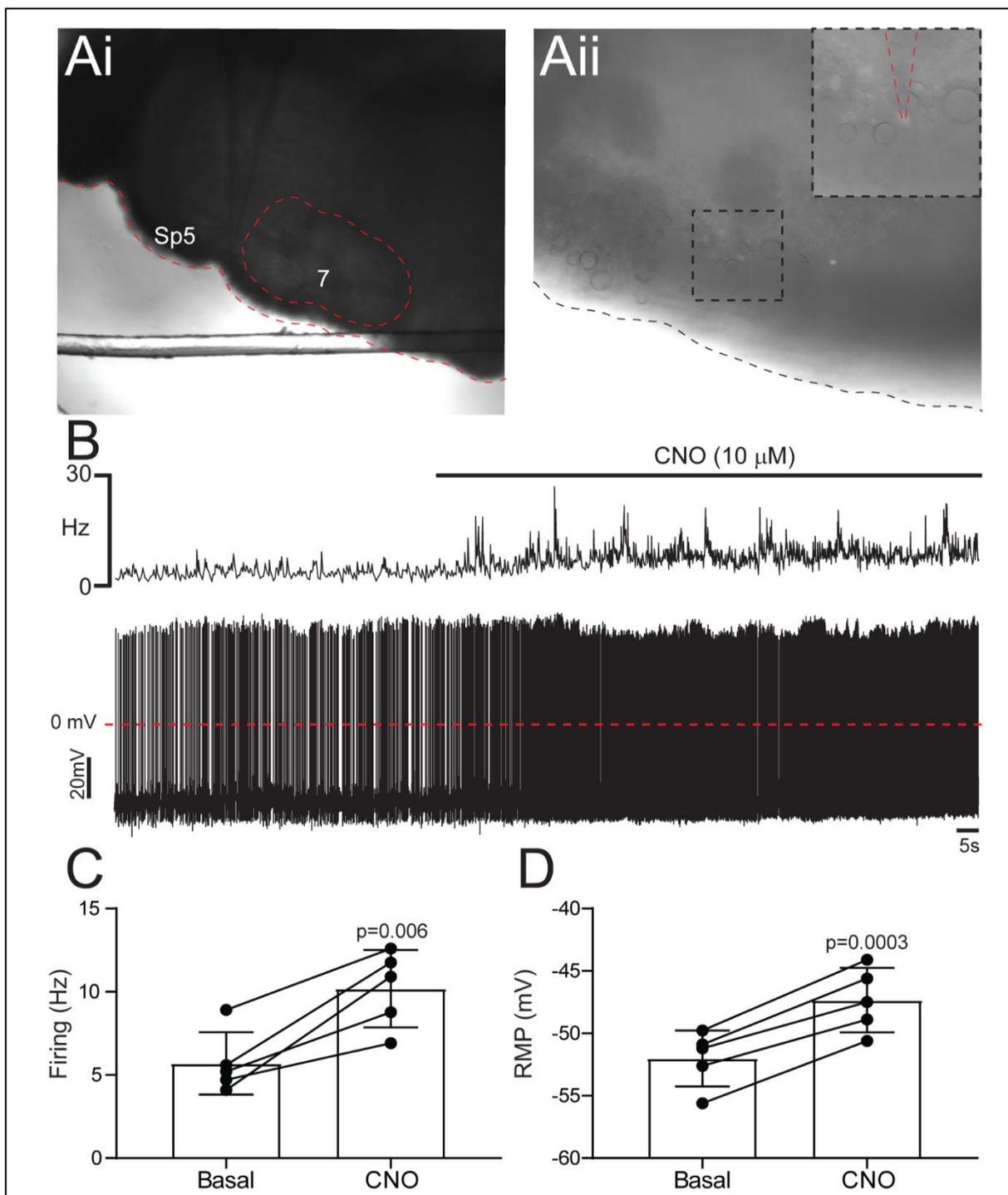


Figura 12 Respostas eletrofisiológicas ao CNO dos neurônios HM3D(Gq)-mCherry positivos da região pFL de ratos. Corte coronal do bulbo, em ampliação menor (5x; Ai), sob óptica DIC-IR, na câmara de registro mostrando a pipeta de registro na região pFL [ventral e lateralmente ao Núcleo motor facial (7) e medialmente ao trato espinhal do trigêmeo (SP5)]. Neurônios da região pFL HM3D(Gq)-mCherry positivos, sob microscopia de fluorescência e óptica DIC-IR, em ampliação de 40x (Aii). Note na magnificação na parte superior direita a presença da pipeta de registro em contato com um neurônio HM3D(Gq)-mCherry positivo. Frequência instantânea (Hz) dos potenciais de ação, registros do potencial de membrana e dos potenciais de ação, em *current clamp*, de um neurônio HM3D(Gq)-mCherry positivo da região pFL, representativo, antes e durante a superfusão de CNO (B). Dados agrupados da frequência dos potenciais de ação (C; teste-t de *Student* pareado) e do potencial de membrana em repouso (D; teste-t de *Student* pareado) dos neurônios da região pFL HM3D(Gq)-mCherry positivos antes e durante a superfusão de CNO.

4.2.3. Respostas cardiorrespiratórias induzidas pela ativação dos neurônios da região pFL

Em um outro grupo de animais (7 animais), avaliamos os efeitos da ativação dos neurônios da região pFL na DI e na DE, bem como na fR, de ratos não anestesiados com livre movimentação, registrando o DiaEMG. Além disso, investigamos o impacto da ativação dos neurônios da região pFL sobre parâmetros cardiovasculares, tais como SAP, DAP e MAP, bem como a HR. A Figura 10 mostra traçados representativos dos registros da PAP, MAP, HR e do DiaEMG de um rato transfectado com HM3D(Gq)-mCherry nos neurônios da região do pFL em condição basal e 60 minutos após a injeção i.p. de CNO (1mg/kg).

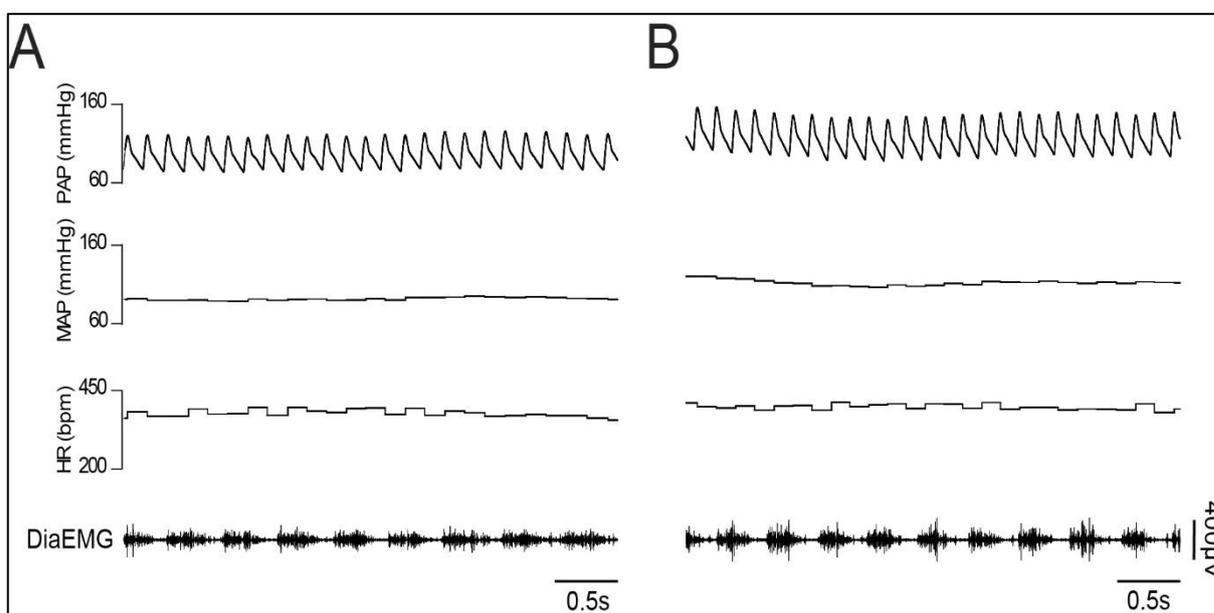


Figura 13 Respostas cardiorrespiratórias à injeção de CNO em um rato que expressa o HM3D(Gq)-mCherry nos neurônios da região pFL. Registros da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (HR) e atividade do eletromiograma do músculo diafragma (DiaEMG) de um rato transfectado com HM3D(Gq)-mCherry nos neurônios da região pFL antes (A) e após 60 minutos (B) da injeção de CNO. Observe que a injeção de CNO aumentou a PAP e a PAM, mas não afetou a HR. A injeção de CNO também reduziu a duração da atividade do DiaEMG (DI) e teve tendência a aumentar o intervalo entre as atividades do DiaEMG (DE).

Os dados agrupados revelaram que a injeção de CNO reduziu a DI (0.14 ± 0.01 vs. 0.24 ± 0.07 s; $p=0.01$; Figura 11, painéis A, B e C), mas não afetou a DE (0.25 ± 0.03 vs. 0.18 ± 0.04 s; $p=0.07$; Figura 11, painéis A, B e D), a fR (142.80 ± 12.45 vs. 141.20 ± 31.06 cpm; $p>0.99$; Figura 11, painéis A, B e E) e a amplitude do DiaEMG (4.94 ± 1.03 vs. 4.05 ± 0.62 μ V; $p=0.73$; Figura 11, painéis A, B e F) de ratos transfectados com HM3D(Gq)-mCherry nos neurônios da região pFL após 60 minutos. Adicionalmente, observamos que a injeção de CNO aumentou a DE após 30 (0.27 ± 0.02 vs. 0.18 ± 0.04 s; $p=0.02$; Figura 11, painel D) e 45 minutos (0.25 ± 0.03 vs. 0.18 ± 0.04 s; $p=0.03$; Figura 11, painel D).

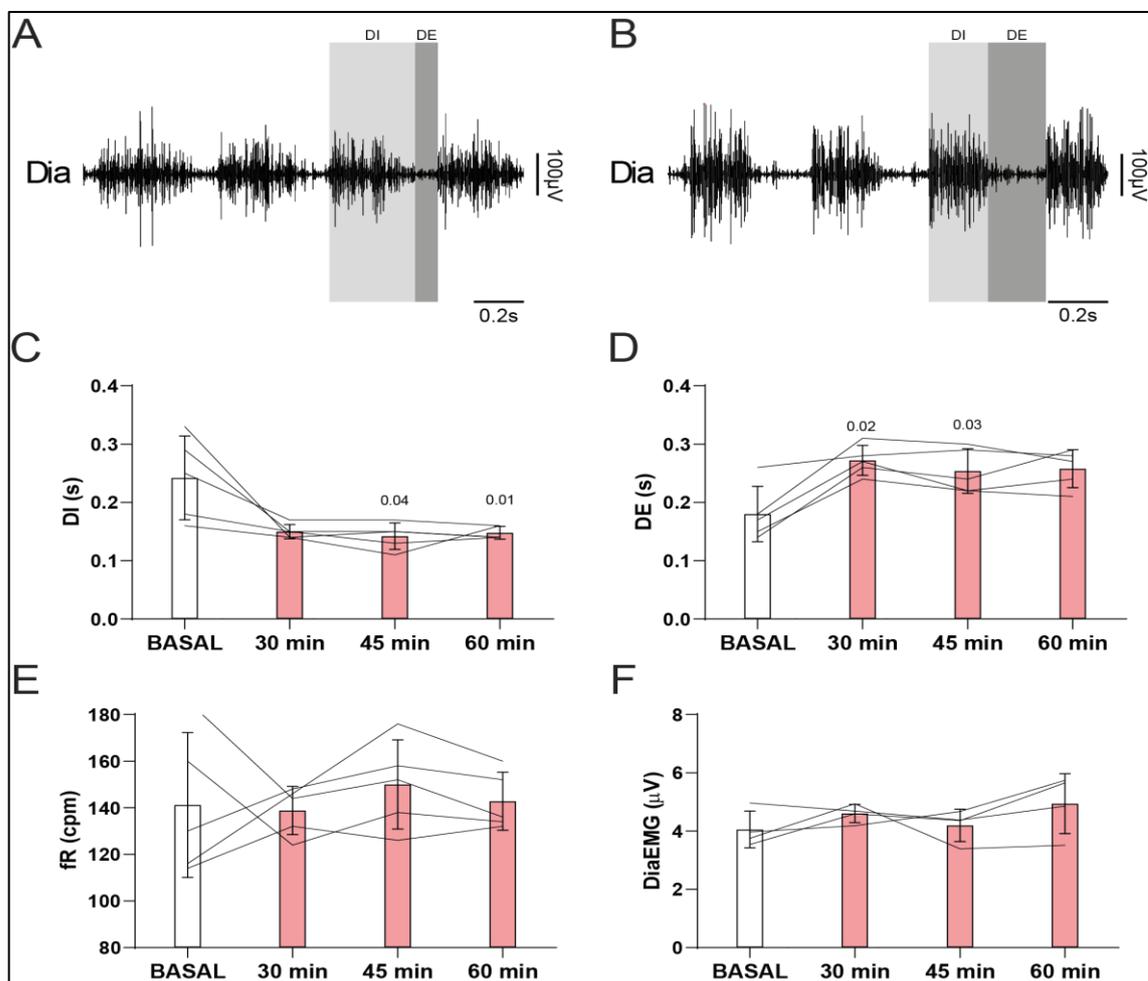


Figura 14 Dados agrupados das respostas respiratórias a injeção de CNO em ratos transfectados com HM3D(Gq)-mCherry nos neurônios da região pFL. Registros brutos da atividade do eletromiograma do músculo diafragma (DiaEMG) de um rato transfectado com HM3D(Gq)-mCherry em neurônios da região pFL antes (A) e após 60 minutos (B) da injeção de CNO. Dados agrupados da duração da inspiração (DI) (C; Teste não-paramétrico de *Friedman* e pós-teste de *Dunn*), duração da expiração (DE) (D; ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*), frequência respiratória (fR) (E; ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*) e amplitude do DiaEMG (F; ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*) de ratos transfectados com HM3D(Gq)-Cherry nos neurônios da região pFL antes e 30, 45 e 60 minutos após a injeção de CNO.

Com relação aos parâmetros cardiovasculares, os dados agrupados demonstram que a injeção de CNO produziu aumento significativo na SAP (153.19 ± 8.63 vs. 130.18 ± 11.05 mmHg; $p=0.0001$; Figura 12, painel A), DAP (104.09 ± 9.26 vs. 86.78 ± 8.88 mmHg; $p=0.001$; Figura 12, painel B) e MAP (125.37 ± 8.77 vs. 105.87 ± 9.55 mmHg; $p=0.0003$; Figura 12, painel C) de ratos transfectados com HM3D(Gq)-mCherry nos neurônios da região pFL após 60 minutos. Por outro lado, a HR (381.47 ± 59.41 vs. 378.38 ± 16.61 bpm; $p>0.99$; Figura 12, painel D) não foi afetada pela injeção de CNO.

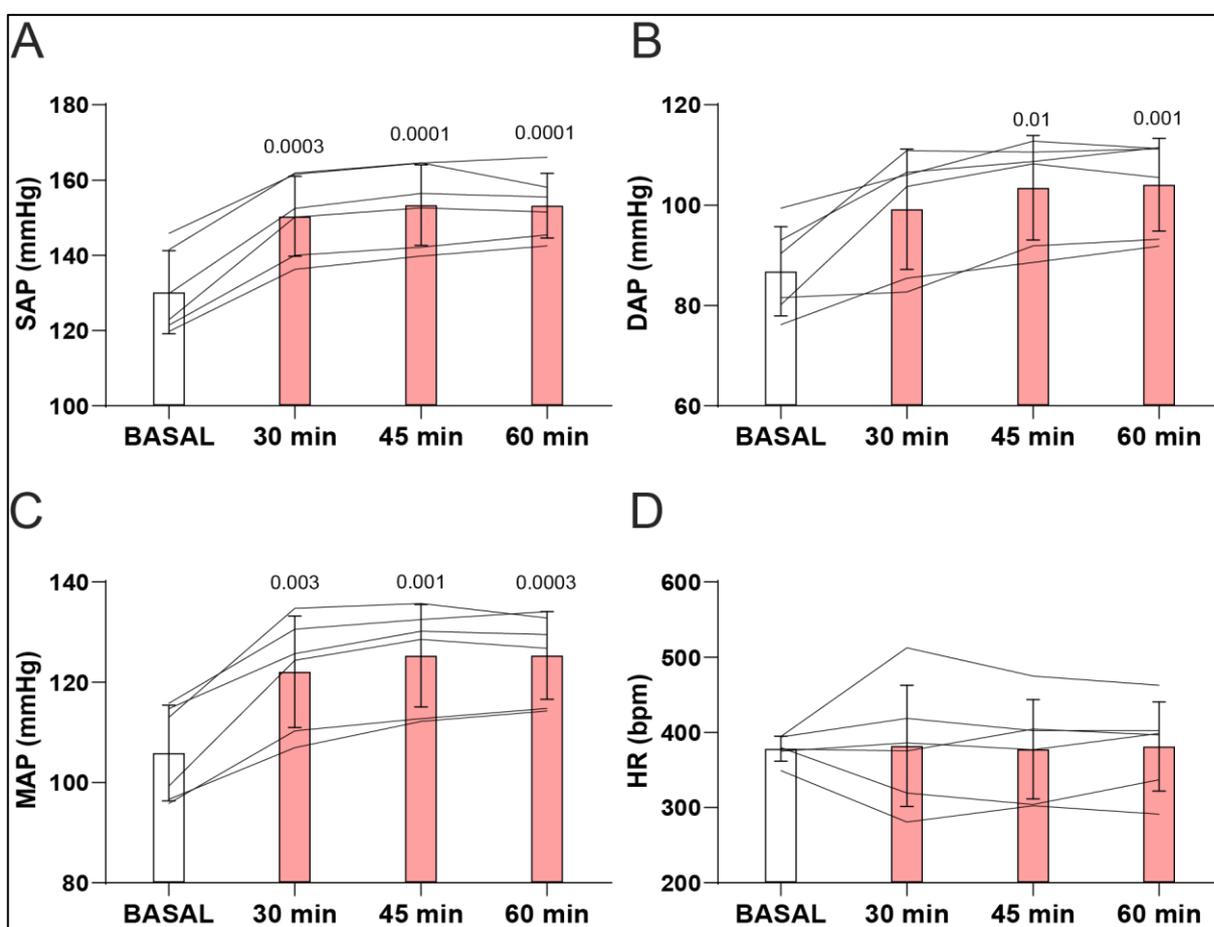


Figura 15 Dados agrupados das respostas cardiovasculares após injeções de CNO em ratos transfectados com HM3D(Gq)-mCherry nos neurônios da região pFL. Dados agrupados da pressão arterial sistólica (SAP) (A; ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*), pressão arterial diastólica (DAP) (B; Teste não-paramétrico de *Friedman* e pós-teste de *Dunn*), pressão arterial média (MAP) (C; ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*) e frequência cardíaca (HR) (D; ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*) de ratos transfectados com HM3D(Gq)-mCherry nos neurônios da região pFL antes e 30, 45 e 60 minutos após a injeção de CNO.

4.2.4. Ausência de alterações cardiotorrespiratórias após injeções de DMSO em ratos transfectados com HM3D(Gq)-mCherry nos neurônios da região pFL

Para confirmar que os efeitos cardiotorrespiratórios observados foram induzidos pela ativação do HM3D(Gq), investigamos o efeito do DMSO (0.02% - veículo da CNO) nos mesmos ratos. As injeções de DMSO ou CNO foram feitas em um intervalo de 24 horas, e a ordem das injeções foi aleatória. A Figura 13 mostra traçados representativos dos registros da PAP, MAP, HR e DiaEMG de um rato transfectado com HM3D(Gq)-mCherry nos neurônios da região pFL em condição basal e 60 minutos após a injeção i.p. de DMSO.

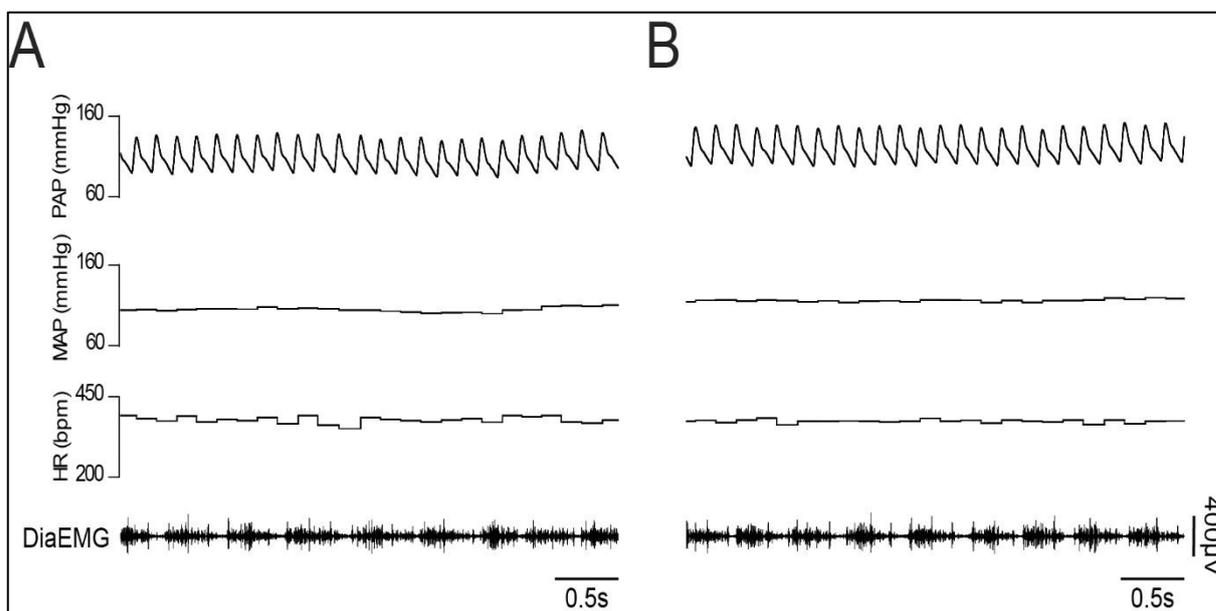


Figura 16 Ausência de respostas cardiotorrespiratórias após injeção de DMSO em um rato transfectado com HM3D(Gq)-mCherry em neurônios da região pFL. Registros brutos da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (HR) e atividade do eletromiograma do músculo diafragma (DiaEMG) de um rato transfectado com HM3D(Gq)-mCherry nos neurônios da região pFL antes (A) e após 60 minutos (B) da injeção de DMSO. Observe que a injeção de DMSO não afetou os parâmetros cardiotorrespiratórios.

Os dados agrupados demonstram que o DMSO não afetou a DI (0.23 ± 0.03 vs. 0.25 ± 0.04 s; $p > 0.99$; Figura 14, painéis A, B e C), DE (0.18 ± 0.004 vs. 0.19 ± 0.02 s; $p = 0.98$; Figura 14, painéis A, B e D), fR (140 ± 10.86 vs. 131.20 ± 18.30 cpm; $p > 0.99$; Figura 14, painéis A, B e E), a amplitude do DiaEMG (3.98 ± 0.97 vs. 4.03 ± 0.89 μ V; $p > 0.99$; Figura 14, painéis A, B e F), SAP (133.60 ± 18.73 vs. 131.70 ± 19.86 mmHg; $p > 0.99$; Figura 15, painel A), DAP (87.84 ± 13.64 vs. 85.13 ± 12.88 mmHg; $p = 0.97$; Figura 15, painel B), MAP (107.48 ± 15.60 vs. 105.60 ± 16.03 mmHg; $p > 0.99$; Figura 15, painel C) e HR (367.78 ± 35.42 vs. 374.55 ± 25.56 bpm; $p = 0.98$; Figura 15, painel D) de ratos transfectados com HM3D(Gq)-mCherry nos neurônios da região pFL após 60 minutos. Esses dados confirmam que as alterações cardiorrespiratórias observadas após a injeção de CNO ocorreram em função de sua ação e não de seu veículo DMSO.

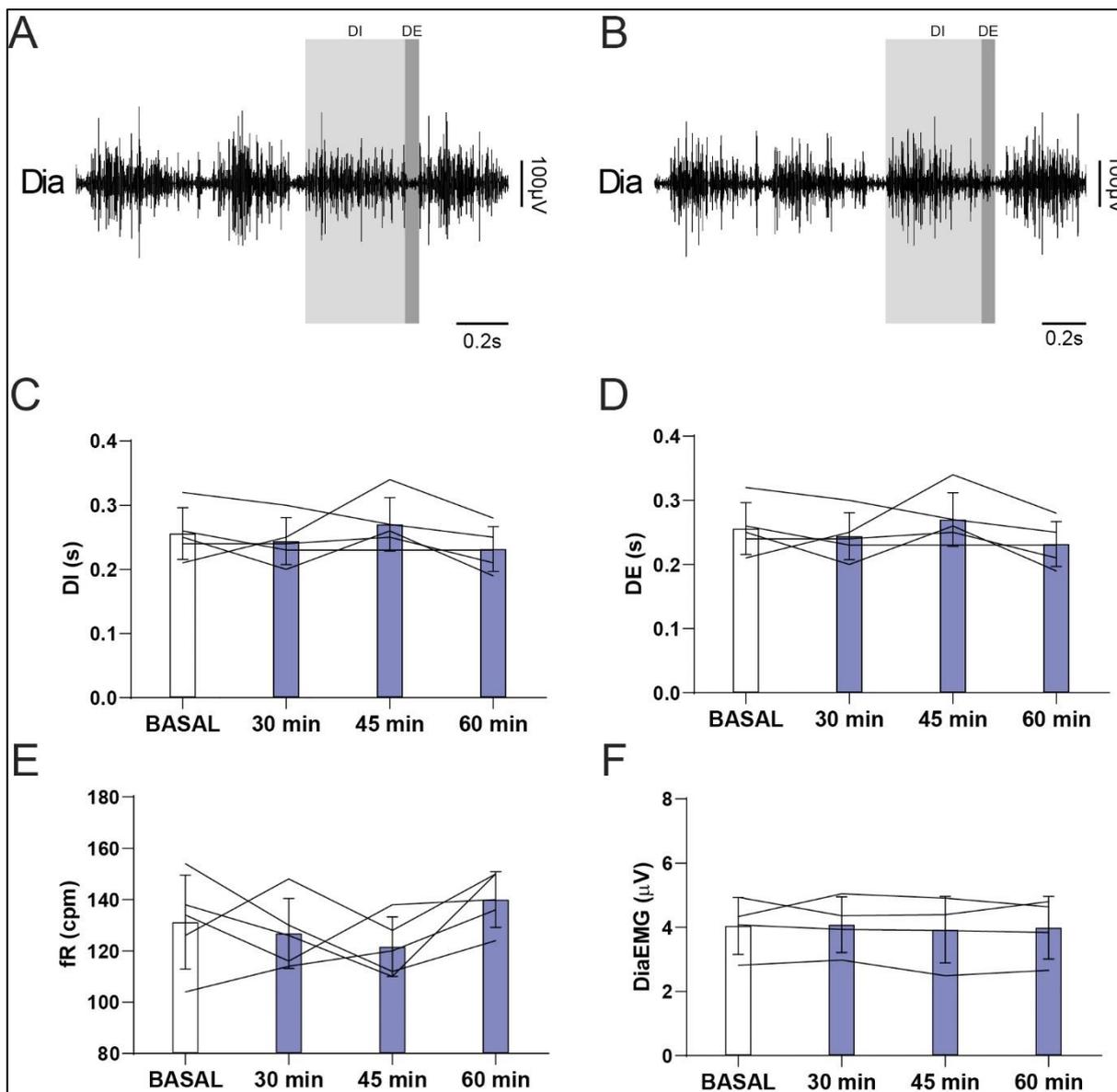


Figura 17 Dados agrupados dos parâmetros respiratórios antes e após injeções de DMSO em ratos transfectados com HM3D(Gq)-mCherry nos neurônios da região pFL. Registros brutos da atividade do eletromiograma do músculo diafragma (DiaEMG) de um rato transfectado com HM3D(Gq)-mCherry nos neurônios da região pFL antes (A) e após 60 minutos (B) a injeção de DMSO. Dados agrupados da duração da inspiração (DI) (C; ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*), duração da expiração (DE) (D; Teste não-paramétrico de *Friedman* e pós-teste de *Dunn*), frequência respiratória (fR) (E; ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*) e amplitude do DiaEMG (F; ANOVA-*One way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*) de ratos transfectados com HM3D(Gq)-mCherry nos neurônios da região pFL antes e 30, 45 e 60 minutos após a injeção de DMSO.

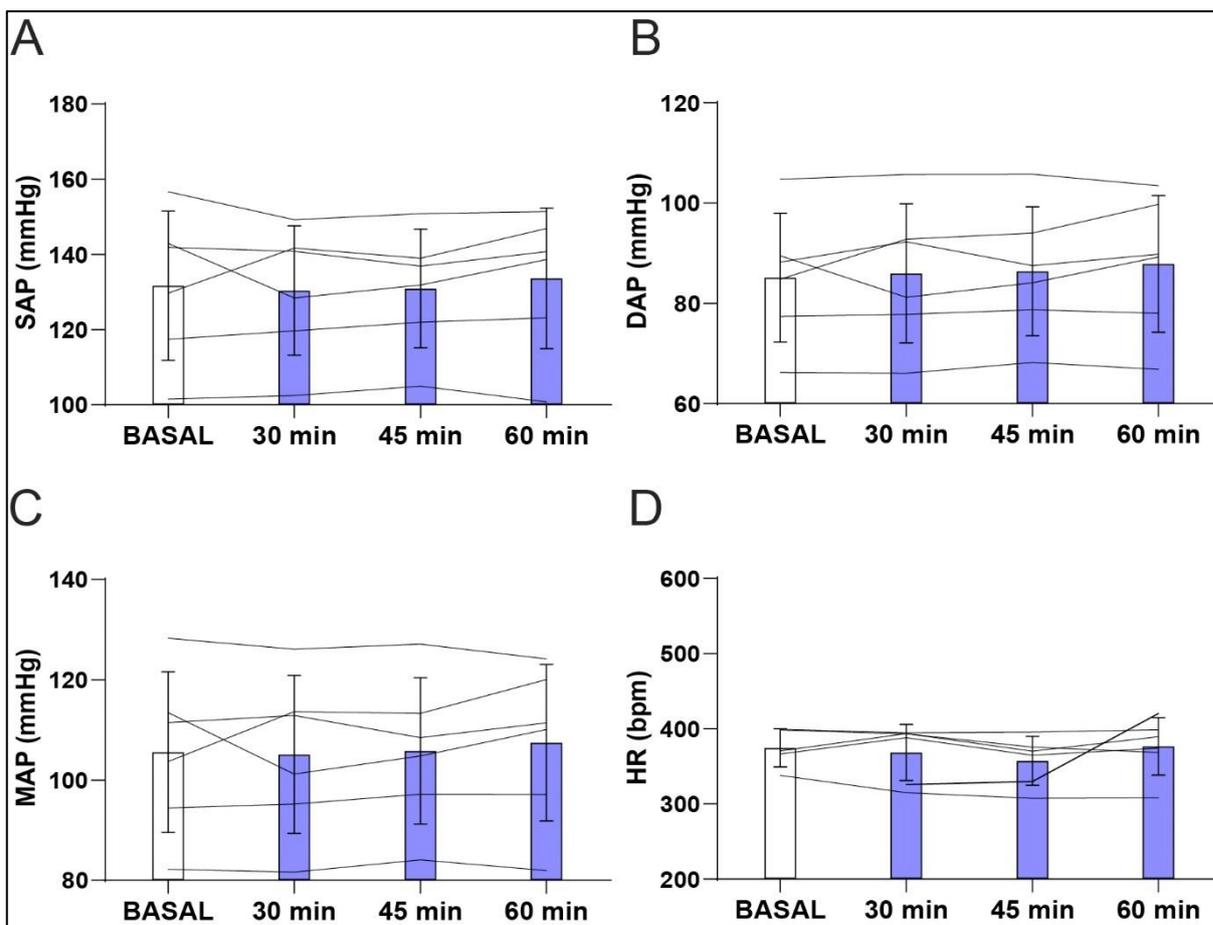


Figura 185. Dados agrupados dos parâmetros cardiovasculares antes e após injeções de DMSO em ratos transfectados com HM3D(Gq)-mCherry nos neurônios da região pFL. Dados agrupados da pressão arterial sistólica (SAP) (A; ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*), pressão arterial diastólica (DAP) (B; ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*), pressão arterial média (MAP) (C; ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*) e frequência cardíaca (HR) (D; Teste não-paramétrico de *Friedman* e pós-teste de *Dunn*) de ratos transfectados com HM3D(Gq)-mCherry nos neurônios da região pFL antes e 30, 45 e 60 minutos após a injeção de DMSO.

4.2.5. Ausência de alterações cardiovasculares após injeções de CNO em ratos transfectados com mCherry nos neurônios da região pFL

Por fim, confirmamos se o CNO estaria agindo sobre o HM3D(Gq), expresso nos neurônios da região pFL, realizando injeções de CNO em ratos transfectados com um AAV para expressar apenas a proteína fluorescente mCherry (4 animais). A injeção de CNO não afetou a SAP (141.86 ± 2.92 vs. 135.07 ± 5.22 mmHg; $p=0.95$; Figura 16, painel A), DAP (89.87 ± 5.06 vs. 88.72 ± 2.39 mmHg; $p>0.99$; Figura 16, painel B), MAP (115.58 ± 8.82 vs. 109.89 ± 3.01 mmHg; $p=0.30$; Figura 16, painel C) e HR (354.08 ± 16.66 vs. 355.07 ± 20.08 bpm; $p>0.99$; Figura 16, painel D) de ratos transfectados com mCherry nos neurônios da região pFL após 60 minutos. Esses dados demonstram que as alterações vasculares observadas após as injeções de CNO ocorreram em função da ativação do HM3D(Gq) expresso nos neurônios da região pFL.

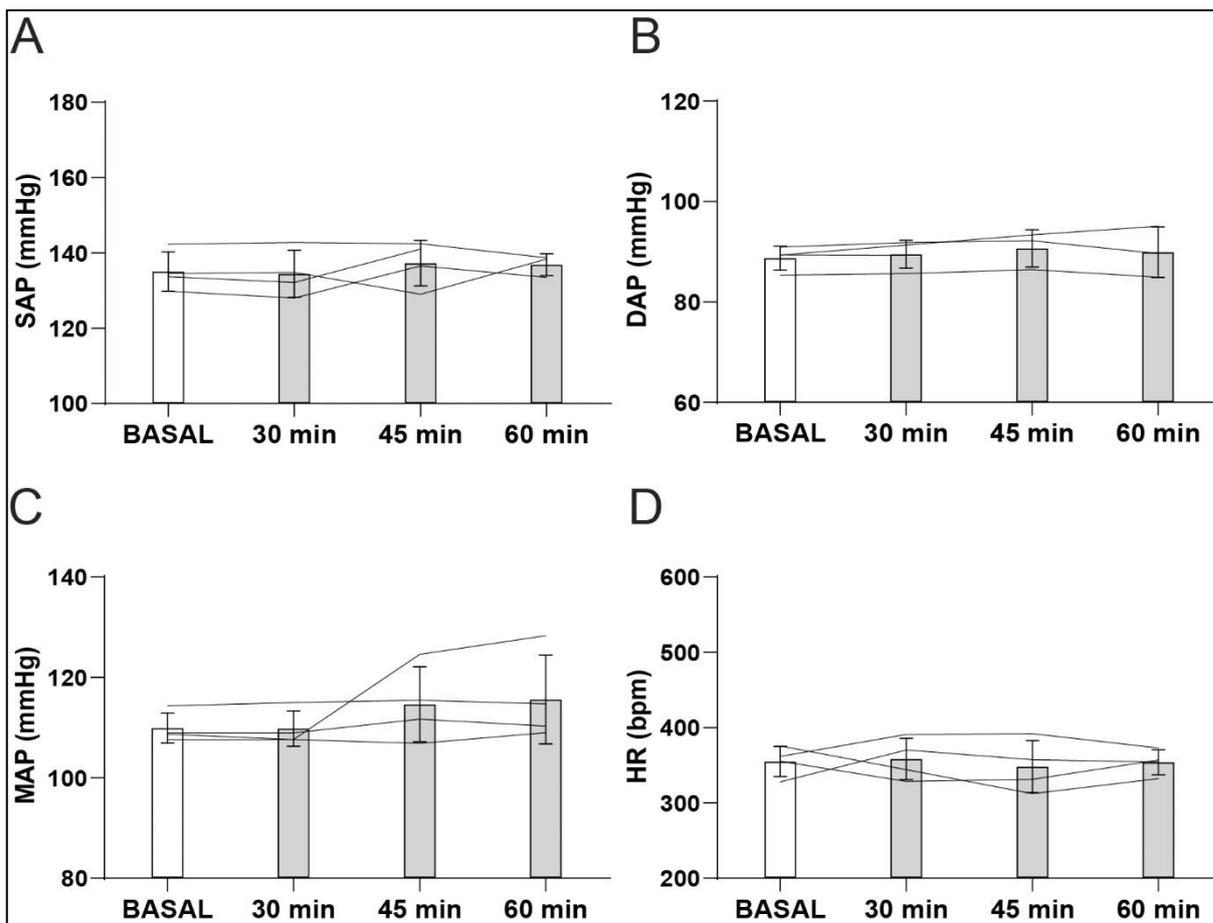


Figura 19 Dados agrupados dos parâmetros cardiovasculares antes e após injeções de CNO em ratos transfectados com mCherry nos neurônios da região pFL. Dados agrupados da pressão arterial sistólica (SAP) (A; ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*), pressão arterial diastólica (DAP) (B; ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*), pressão arterial média (MAP) (C; Teste não-paramétrico de *Friedman* e pós-teste de *Dunn*) e frequência cardíaca (HR) (D; ANOVA *One-way* com medidas repetidas e pós-teste de *Bonferroni*) de ratos transfectados com mCherry nos neurônios da região pFL antes e 30, 45 e 60 minutos após a injeção de CNO.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Nós demonstramos pela primeira vez que a fotoestimulação dos neurônios da região pFL aumentou a atividade simpática, a PP e a atividade dos neurônios pré-simpáticos C1 do RVLM em preparações *in situ* de ratos. O recrutamento da AE, com aumentos simultâneos da atividade simpática, ocorreu independentemente da fase do ciclo respiratório em que os neurônios da região pFL foram estimulados. Adicionalmente, a estimulação química e sustentada dos neurônios da região pFL, utilizando os DREADDs, aumentou a pressão arterial, mas não a HR, de ratos com livre movimentação. Esses dados revelaram que os neurônios da região pFL geram a expiração ativa, independente da fase do ciclo respiratório, e possuem um papel importante na modulação expiratória da atividade vasomotora simpática, por meio de conexões com os neurônios pré-simpáticos C1 do RVLM, impactando assim na função vascular de ratos. Esses achados possuem implicações fisiológicas importantes em condições de desafios respiratórios, tais hipercapnia/acidose (ABDALA et al., 2009b) e hipóxia (ABDALA et al., 2009a; ZOCCAL et al., 2008; ZOCCAL; PATON; MACHADO, 2009), bem como em condições patológicas, tais como hipertensão arterial (MORAES; MACHADO; PATON, 2014) e insuficiência cardíaca (LATARO et al., 2023), as quais a expiração ativa e a hiperatividade simpática estão presentes.

A região pFL, localizada adjacente ao núcleo motor facial, contém neurônios glutamatérgicos silentes em condições basais que podem se tornar ritmicamente ativos no final da E2 em condições de desafios respiratórios (ABDALA et al., 2009b; MORAES et al., 2012). A desinibição dessa região é fundamental para a geração da AE (MAGALHÃES et al., 2021; PAGLIARDINI et al., 2011). Até o momento, ainda não se identificou um marcador exclusivo dos neurônios da região pFL. Dessa forma, nos nossos estudos, a validação da transfecção dos neurônios da região pFL se deu pela localização das microinjeções na porção lateral e ventral ao núcleo motor facial. Além disso, observamos em preparações *in situ* de ratos que a fotoestimulação dos neurônios dessa região foi capaz de gerar AE, caracterizada pelo recrutamento do AbN no final da E2, com simultâneo aumento da atividade pre-I dos SLN e HN (Figura 4, painéis A e Bii). Essas respostas foram semelhantes às encontradas durante o recrutamento da AE em preparações *in situ* de ratos resposta aos desafios respiratórios (ABDALA et al., 2009b; DE BRITTO; MORAES, 2017; MAGALHÃES et

al., 2020; MOLKOV et al., 2010) e em condições patológicas como as mimetizadas pela CIH (DA SILVA et al., 2021; MORAES; MACHADO, 2015), as quais estão associadas com o recrutamento dos neurônios da região pFL.

A fotoestimulação de curta duração (0.25 s) dos neurônios da região pFL durante a fase a Insp inibiu a atividade do PN, evocou a AE e, em seguida, reiniciou o ciclo respiratório (Figura 6, painéis Bi e D). Com isso, observamos uma redução drástica na duração do ciclo respiratório e na DE, bem como na DI, durante a fotoestimulação dos neurônios da região pFL na Insp. Próximo à região pFL estão localizados neurônios quimiossensíveis do Núcleo Retrotrapezóide (RTN) (GUYENET; BAYLISS, 2022). A fotoestimulação dos neurônios do RTN Phox2b-positivos durante a Insp não alterou a DI de ratos não-anestesiados (ABBOTT et al., 2011). Esses dados demonstram que os neurônios do RTN não são capazes de reiniciar o ciclo respiratório uma vez que a Insp tenha iniciado. Existem evidências de que os neurônios localizados na região pFL projetam-se para o preBötC (YANG et al., 2020). Além disso, em 2016, Huckstepp e colaboradores demonstraram que a inibição química sustentada dos neurônios do preBötC, responsáveis pela geração do ritmo inspiratório, foi capaz de evocar a AE. Interessantemente, esses autores demonstraram que a geração da AE, em resposta a ativação dos neurônios da região pFL, depende da integridade dos neurônios inspiratórios do preBötC (HUCKSTEPP et al., 2016). Juntas, essas evidências sugerem que os neurônios da região pFL e do preBötC geram inibição mútua quando são recrutados durante a expiração e inspiração, respectivamente.

Existem evidências de que a fotoestimulação dos neurônios do RTN foi capaz de aumentar a amplitude da atividade do DiaEMG durante a Insp *in vivo* (SOUZA et al., 2020), o que não foi observado por nós nos experimentos *in situ* (amplitude do PN; Figura 4, painel D) e *in vivo* (amplitude do DiaEMG; Figura 11, painel F) após à estimulação dos neurônios da região pFL usando optogenética e farmacogenética, respectivamente. A fotoestimulação de curta duração dos neurônios da região pFL nas diferentes fases do ciclo respiratório foi capaz de evocar a AE, com aumento simultâneo da atividade do tSN, de maneira semelhante independente da fase do ciclo respiratório. Anteriormente, a fotoestimulação dos neurônios do RTN durante a expiração foi capaz de evocar a AE (SOUZA et al., 2020). Entretanto, esses autores não reportaram a geração da AE em outras fases do ciclo respiratório (Insp e post-I) em resposta à ativação dos neurônios do RTN. Além disso, o recrutamento da AE

durante a expiração ocorreu após o estímulo dos neurônios do RTN (SOUZA et al., 2020), enquanto que a fotoestimulação dos neurônios da região pFL recrutou a AE simultaneamente com o estímulo (Figura 6, painéis A, Bi e Bii), reforçando a diferença funcional entre as duas populações neuronais vizinhas (pFL e RTN).

Observamos que a ativação dos neurônios da região pFL provocou aumento da atividade do tSN, somente no final da E2, aumentou a amplitude das THW e a pressão arterial de ratos. Existem evidências de que a fotoestimulação dos neurônios do RTN não altera a atividade simpática e a pressão arterial (ABBOTT et al., 2009). Reconhecemos que alguns poucos neurônios do RTN (medial à região pFL) foram transfectados nos nossos experimentos. Entretanto, as evidências funcionais descritas acima reforçam a nossa conclusão de que as respostas observadas nos experimentos *in situ* e *in vivo* ocorreram em função da ativação dos neurônios da região pFL de ratos.

Os neurônios pré-simpáticos do RVLM apresentam modulação respiratória em condições basais, sendo essas observadas durante a Insp (C1) e post-I (não-C1) (HASELTON; GUYENET, 1989; MORAES et al., 2013, 2016). Anteriormente, observou-se que o modelo de CIH, o qual é dependente da ativação intermitente do corpúsculo carotídeo (CB), provocou a modulação expiratória dos neurônios não-C1 do RVLM (modulados pela post-I) (MORAES et al., 2013). Adicionalmente, a ativação do CB provoca o recrutamento dos neurônios da região pFL (MORAES et al., 2012), sugerindo que a ativação intermitente do CB, que ocorre no modelo de CIH, é responsável pela modulação expiração dos neurônios não-C1 do RVLM (modulados pela post-I), via neurônios da região pFL (MACHADO; ZOCCAL; MORAES, 2017; MOLKOV et al., 2011). Nos nossos dados, observamos que a fotoestimulação dos neurônios, que podem ser expiratórios ou tonicamente ativos, da região pFL evocou a modulação expiratória dos neurônios pré-simpáticos C1 do RVLM (TH-positivos e modulados pela Insp). Nós não investigamos os efeitos da fotoestimulação dos neurônios da região pFL na atividade dos neurônios do RVLM com diferentes padrões de modulação respiratória ou sem modulação. Entretanto, acreditamos que outros neurônios localizados no RVLM também possam apresentar modulação expiratória em resposta à ativação dos neurônios da região pFL. Essa hipótese é sustentada pela presença de uma densa rede de projeções dos neurônios da região pFL para o RVLM reportada no presente estudo.

No modelo de CIH, observa-se a geração da AE e aumento da atividade simpática no final da E2 *in situ*, bem como aumento da pressão arterial *in vivo* (MORAES et al., 2013). Nos nossos dados, observamos que a fotoestimulação dos neurônios da região pFL durante 20s aumentou a atividade simpática, a amplitude das THW de preparações *in situ* e a pressão arterial *in vivo*. Dessa forma, é razoável afirmar que os neurônios expiratórios da região pFL são a fonte da transmissão sináptica excitatória para os neurônios pré-simpáticos do RVLM durante a AE em condições de desafios respiratórios. As posições entre os botões axonais dos neurônios da região pFL e os somas dos neurônios C1 do RVLM observadas nesse trabalho é um dado anatômico que reforça essa afirmação. Ainda neste sentido, existem evidências de que o modelo de CIH provoca aumento da frequência dos potenciais de ação dos neurônios pré-simpáticos do RVLM no final da E2, sem alterar as propriedades eletrofisiológicas intrínsecas dos mesmos (MORAES et al., 2013). Por outro lado, o modelo de CIH aumentou a transmissão sináptica excitatória para os neurônios pré-simpáticos do RVLM somente no final da E2 (MORAES et al., 2013). Esses dados sugerem que a modulação expiratória dos neurônios pré-simpáticos do RVLM, e da atividade simpática, após a CIH é decorrente da transmissão sináptica excitatória proveniente dos neurônios expiratórios da região pFL (MACHADO; ZOCCAL; MORAES, 2017; MOLKOV et al., 2011). Considerando as evidências observadas no modelo de CIH e as apresentadas no presente trabalho, experimentos eletrofisiológicos adicionais são necessários para avaliar a presença da transmissão sináptica excitatória direta entre os neurônios da região pFL e os neurônios pré-simpáticos do RVLM.

Encontramos dois tipos de neurônios na região pFL: i) neurônios que eram silentes e apresentaram potenciais de ação no final da E2 durante a fotoestimulação, e; ii) neurônios que eram tonicamente ativos e apresentaram aumento da frequência de potenciais de ação durante todo o período de fotoestimulação. Dessa forma, apesar da fotoestimulação dos neurônios da região pFL ter evocado a AE, e gerado a modulação expiratória da atividade simpática e dos neurônios pré-simpáticos do RVLM, precisamos levar em consideração a limitação de que nós não estimulamos apenas os neurônios expiratórios da região pFL. Neste sentido, experimentos adicionais são necessários para investigar a contribuição individual das diferentes populações de neurônios da região pFL na modulação da função vascular, da atividade simpática e da atividade dos neurônios pré-simpáticos do RVLM.

O aumento do acoplamento simpático-respiratório, bem como, da modulação respiratória da atividade dos neurônios pré-simpáticos do RVLM, tem sido associado com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como a hipertensão arterial (TONEY et al., 2010). Entretanto, os mecanismos eletrofisiológicos envolvidos nestas alterações, sobretudo durante a expiração, ainda não são totalmente compreendidos. Nós demonstramos que os neurônios da região pFL se projetam para os neurônios pré-simpáticos C1 do RVLM, e que ao serem ativados provocam aumentos dos níveis de pressão arterial, bem como da atividade simpática durante a expiração. Neste sentido, os dados obtidos no presente estudo reforçam a hipótese de que a modulação expiratória dos neurônios pré-simpáticos do RVLM, da atividade vasomotora simpática, e conseqüentemente dos níveis de pressão arterial, é dependente da integridade dos neurônios da região pFL. Essa via neural pode ter implicações patológicas no desenvolvimento de disfunções cardiovasculares, como na hipertensão arterial e insuficiência cardíaca.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Além de seu papel no recrutamento da musculatura abdominal para geração da AE em condições de desafios respiratórios, os neurônios da região pFL geram a modulação expiratória dos neurônios pré-simpáticos do RVLM e da atividade simpática, bem como determinam a função vascular de ratos.

Dessa forma, compreender a interação entre essas duas populações neuronais pode ser essencial no melhor entendimento de como alterações na modulação expiratória da atividade vasomotora podem contribuir para o desenvolvimento da hipertensão arterial.

7. REFERÊNCIAS GERAIS

ABBOTT, S. B. G. et al. Photostimulation of Retrotrapezoid Nucleus Phox2b-Expressing Neurons In Vivo Produces Long-Lasting Activation of Breathing in Rats. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 18, p. 5806–5819, 6 maio 2009.

ABBOTT, S. B. G. et al. Phox2b-Expressing Neurons of the Parafacial Region Regulate Breathing Rate, Inspiration, and Expiration in Conscious Rats. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 45, p. 16410–16422, 9 nov. 2011.

ABBOTT, S. B. G. et al. Optogenetic Stimulation of C1 and Retrotrapezoid Nucleus Neurons Causes Sleep State–Dependent Cardiorespiratory Stimulation and Arousal in Rats. **Hypertension**, v. 61, n. 4, p. 835–841, abr. 2013.

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. **The Journal of Physiology**, v. 587, n. 14, p. 3539–3559, 15 jul. 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.

ADRIAN, E. D.; BRONK, D. W.; PHILLIPS, G. Discharges in mammalian sympathetic nerves. **The Journal of Physiology**, v. 74, n. 2, p. 115–133, 8 fev. 1932.

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.

BAEKEY, D. M. et al. Effect of baroreceptor stimulation on the respiratory pattern: Insights into respiratory–sympathetic interactions. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 174, n. 1–2, p. 135–145, nov. 2010.

BAYLISS, D. A. et al. TASK-1 is a highly modulated pH-sensitive ‘leak’ K⁺ channel expressed in brainstem respiratory neurons. **Respiration Physiology**, v. 129, n. 1–2, p. 159–174, dez. 2001.

BAYLISS, D. A. et al. The role of pH-sensitive TASK channels in central respiratory chemoreception. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 467, n. 5, p. 917–929, 28 maio 2015.

BAYLISS, D. A.; SIROIS, J. E.; TALLEY, E. M. The TASK family: two-pore domain background K⁺ channels. **Molecular Interventions**, v. 3, n. 4, p. 205–19, 1 jun. 2003.

BERG, A. P. et al. Motoneurons Express Heteromeric TWIK-Related Acid-Sensitive K⁺ (TASK) Channels Containing TASK-1 (KCNK3) and TASK-3 (KCNK9) Subunits. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 30, p. 6693–6702, 28 jul. 2004.

BIANCARDI, V. et al. Mapping of the excitatory, inhibitory, and modulatory afferent projections to the anatomically defined active expiratory oscillator in adult male rats.

Journal of Comparative Neurology, v. 529, n. 4, p. 853–884, 10 mar. 2021.

BOUTIN, R. C. T.; ALSAHAFI, Z.; PAGLIARDINI, S. Cholinergic modulation of the parafacial respiratory group. **The Journal of Physiology**, v. 595, n. 4, p. 1377–1392, 15 fev. 2017.

BRAGA, V. A. et al. Involvement of NMDA -glutamate and ATP in the neurotransmission of the sympathoexcitatory component of the chemoreflex in the commissural nucleus tractus solitarii of awake rats and in the working heart–brainstem preparation. **The Journal of Physiology**, v. 581, n. 3, p. 1129–1145, 15 jun. 2007.

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.

BRITTO, A. A. et al. Active expiratory oscillator regulates nasofacial and oral motor activities in rats. **Experimental Physiology**, v. 105, n. 2, p. 379–392, 14 fev. 2020.

BRONK, D. W. et al. THE ACTIVITY OF THE CARDIAC SYMPATHETIC CENTERS. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 117, n. 2, p. 237–249, 30 set. 1936.

CARTER, M. et al. Manipulating Neural Activity. In: **Guide to Research Techniques in Neuroscience**. [s.l.] Elsevier, 2022. p. 191–208.

COMBE, C. L.; GASPARINI, S. Ih from synapses to networks: HCN channel functions and modulation in neurons. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, n. xxxx, jun. 2021.

COSTA, R. R.; VARANDA, W. A. Intracellular calcium changes in mice Leydig cells are dependent on calcium entry through T-type calcium channels. **The Journal of Physiology**, v. 585, n. 2, p. 339–349, 1 dez. 2007.

DA SILVA, M. P. et al. Hyperexcitability and plasticity induced by sustained hypoxia on rectus abdominis motoneurons. **The Journal of Physiology**, v. 597, n. 7, p. 1935–1956, abr. 2019.

DA SILVA, M. P. et al. Chronic intermittent hypoxia increases excitability and synaptic excitation of protruder and retractor hypoglossal motoneurons. **The Journal of Physiology**, v. 599, n. 6, p. 1917–1932, 15 mar. 2021.

DA SILVA, M. P. et al. Peripheral chemoreflex activation induces expiratory but not inspiratory excitation of C1 pre-sympathetic neurones of rats. **Acta Physiologica**, v. 235, n. 4, 28 ago. 2022.

DAMPNEY, R. A. L. Brain Stem Mechanisms in the Control of Arterial Pressure. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 3, n. 3, p. 379–391, 3 jan. 1981.

DAMPNEY, R. A. L. et al. Role of ventrolateral medulla in vasomotor regulation: a correlative anatomical and physiological study. **Brain Research**, v. 249, n. 2, p. 223–235, out. 1982.

DAMPNEY, R. A. L. et al. Medullary and supramedullary mechanisms regulating sympathetic vasomotor tone. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 177, n. 3, p. 209–218, 28 mar. 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.

DEL NEGRO, C. A. et al. Sodium and Calcium Current-Mediated Pacemaker Neurons and Respiratory Rhythm Generation. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 2, p. 446–453, 12 jan. 2005.

DEL NEGRO, C. A.; FUNK, G. D.; FELDMAN, J. L. Breathing matters. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 6, p. 351–367, 8 jun. 2018.

DEMPSEY, J. A. et al. Pathophysiology of Sleep Apnea. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 1, p. 47–112, jan. 2010.

DICK, T. E. et al. Entrainment pattern between sympathetic and phrenic nerve activities in the Sprague-Dawley rat: hypoxia-evoked sympathetic activity during expiration. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 286, n. 6, p. R1121–R1128, jun. 2004.

DUTSCHMANN, M. et al. The physiological significance of postinspiration in respiratory control. In: [s.l.: s.n.]. p. 113–130.

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.

EZURE, K.; TANAKA, I.; KONDO, M. Glycine Is Used as a Transmitter by Decrementing Expiratory Neurons of the Ventrolateral Medulla in the Rat. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 26, p. 8941–8948, 1 out. 2003.

FLOR, K. C. et al. Inhibitory control of active expiration by the Bötzing complex in rats. **The Journal of Physiology**, v. 598, n. 21, p. 4969–4994, 24 nov. 2020.

FORTUNA, M. G. et al. Botzinger Expiratory-Augmenting Neurons and the Parafacial Respiratory Group. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 10, p. 2506–2515, 5 mar. 2008.

GESTREAU, C. et al. TASK2 potassium channels set central respiratory CO₂ and O₂ sensitivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 5, p. 2325–2330, 2 fev. 2010.

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

GUYENET, P. G. et al. The Retrotrapezoid Nucleus: Central Chemoreceptor and Regulator of Breathing Automaticity. **Trends in Neurosciences**, v. 42, n. 11, p. 807–824, nov. 2019.

GUYENET, P. G.; BAYLISS, D. A. Neural Control of Breathing and CO₂ Homeostasis. **Neuron**, v. 87, n. 5, p. 946–961, set. 2015.

GUYENET, P. G.; BAYLISS, D. A. Central respiratory chemoreception. In: **Handbook of Clinical Neurology**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2022. v. 188p. 37–72.

GUYENET, P. G.; STORNETTA, R. L. Rostral ventrolateral medulla, retropontine region and autonomic regulations. **Autonomic Neuroscience**, v. 237, p. 102922, jan. 2022.

HASELTON, J. R.; GUYENET, P. G. Central respiratory modulation of medullary sympathoexcitatory neurons in rat. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 256, n. 3, p. R739–R750, 1 mar. 1989.

HERING, E. Über Atembewegungen des Gefäßsystems. **Sitzungb Akad Wissensch Math Naturwissensch**, v. 60, p. 829–856, 1869.

HILLE, B. Ion channels of excitable membranes. **Sinauer, Sunderland, MA**, 2001.

HOKFELT, T. et al. Immunohistochemical evidence for the existence of adrenaline neurons in the rat brain. **Brain Research**, v. 66, n. 2, p. 235–251, fev. 1974.

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, 2015.

HUCKSTEPP, R. T. R. et al. Interactions between respiratory oscillators in adult rats. **eLife**, v. 5, n. JUN2016, p. 1–22, 2016.

HUCKSTEPP, R. T. R. et al. Distinct parafacial regions in control of breathing in adult rats. **PLOS ONE**, v. 13, n. 8, p. e0201485, 10 ago. 2018.

HUFF, A. et al. Role of the postinspiratory complex in regulating swallow–breathing coordination and other laryngeal behaviors. **eLife**, v. 12, 5 jun. 2023.

IKEDA, K. et al. Optogenetic analysis of respiratory neuronal networks in the ventral medulla of neonatal rats producing channelrhodopsin in Phox2b-positive cells. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 471, n. 11–12, p. 1419–1439, 20 dez. 2019.

JANCZEWSKI, W. A. et al. Opioid-resistant respiratory pathway from the preinspiratory neurones to abdominal muscles: in vivo and in vitro study in the newborn rat. **The Journal of Physiology**, v. 545, n. 3, p. 1017–1026, dez. 2002.

JANCZEWSKI, W. A.; FELDMAN, J. L. Distinct rhythm generators for inspiration and expiration in the juvenile rat. **The Journal of Physiology**, v. 570, n. 2, p. 407–420, jan. 2006.

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

KANG, H. W. et al. A molecular determinant of nickel inhibition in Cav3.2 T-type calcium channels. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 8, p. 4823–4830,

2006.

KANJHAN, R. et al. A comparative study of pre-sympathetic and Bötzing neurons in the rostral ventrolateral medulla (RVLM) of the rat. **Brain Research**, v. 699, n. 1, p. 19–32, nov. 1995.

KAWAI, A. et al. Chemosensitive medullary neurones in the brainstem--spinal cord preparation of the neonatal rat. **The Journal of Physiology**, v. 492, n. 1, p. 277–292, 1 abr. 1996.

KIM, D. et al. Lack of the Burst Firing of Thalamocortical Relay Neurons and Resistance to Absence Seizures in Mice Lacking $\alpha 1G$ T-Type Ca^{2+} Channels. **Neuron**, v. 31, n. 1, p. 35–45, jul. 2001.

KIM, E.-J.; KANG, D.; HAN, J. Baicalein and wogonin are activators of rat TREK-2 two-pore domain K^{+} channel. **Acta Physiologica**, v. 202, n. 2, p. 185–192, jun. 2011.

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.

KOIZUMI, H. et al. Structural-functional properties of identified excitatory and inhibitory interneurons within pre-Bötzing complex respiratory microcircuits. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 7, p. 2994–3009, 2013.

KOIZUMI, H.; SMITH, J. C. Persistent Na^{+} and K^{+} -Dominated Leak Currents Contribute to Respiratory Rhythm Generation in the Pre-Botzinger Complex In Vitro. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 7, p. 1773–1785, 13 fev. 2008.

KUMAR, N. N. et al. Regulation of breathing by CO_2 requires the proton-activated receptor GPR4 in retrotrapezoid nucleus neurons. **Science**, v. 348, n. 6240, p. 1255–1260, 12 jun. 2015.

LATARO, R. M. et al. P2X3 receptor antagonism attenuates the progression of heart failure. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 1725, 28 mar. 2023.

LESAGE, F. Pharmacology of neuronal background potassium channels. **Neuropharmacology**, v. 44, n. 1, p. 1–7, jan. 2003.

LIN, M. et al. Characteristics of single large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels and their regulation of action potentials and excitability in parasympathetic cardiac motoneurons in the nucleus ambiguus. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 306, n. 2, p. C152–C166, 15 jan. 2014.

MACCAFERRI, G. et al. Properties of the hyperpolarization-activated current in rat hippocampal CA1 pyramidal cells. **Journal of Neurophysiology**, v. 69, n. 6, p. 2129–2136, 1 jun. 1993.

MACHADO, B. H.; ZOCCAL, D. B.; MORAES, D. J. A. Neurogenic hypertension and the secrets of respiration. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 312, n. 6, p. R864–R872, 2017.

MAGALHÃES, K. S. et al. A6 neurons simultaneously modulate active expiration and upper airway resistance in rats. **Experimental Physiology**, v. 105, n. 1, p. 53–64, 20 jan. 2020.

MAGALHÃES, K. S. et al. Intrinsic and synaptic mechanisms controlling the expiratory activity of excitatory lateral parafacial neurones of rats. **The Journal of Physiology**, v. 0, p. 1–24, 2021.

MAGEE, J. C. Dendritic Ih normalizes temporal summation in hippocampal CA1 neurons. **Nature Neuroscience**, v. 2, n. 6, p. 508–514, jun. 1999.

MARINA, N. et al. Essential Role of Phox2b-Expressing Ventrolateral Brainstem Neurons in the Chemosensory Control of Inspiration and Expiration. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 37, p. 12466–12473, 15 set. 2010.

MATSUSHIMA, T. et al. GABAB receptor activation causes a depression of low- and high-voltage-activated Ca²⁺ currents, postinhibitory rebound, and postspike afterhyperpolarization in lamprey neurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 70, n. 6, p. 2606–2619, 1 dez. 1993.

MENUET, C. et al. Excessive Respiratory Modulation of Blood Pressure Triggers Hypertension. **Cell Metabolism**, v. 25, n. 3, p. 739–748, mar. 2017.

MENUET, C. et al. PreBötzinger complex neurons drive respiratory modulation of blood pressure and heart rate. **eLife**, v. 9, 15 jun. 2020.

MILLER, A. D. Localization of motoneurons innervating individual abdominal muscles of the cat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 256, n. 4, p. 600–606, 22 fev. 1987.

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, 1 ago. 2012.

MORAES, D. J. A. et al. Electrophysiological Properties of Rostral Ventrolateral Medulla Presympathetic Neurons Modulated by the Respiratory Network in Rats. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 49, p. 19223–19237, 4 dez. 2013.

MORAES, D. J. A. et al. Short-term sustained hypoxia induces changes in the coupling of sympathetic and respiratory activities in rats. **Journal of Physiology**, v. 592, n. 9, p. 2013–2033, 2014.

MORAES, D. J. A. et al. Respiratory Network Enhances the Sympathoinhibitory Component of Baroreflex of Rats Submitted to Chronic Intermittent Hypoxia.

Hypertension, v. 68, n. 4, p. 1021–1030, out. 2016.

MORAES, D. J. A.; MACHADO, B. H. Electrophysiological properties of laryngeal motoneurons in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. **The Journal of Physiology**, v. 593, n. 3, p. 619–634, 1 fev. 2015.

MORAES, D. J. A.; MACHADO, B. H.; PATON, J. F. R. Specific Respiratory Neuron Types Have Increased Excitability That Drive Presympathetic Neurons in Neurogenic Hypertension. **Hypertension**, v. 63, n. 6, p. 1309–1318, jun. 2014.

MORAES, D. J. A.; MACHADO, B. H.; ZOCCAL, D. B. Coupling of respiratory and sympathetic activities in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. In: **Progress in Brain Research**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2014. v. 212p. 25–38.

MORAES, D. J. A.; ZOCCAL, D. B.; MACHADO, B. H. Medullary respiratory network drives sympathetic overactivity and hypertension in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. **Hypertension**, v. 60, n. 6, p. 1374–1380, 2012a.

MORAES, D. J. A.; ZOCCAL, D. B.; MACHADO, B. H. Sympathoexcitation during chemoreflex active expiration is mediated by L-glutamate in the RVLM/Botzinger complex of rats. **Journal of Neurophysiology**, v. 108, n. 2, p. 610–623, 2012b.

MORAES, D. J.; ZOCCAL, D. B.; MACHADO, B. H. Intracellular recordings of respiratory and pre-sympathetic neurons in the ventrolateral medulla of rats submitted to chronic intermittent hypoxia. **The FASEB Journal**, v. 26, n. S1, abr. 2012c.

MULKEY, D. K. et al. Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. **Nature Neuroscience**, v. 7, n. 12, p. 1360–1369, 21 dez. 2004.

NUMAO, Y. et al. Central respiratory drive-related activity in sympathetic nerves of the rat: the regional differences. **Neuroscience Letters**, v. 81, n. 3, p. 279–284, out. 1987.

ONIMARU, H. et al. Cytoarchitecture and CO₂ Sensitivity of Phox2b-Positive Parafacial Neurons in the Newborn Rat Medulla. In: [s.l.: s.n.]. p. 57–71.

ONIMARU, H.; ARATA, A.; HOMMA, I. Intrinsic burst generation of preinspiratory neurons in the medulla of brainstem-spinal cord preparations isolated from newborn rats. **Experimental Brain Research**, v. 106, n. 1, set. 1995.

ONIMARU, H.; HOMMA, I. A Novel Functional Neuron Group for Respiratory Rhythm Generation in the Ventral Medulla. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 4, p. 1478–1486, 15 fev. 2003.

ONIMARU, H.; IKEDA, K.; KAWAKAMI, K. CO₂-Sensitive Preinspiratory Neurons of the Parafacial Respiratory Group Express Phox2b in the Neonatal Rat. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 48, p. 12845–12850, 26 nov. 2008.

ONIMARU, H.; KUMAGAWA, Y.; HOMMA, I. Respiration-Related Rhythmic Activity in the Rostral Medulla of Newborn Rats. **Journal of Neurophysiology**, v. 96, n. 1, p. 55–61, jul. 2006.

PACE, R. W. et al. Inspiratory bursts in the preBötzinger complex depend on a calcium-activated non-specific cation current linked to glutamate receptors in neonatal mice. **The Journal of Physiology**, v. 582, n. 1, p. 113–125, jul. 2007.

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.

PATEL, A. J.; HONORÉ, E. Properties and modulation of mammalian 2P domain K⁺ channels. **Trends in Neurosciences**, v. 24, n. 6, p. 339–346, jun. 2001.

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.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. [s.l.] Elsevier, 2006.

PEREZ-REYES, E. Molecular Physiology of Low-Voltage-Activated T-type Calcium Channels. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 1, p. 117–161, 1 jan. 2003.

PIAN, P. et al. Modulation of cyclic nucleotide-regulated HCN channels by PIP₂ and receptors coupled to phospholipase C. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 455, n. 1, p. 125–145, 12 set. 2007.

PIRES DA SILVA, M. et al. Nitric Oxide Modulates HCN Channels in Magnocellular Neurons of the Supraoptic Nucleus of Rats by an S-Nitrosylation-Dependent Mechanism. **The Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 44, p. 11320–11330, 2 nov. 2016.

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 Pneumotoxic 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.

REKLING, J. C.; FELDMAN, J. L. Calcium-Dependent Plateau Potentials in Rostral Ambiguous Neurons in the Newborn Mouse Brain Stem In Vitro. **Journal of Neurophysiology**, v. 78, n. 5, p. 2483–2492, 1 nov. 1997.

RICHTER, D. W. et al. Calcium currents and calcium-dependent potassium currents in mammalian medullary respiratory neurones. **The Journal of Physiology**, v. 470, n. 1, p. 23–33, 1 out. 1993.

RICHTER, D. W. et al. Voltage-clamp analysis of neurons within deep layers of the brain. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 67, n. 2, p. 121–131, 1996.

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

ROSS, C. et al. 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. **The Journal of Neuroscience**, v. 4, n. 2, p. 474–494, 1 fev. 1984.

SCHREIHOFFER, A. M.; GUYENET, P. G. Identification of C1 presympathetic neurons in rat rostral ventrolateral medulla by juxtacellular labeling in vivo. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 387, n. 4, p. 524–536, 3 nov. 1997.

SHI, Y. et al. Nalcx Is a “Leak” Sodium Channel That Regulates Excitability of Brainstem Chemosensory Neurons and Breathing. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 31, p. 8174–8187, 3 ago. 2016.

SHI, Y. et al. Neuromedin B Expression Defines the Mouse Retrotrapezoid Nucleus. **The Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 48, p. 11744–11757, 29 nov. 2017.

SIMMS, A. E. et al. Amplified respiratory-sympathetic coupling in the spontaneously hypertensive rat: does it contribute to hypertension? **The Journal of Physiology**, v. 587, n. 3, p. 597–610, 1 fev. 2009.

SIMMS, A. E. et al. Is augmented central respiratory–sympathetic coupling involved in the generation of hypertension? **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 174, n. 1–2, p. 89–97, nov. 2010.

SMITH, J. et al. Pre-Bötzinger 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. Respiratory rhythm and pattern generation: Brainstem cellular and circuit mechanisms. In: [s.l.: s.n.]. p. 1–35.

SOLOMON, I. C.; EDELMAN, N. H.; O’NEAL, M. H. CO₂/H⁺ chemoreception in the cat pre-Bötzinger complex in vivo. **Journal of Applied Physiology**, v. 88, n. 6, p. 1996–2007, 1 jun. 2000.

SOUZA, G. M. P. R. et al. Differential Contribution of the Retrotrapezoid Nucleus and C1 Neurons to Active Expiration and Arousal in Rats. **The Journal of Neuroscience**, v. 40, n. 45, p. 8683–8697, 4 nov. 2020.

ST.-JOHN, W. M. et al. Location and properties of respiratory neurones with putative intrinsic bursting properties in the rat in situ. **The Journal of Physiology**, v. 587, n. 13, p. 3175–3188, 1 jul. 2009.

STORNETTA, R. L. et al. Vesicular glutamate transporter VNPI/VGLUT2 is expressed by both C1 adrenergic and nonaminergic presympathetic vasomotor neurons of the rat medulla. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 444, n. 3, p. 207–220, 12 mar. 2002.

STORNETTA, R. L. et al. Expression of Phox2b by Brainstem Neurons Involved in Chemosensory Integration in the Adult Rat. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 40,

p. 10305–10314, 4 out. 2006.

SUN, Q. J.; BERKOWITZ, R. G.; PILOWSKY, P. M. GABAA mediated inhibition and post-inspiratory pattern of laryngeal constrictor motoneurons in rat. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 162, n. 1, p. 41–47, 2008.

TAKAKURA, A. C.; MALHEIROS-LIMA, M. R.; MOREIRA, T. S. Excitatory and inhibitory modulation of parafacial respiratory neurons in the control of active expiration. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 289, p. 103657, jul. 2021.

TALLEY, E. M. et al. TASK-1, a Two-Pore Domain K⁺ Channel, Is Modulated by Multiple Neurotransmitters in Motoneurons. **Neuron**, v. 25, n. 2, p. 399–410, fev. 2000.

TEGNÉR, J. et al. Low-Voltage-Activated Calcium Channels in the Lamprey Locomotor Network: Simulation and Experiment. **Journal of Neurophysiology**, v. 77, n. 4, p. 1795–1812, 1 abr. 1997.

THOBY-BRISSON, M. et al. Genetic identification of an embryonic parafacial oscillator coupling to the preBötzinger complex. **Nature Neuroscience**, v. 12, n. 8, p. 1028–1035, 5 ago. 2009.

TONEY, G. M. et al. Does enhanced respiratory–sympathetic coupling contribute to peripheral neural mechanisms of angiotensin II–salt hypertension? **Experimental Physiology**, v. 95, n. 5, p. 587–594, 13 maio 2010.

TRAUBE, L. Über periodische Tätigkeitausserungen der vasomotorischen und Hemmungs-Nervenzentrums. **Cbl Med Wiss**, v. 56, p. 881–885, 1865.

WANG, S. et al. TASK-2 Channels Contribute to pH Sensitivity of Retrotrapezoid Nucleus Chemoreceptor Neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 41, p. 16033–16044, 9 out. 2013.

WASHBURN, C. P. et al. Serotonergic Raphe Neurons Express TASK Channel Transcripts and a TASK-Like pH- and Halothane-Sensitive K⁺ Conductance. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 4, p. 1256–1265, 15 fev. 2002.

WASHBURN, C. P.; BAYLISS, D. A.; GUYENET, P. G. Cardiorespiratory neurons of the rat ventrolateral medulla contain TASK-1 and TASK-3 channel mRNA. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 138, n. 1, p. 19–35, out. 2003.

WITTMEIER, S. et al. Pacemakers handshake synchronization mechanism of mammalian respiratory rhythmogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 46, p. 18000–18005, 18 nov. 2008.

YANG, C. F. et al. Monosynaptic Projections to Excitatory and Inhibitory preBötzinger Complex Neurons. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 14, 4 set. 2020.

YANG, C. F.; FELDMAN, J. L. Efferent projections of excitatory and inhibitory preBötzinger Complex neurons. **Journal of Comparative Neurology**, v. 526, n. 8, p. 1389–1402, 1 jun. 2018.

YEH, S.-Y. et al. Respiratory Network Stability and Modulatory Response to Substance P Require Nalcn. **Neuron**, v. 94, n. 2, p. 294- 303.e4, abr. 2017.

ZOCCAL, D. B. et al. Increased sympathetic outflow in juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia correlates with enhanced expiratory activity. **Journal of Physiology**, v. 586, n. 13, p. 3253–3265, 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. Artigo publicado na revista *Experimental Physiology* (2019)

Received: 9 September 2019 | Accepted: 23 October 2019

DOI: 10.1113/EP088164

EP Experimental Physiology WILEY

RESEARCH PAPER

A6 neurons simultaneously modulate active expiration and upper airway resistance in ratsKarolyne S. Magalhães¹ | Alan A. de Britto¹ | Julian F. R. Paton² |Davi J. A. Moraes¹ ¹School of Medicine of Ribeirão Preto, Department of Physiology, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil²Cardiovascular Autonomic Research Cluster, Department of Physiology, Faculty of Medical and Health Sciences, University of Auckland, Auckland, New Zealand

Correspondence

Davi J. A. Moraes, Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil.
Email: davimoraes@fmrp.usp.br

Funding information

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 and Undergraduate Fellowship to A.A.B. 2016/24994-3). J.F.R.P. is funded by the British Heart Foundation (RG/12/6/29670).

Edited by: Ken O'Halloran

Linked articles: This article is highlighted in a Viewpoint article by O'Halloran. To read this paper, visit <https://doi.org/10.1113/EP088283>.

Abstract

During rest, inspiration is an active phenomenon, whereas expiration is passive. Under conditions of high chemical drive, such as hypercapnia/acidosis, there is an increase in inspiratory activity, expiration becomes active and upper airway resistance is reduced. The locus coeruleus noradrenergic neurons (A6 neurons) are activated when exposed to elevated CO₂/[H⁺] levels and modulate respiratory brainstem neurons regulating ventilation. However, the role of A6 neurons in the control of upper airway resistance is not fully understood. We tested the hypothesis that A6 neurons contribute to the central generation of active inspiratory and expiratory responses and the associated changes in the motor nerves controlling upper airway resistance during hypercapnia/acidosis in rats. Using a perfused brainstem–spinal cord preparation, we inhibited A6 neurons using pharmacogenetics and evaluated the active expiratory (abdominal nerve), laryngeal (cervical vagus nerve), oropharyngeal (hypoglossal nerve) and inspiratory (phrenic nerve) motor nerve responses to hypercapnia/acidosis. Acute inhibition of A6 neurons did not produce significant changes in the respiratory pattern in normocapnia. However, the hypercapnia/acidosis-induced active expiratory response and the associated changes in the motor nerves responsible for control of oropharyngeal and laryngeal resistance, as well as the inspiratory response were all reduced after inhibition of A6 neurons. Our data demonstrate that A6 neurons exert an important excitatory synaptic drive to the central generation of both active inspiratory and expiratory activities and modulate the control of upper airway resistance during hypercapnia/acidosis.

KEYWORDS

A6 neurons, hypercapnia/acidosis, pharmacogenetic, respiratory pattern, upper airway resistance

1 | INTRODUCTION

During rest, breathing is characterized by three phases: inspiration, post-inspiration (post-I) and expiration (E2) (Richter, 1982). The pre-Bötzinger complex (pre-BötC), a ventral medullary region, contains inspiratory neurons with intrinsic rhythmogenic properties responsible for generating a respiratory rhythm (Paton, Abdala, Koizumi, Smith, & St-John, 2006; Richter & Smith, 2014; Smith, Ellenberger, Ballanyi, Richter, & Feldman, 1991). Evidence suggests that the pontine respiratory group, pulmonary mechanoreceptors and a bulbar conditional oscillator called the 'post-inspiratory complex' participate in the generation of the post-inspiratory phase (Anderson et al., 2016; Dutschmann & Dick, 2012; Poon & Song, 2014). Usually,

abdominal expiratory muscles are recruited when a high level of active expiration is required, such as when the central chemoreceptors are activated (hypercapnia/acidosis – high chemical drive) (Huckstepp, Cardoza, Henderson, & Feldman, 2015; Moraes, Dias, Cavalcanti-Kwiatkoski, Machado, & Zoccal, 2012). This abdominal phasic expiratory activity seems to operate under the control of a specialized network called the expiratory oscillator, which is distinct from the inspiratory network (Abdala, Rybak, Smith, & Paton, 2009; Huckstepp et al., 2015; Molkov et al., 2011). The essential components of this expiratory oscillator appear to reside on the ventral surface of the medulla, near the facial motor nucleus, in a region that partially overlaps the retrotrapezoid nucleus (RTN) (Huckstepp et al., 2015). This region is called the parafacial respiratory group (pFRG) (Abdala

© 2019 The Authors. *Experimental Physiology* © 2019 The Physiological Society*Experimental Physiology*, 2020;105:53–64.

wileyonlinelibrary.com/journal/eph | 53

et al., 2009; Huckstepp et al., 2015; Pagliardini et al., 2011). Recent results suggest that this region contains neurons with expiratory rhythmic activity under high chemical drive, called late-expiratory (late-E), which induce active expiration through motoneurons located in the thoraco-lumbar segments of the spinal cord (de Britto & Moraes, 2017; Pisanski & Pagliardini, 2018).

Hypercapnia/acidosis produces disinhibition of pFRG late-E neurons to generate active expiration and concomitant cranial motor respiratory responses controlling upper airway resistance in rats (de Britto & Moraes, 2017). In other words, simultaneous with active expiration there is an increase in the efferent activity of the hypoglossal nerve (HN) and superior laryngeal nerve (SLN; a branch of the cervical vagus nerve (cVN)) (Abdala et al., 2009). This suggests that the activity of these three expiratory motor nerves originates from the same oscillator, the pFRG (Molkov et al., 2010). The possible functional implication is that the resistance of the upper airway is reduced during active expiration. Despite these recent studies, the cellular mechanisms and the brainstem neural pathways involved in the interaction between the central generation of active expiration and changes in the upper airway resistance under high chemical drive are not fully understood.

Locus coeruleus (LC) neurons are intrinsically sensitive to $\text{CO}_2/[\text{H}^+]$ (Gargaglioni, Hartzler, & Putnam, 2010; Coates, Li, & Nattie, 1993; Magalhães et al., 2018; Oyamada, Ballantyne, Mückenhoff, & Scheid, 1998). This dorsal pontine region contains the highest concentration of noradrenergic (NE) neurons in the central nervous system (A6 neurons) (Berridge & Waterhouse, 2003) and is known to participate in the control of various homeostatic functions, such as wakefulness, daily memory consolidation, nociception, cardiovascular control (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) and the chemosensory control of breathing (Gargaglioni et al., 2010; Pineda & Aghajanian, 1997; Putnam, Filosa, & Ritucci, 2004). Focal acidosis of the LC increases respiratory frequency and inspiratory activity (Coates et al., 1993). Selective elimination of A6 neurons with 6-hydroxydopamine resulted in a 64% reduction in the ventilatory response to hypercapnia/acidosis in conscious rats, but did not affect breathing under resting conditions (Biancardi, Bicego, Almeida, & Gargaglioni, 2008; Biancardi, da Silva, Bicego, & Gargaglioni, 2010). Recently, we demonstrated that acute and reversible inhibition of A6 neurons, using selective viral transfection and pharmacogenetics, significantly reduced the magnitude and incidence of active expiration and the frequency and amplitude of inspiration evoked by hypercapnia/acidosis in conscious rats (Magalhães et al., 2018). However, the contribution of these neurons to the control of upper airway resistance during hypercapnia/acidosis has not been demonstrated.

Herein, we tested the hypothesis that A6 neurons contribute to the central generation of active expiration and the simultaneous and associated changes in upper airway resistance in rats under hypercapnia/acidosis. Using *in situ* preparations of rats, we inhibited A6 neurons, using the insect peptide allatostatin (Alst) following A6 neuron selective transfection to express the *Drosophila* Alst receptor

New Findings

- **What is the central question of this study?**
Do A6 neurons modulate active expiratory and airway responses evoked by hypercapnia/acidosis?
- **What is the main finding and its importance?**
Acute inhibition of A6 neurons reduced active expiratory, inspiratory and the associated oropharyngeal and laryngeal motor responses to hypercapnia/acidosis. A6 neurons provide excitatory synaptic drive contributing to the central generation of inspiratory and expiratory motor activity as well as the control of upper airway resistance.

(AlstR), and evaluated simultaneously the changes in the expiratory (abdominal, AbN), laryngeal (cVN), oropharyngeal (HN) and inspiratory (phrenic) motor nerve responses to hypercapnia/acidosis.

2 | METHODS

2.1 | Animals

The experiments were approved by the Institutional Ethics Committee for Animal Experimentation of the School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (no. 1/2016-1 and 3/2019). We used male Wistar rats (50–55 g) from the Animal Care Facility of the Campus of Ribeirão Preto at the University of São Paulo. The animals were housed with a 12h light–dark cycle at a constant temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) with *ad libitum* access to standard rat chow and water.

2.2 | Neural transfection using viral vectors

The catecholaminergic neurons of the brainstem express the transcription factor Phox2 and can be selectively transfected using viral vectors to express a gene of interest under the control of an artificial promoter – PRSx8 (Teschemacher, Wang, Raizada, Paton, & Kasparov, 2008). The lentiviral vector (LVV) used was derived from HIV-1 and pseudotyped with the VSV-G envelope (Coleman et al., 2003). The plasmids pTYF-PRSx8-AlstR-IRES2-GFP and pTYF-PRSx8-IRES2-GFP were cloned into LVV. The titre of PRSx8-AlstR-GFP-LVV and the control virus (PRSx8-GFP-LVV) were between 1×10^9 and 1×10^{10} pfu. Viral concentration and titration were performed as described in detail previously (Coleman et al., 2003).

2.3 | *In vivo* gene transfer

Forty rats were anaesthetized with ketamine (75 mg kg^{-1} i.p., Agener Union, Brazil)–xylazine (5 mg kg^{-1} i.p., Vetbrands, Brazil) mixture. The depth of anaesthesia was verified intermittently using a noxious pinch to the tail to ensure lack of a withdrawal reflex. Using a stereotaxic

apparatus (David Kopf, Tujunga, CA, USA), two microinjections (dorso-ventral levels separated by 1 mm) per side of PRSx8-AlstR-GFP-LVV or PRSx8-GFP-LVV (50 nl each for 5 min) were administered bilaterally into LC (Picospritzer II; Parker Instruments, Hollis, NH, USA) in 30 rats. Injections were made \sim 10 mm from the Bregma, \pm 1.7 mm lateral to the midline and 4.5–5.5 mm ventral to the surface of the brain. After the surgery, the rats were treated with a prophylactic dose of the analgesic and antipyretic flunixin meglumine (1 mg kg⁻¹; Schering-Plough, Santé Animale, Segré, France) and 0.1 ml of a veterinary antibiotic (1.2 million IU, Zoetis Indústria de Produtos Veterinários, Campinas, SP, Brazil) i.m.

2.4 | *In situ* preparation of rats

2.4.1 | Perfusion solution

The perfusion solution was composed of (in mM): 125 NaCl, 25 NaHCO₃, 3 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.25 MgSO₄, 1.25 KH₂PO₄ and 10 glucose, diluted in deionized water. Other substances were added to the perfusate, such as an oncotic agent (polyethylene glycol, M_r 16,000–24,000, 1.25%, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), a neuromuscular transmission blocker (vecuronium bromide – 4 µg ml⁻¹, Cristália, Itapira, SP, Brazil) and vasopressin (4 µM; Sigma-Aldrich). AlstR activation was performed by the addition of Alst (1 µM; Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Burlingame, CA, USA) to the perfusion solution (Marina et al., 2011; Moraes, Bonagamba, da Silva, Paton, & Machado, 2017).

2.4.2 | Surgical procedure

Initially, animals were deeply anaesthetized using halothane (100%; Cristália) until withdrawal reflexes to noxious pinching of the paw and the tail were absent, and breathing was suppressed. They were then sectioned sub-diaphragmatically. After exsanguination, the animals had their head and thorax submerged in cooled perfusion solution (4°C), followed by decerebration at the precollicular level, rendering the preparation insentient. After these procedures, the preparation was transferred to a recording chamber, and the descending aorta cannulated and perfused retrogradely using a peristaltic pump (Watson-Marlow 5025, Falmouth, UK) at a flow of 21–25 ml min⁻¹. The perfusate was continuously aerated with a carbogenic mixture of 95% O₂ and 5% CO₂, filtered with a nylon mesh (pore size: 22 µm, Millipore, Billerica, MA, USA) and heated at approximately 31°C, as previously described (Paton, 1996). Twenty-five rats were successfully tested in the *in situ* preparation.

2.4.3 | Recording and acquisition of respiratory nerves activity

All motor nerve recordings were obtained using bipolar suction glass electrodes connected to micromanipulators (YOU-1; Narishige, Setagaya, Japan) and signals amplified (amplifier 1700, A-M Systems, Sequim, WA, USA). The HN and cVN were dissected at the cervical level, sectioned and their efferent activities recorded. The AbN was isolated from the retro-abdominal muscles at the thoracic (T12) level, distally sectioned and its activity recorded, whereas the central

phrenic nerve (PN) activity was recorded on the left side. Respiratory motor nerves were recorded in absolute units (µV).

All signals were filtered (0.3–5 kHz) and acquired at 5 kHz sampling frequency using an analog/digital converter (CED 1401; Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) and data stored on a computer using Spike2 software (Cambridge Electronic Design). The analyses were performed on rectified and integrated signals (time constant of 50 ms), using Spike2 software, in the different phases of the respiratory cycle (de Britto & Moraes, 2017). The basal PN activity was evaluated by its frequency (f_R) and duration (duration of inspiration; DI). The intervals between PN activities were considered as the duration of expiration (DE). The duration of the pre-inspiratory component (pre-I) of the cVN and HN was analysed by its relation to the beginning of PN activity. The duration of post-inspiratory activity recorded from the cVN was also quantified. Changes in inspiratory amplitudes of PN and HN were expressed as percentages relative to baseline values. Active expiration was determined when AbN activity at the end of expiration was higher than AbN post-inspiratory activity.

2.4.4 | Hypercapnia/acidosis

Using a gas mixer (Gas Mixer 4000, Columbus Instruments, Columbus, OH, USA), the proportion of gases in the perfusate was changed to increase CO₂ (10% CO₂–90% O₂) and to reduce pH (7.1).

2.5 | Histology and immunofluorescence

At the end of experiments, the brainstems were removed and fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) for 24 h. The brainstems were then transferred to 30% sucrose solution. Coronal sections (50 µm thick) were performed throughout the LC. The sections were blocked and permeabilized in phosphate-buffered saline (PBS; 0.1 M) containing 5% fetal bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) and 0.1% of Triton X-100 for 1 h at room temperature. The sections were then incubated in primary mouse anti-tyrosine hydroxylase (TH; 1:1000; Millipore) and chicken anti-green fluorescent protein (GFP) (1:500; Abcam, Cambridge, MA, USA) for 24 h at 4°C. After PBS washes, the sections were incubated in secondary antibodies: Alexa 647 goat anti-mouse (1:500; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and Alexa 488 goat anti-chicken (1:500; Thermo Fisher Scientific) for 4 h at room temperature. After PBS washes, the sections were mounted on Fluoromount (Sigma-Aldrich). The images were captured on a Leica TCS SP5 (Buffalo Grove, IL, USA) confocal microscope equipped with 488 and 633 nm lasers and tunable emission wavelength detection. The quantification of NE neurons, expressing the AlstR–GFP construct, was performed over the entire length of the LC of each rat (from 9.20 to 10.50 mm caudal to the bregma) using a data analysis system (ImageJ software, NIH, Bethesda, MA, USA). A6 neuronal transfection was observed in 22 rats.

2.6 | Statistical analyses

The results are presented as means \pm SD. Student's paired *t* test was used for direct comparisons of the respiratory pattern before and after

Alst during normocapnia. Two-way ANOVA followed by the Bonferroni *post hoc* test was used to compare the respiratory pattern during normocapnia and hypercapnia/acidosis before and after Alst (Prism; GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). The level of significance was set at $P < 0.05$.

3 | RESULTS

3.1 | Transduction efficacy of A6 neurons

Stereotactic injections of PRSx8-AlstR-GFP-LVV bilaterally into LC produced expression of the AlstR-GFP construct revealed by immunofluorescence (Figure 1). Transfected neurons showed membrane-bound fluorescence, as expected and characteristic for the receptor-fluorophore construct (AlstR-GFP). Expression was limited to A6 neurons based on immunofluorescence for TH. The AlstR-GFP construct was expressed in $88 \pm 1.44\%$ of NE neurons throughout the LC, demonstrating the high specificity of viral transfection of these neurons.

3.2 | Inhibition of A6 neurons does not affect respiratory pattern under baseline conditions (normocapnia)

Initially, we investigated whether the acute and selective inhibition of A6 neurons induces changes in the respiratory pattern at baseline conditions ($n = 6$). Figure 2a shows raw and integrated records of the AbN, cVN, HN and PN activities of an *in situ* preparation of rat, transfected bilaterally with PRSx8-AlstR-GFP-LVV in the LC, before and after acute inhibition of the A6 neurons using Alst. Alst did not change the f_R (0.33 ± 0.03 vs. 0.33 ± 0.02 Hz), DE (3.49 ± 0.13 vs. 3.44 ± 0.15 s) and DI (1.25 ± 0.08 vs. 1.26 ± 0.11 s). In addition, Alst did not affect the HN (0.20 ± 0.01 vs. 0.20 ± 0.01 s) and cVN (0.19 ± 0.01 vs. 0.18 ± 0.01 s) pre-I activity, as well as the duration of post-inspiratory cVN activity (2.99 ± 0.09 vs. 3.04 ± 0.08 ; Figure 2a,bi,bii). These data demonstrate that A6 neurons are not involved in the central generation of the three-phase respiratory pattern in *in situ* preparations of rats during baseline conditions.

3.3 | Inhibition of A6 neurons affects the responses of cranial and spinal motor nerves to hypercapnia/acidosis

During hypercapnia/acidosis (10 min, 10% CO₂; $n = 6$), AbN amplitude (active expiration) increased during the end of E2 (late-E event; Figure 3a,bi). In addition, an increase in the cVN pre-I duration was observed (0.37 ± 0.03 vs. 0.21 ± 0.03 s; $P < 0.0001$; Figure 3a,bi). Hypercapnia/acidosis also increased PN amplitude ($123.6 \pm 4.77\%$) and DE (4.06 ± 0.15 vs. 3.35 ± 0.18 s; $P < 0.0001$), but reduced DI (0.58 ± 0.06 vs. 1.2 ± 0.08 s; $P < 0.0001$) and the duration of cVN post-inspiratory activity (2.64 ± 0.06 vs. 3.07 ± 0.09 ; $P < 0.0001$), without affecting the f_R (0.34 ± 0.02 vs. 0.33 ± 0.04 s; Figure 3a,bi). After 10 min of hypercapnia/acidosis, the animals were exposed

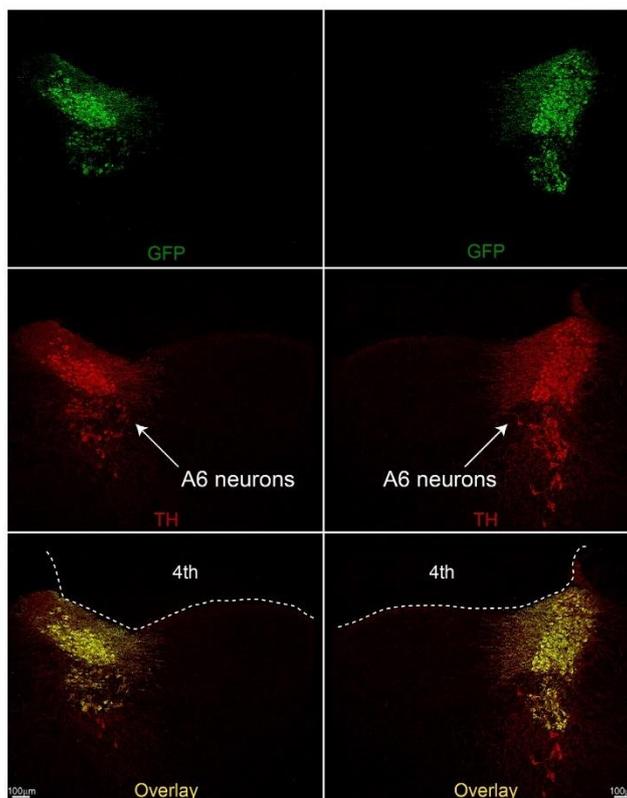
to normocapnia. Alst was then added to the perfusate for acute inhibition of A6 neurons. Ten minutes later, the preparations were again exposed to hypercapnia/acidosis for an additional 10 min. With A6 neuron excitability depressed, we observed reductions in both the amplitude (8.07 ± 0.33 vs. 11.9 ± 0.71 μ V; $P < 0.0001$) and the incidence of the late-E recorded from the AbN (active expiration; Figure 3a,bi,bii). We also observed a reduction in the PN inspiratory (amplitude, 107.33 ± 3.1 vs. $123.6 \pm 4.77\%$; $P < 0.0001$), and the cVN post-inspiratory duration (2.12 ± 0.05 vs. 2.64 ± 0.06 ; $P < 0.0001$) in response to hypercapnia/acidosis after administration of Alst (Figure 3a,bi,bii).

As the incidence of AbN late-E event decreased after the inhibition of A6 neurons during hypercapnia/acidosis, we analysed the changes in the respiratory pattern during the presence and absence of active expiration. We observed that during the presence of active expiration after Alst, the DI (0.57 ± 0.06 vs. 0.58 ± 0.06 s), DE (4.06 ± 0.21 vs. 4.06 ± 0.15 s) and cVN pre-I duration (0.38 ± 0.02 vs. 0.37 ± 0.03 s) were not different from those during hypercapnia/acidosis without Alst (Figures 3a,bi,bii and 4a,b). On the other hand, in the absence of active expiration after Alst, the DI increased (1.17 ± 0.09 vs. 0.58 ± 0.06 ; $P < 0.0001$) and the DE (3.5 ± 0.22 vs. 4.06 ± 0.15 s; $P = 0.003$) and cVN pre-I duration (0.21 ± 0.02 vs. 0.37 ± 0.03 s; $P < 0.0001$; Figures 3a,bi,bii and 4c,d) were reduced significantly; these values were not different from those obtained during baseline conditions (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).

In another group of animals ($n = 7$), we investigated the effects of acute inhibition of A6 neurons during existent hypercapnia/acidosis (10 min, 10% CO₂). As described in the previous section, hypercapnia/acidosis also increased the amplitude of AbN (active expiration - late-E event), at the end of E2 (Figure 5a,bi). In addition, increases in cVN (0.39 ± 0.02 vs. 0.24 ± 0.02 s; $P < 0.0001$) and HN (0.39 ± 0.01 vs. 0.21 ± 0.04 s; $P < 0.0001$) pre-I durations were observed. Hypercapnia/acidosis also increased both PN ($125.7 \pm 3.2\%$) and HN ($155 \pm 4.21\%$) amplitudes and DE (4.04 ± 0.11 vs. 3.31 ± 0.13 s; $P < 0.0001$), but reduced DI (0.56 ± 0.04 vs. 1.3 ± 0.09 s; $P < 0.0001$) and cVN post-inspiratory duration (2.6 ± 0.03 vs. 3 ± 0.08 ; $P < 0.0001$), without affecting f_R (0.36 ± 0.04 vs. 0.33 ± 0.07 s; Figure 5a,bi). Alst reduced both AbN amplitude (7.02 ± 0.46 vs. 11.71 ± 0.96 μ V; $P < 0.0001$) and late-E event incidence, as well as PN (110 ± 2.45 vs. $125.7 \pm 3.2\%$; $P < 0.0001$) and HN (119 ± 3.9 vs. $155 \pm 4.21\%$; $P < 0.0001$) inspiratory responses and cVN post-inspiratory duration (2.09 ± 0.06 vs. 2.6 ± 0.03 ; $P < 0.0001$; Figure 5a,bi,bii).

The analyses of the respiratory pattern during hypercapnia/acidosis in the presence of active expiration (late-E event) after Alst revealed that DI (0.56 ± 0.04 vs. 0.56 ± 0.04 s), DE (4.06 ± 0.11 vs. 4.04 ± 0.11 s), as well as cVN (0.38 ± 0.02 vs. 0.39 ± 0.02 s) and HN (0.39 ± 0.02 vs. 0.39 ± 0.01 s) pre-I durations were not different from those values observed before Alst during hypercapnia/acidosis (Figures 5a,bi,bii and 6a,b,c). On the other hand, in the absence of active expiration after Alst during hypercapnia/acidosis, we observed increases in DI (1.18 ± 0.04 vs. 0.56 ± 0.04 s; $P < 0.0001$) and reductions in DE (3.65 ± 0.18 vs. 4.04 ± 0.11 s, $P = 0.001$), as well as in the cVN

FIGURE 1 Selective expression of AlstR on A6 neurons. Bilateral injection of PRSx8-AlstR-GFP-LVV into LC induced selective expression of AlstR-GFP construct (green) in the soma and neuronal processes of the TH-positive A6 neurons (red). 4th, fourth ventricle



(0.21 ± 0.03 vs. 0.39 ± 0.02 s; $P = 0.0002$) and HN (0.22 ± 0.03 vs. 0.39 ± 0.01 s; $P < 0.0001$; Figures 5a,bi,bii and 6d,e,f) pre-I durations, which were not different from those during baseline conditions (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).

3.4 | Absence of changes in the respiratory pattern in response to Alst during hypercapnia/acidosis in rats transfected with the control virus

To confirm the effects of acute inhibition of A6 neurons, we also added Alst to the perfusate of the *in situ* preparations of rats transfected with the control virus (PRSx8-GFP-LVV), which did not induce the expression of AlstR, during hypercapnia/acidosis ($n = 3$). Hypercapnia/acidosis induced changes in AbN, cVN, HN and PN activity, with presence of late-E events in the AbN and the enhancement of the duration of pre-I activities in the cVN and HN (Figure 7a,bi), as described in those rats expressing the AlstR. However, Alst did not affect the pattern of the recorded respiratory nerves (f_R : 0.32 ± 0.01 vs. 0.32 ± 0.01 Hz; DE: 4 ± 0.21 vs. 3.99 ± 0.11 s; DI: 0.55 ± 0.05 vs.

0.58 ± 0.03 s; HN pre-I duration: 0.4 ± 0.02 vs. 0.4 ± 0.01 s; cVN pre-I duration: 0.41 ± 0.01 vs. 0.41 ± 0.02 s; Figure 7a,bi,bii) during hypercapnia/acidosis. These data suggest that the observed effects of the Alst in rats transfected with PRSx8-AlstR-GFP-LVV during hypercapnia/acidosis were caused by the activation of AlstR and consequent inhibition of A6 neurons.

4 | DISCUSSION

The present study demonstrated that acute and selective inhibition of A6 neurons reduced the AbN active expiration and the simultaneous changes in the motor nerves controlling the upper airway resistance (oropharynx and larynx) evoked by hypercapnia/acidosis in rats. We also observed that the inhibition of A6 neurons reduced the inspiratory responses of the PN and HN during hypercapnia/acidosis. Therefore, A6 neurons play an important excitatory role in the central generation of inspiration, active expiration and simultaneous changes in motor control of upper airway resistance evoked by hypercapnia/acidosis.

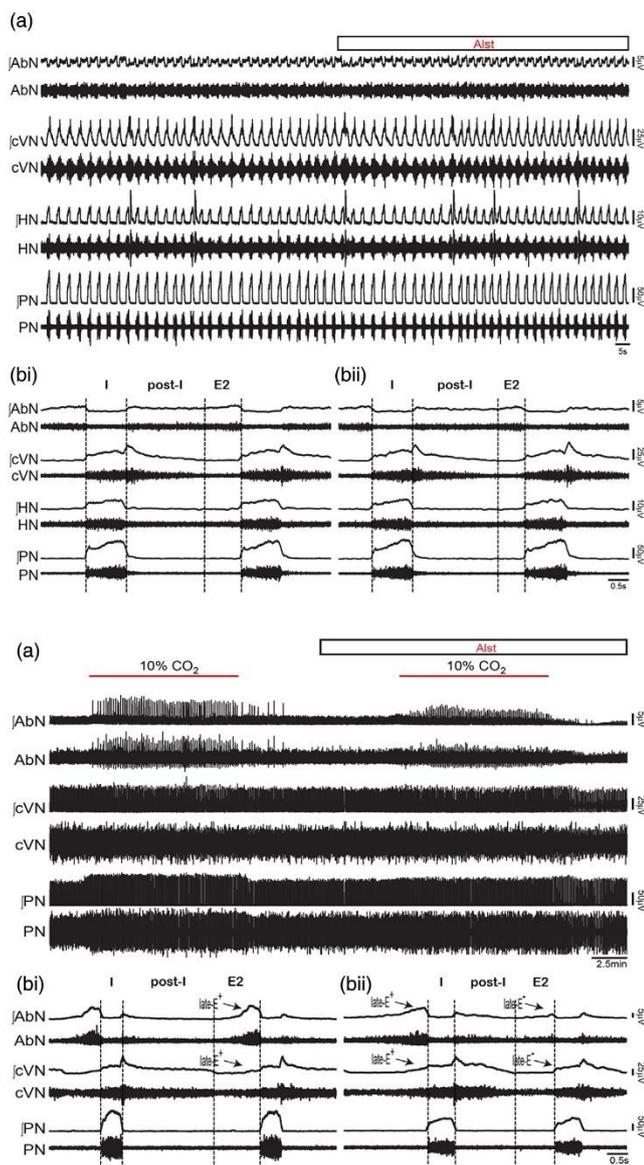


FIGURE 2 Inhibition of A6 neurons does not affect respiratory pattern under baseline conditions. (a) Integrated (I) and raw records of AbN, cVN, HN and PN activities of an *in situ* preparation of rat, bilaterally transfected with PRSx8-AlstR-GFP-LVV in the LC, before and after application of Alst to the perfusate during baseline condition. (b) Magnification of two respiratory cycles from the same *in situ* preparation of rat before (bi) and after (bii) A6 neuron inhibition. Note the absence of changes in respiratory nerve activity after inhibition of the A6 neurons. E2, second half of expiration; I, inspiration; post-I, post-inspiration

FIGURE 3 Inhibition of A6 neurons during baseline conditions affects the respiratory motor responses to hypercapnia/acidosis. (a) Integrated (I) and raw records of AbN, cVN and PN activity of an *in situ* preparation of rat, bilaterally transfected with PRSx8-AlstR-GFP-LVV in the LC, before and after application of Alst to the perfusate. The animal was first submitted to hypercapnia/acidosis for 10 min. During normocapnia, Alst was added to the perfusate. Ten minutes after the inhibition of A6 neurons, the rat was exposed again to hypercapnia/acidosis. (b) Magnification of two respiratory cycles from the same *in situ* preparation of rat before (bi) and after (bii) inhibition of A6 neurons. Note the incidence of late-E events in AbN and cVN preceding the onset of PN activity in all respiratory cycles, during exposure to the first hypercapnia/acidosis. After inhibition of LC neurons, we observed a reduction in the incidence of the late-E event in AbN (active expiration) and cVN, as well as its amplitude. E2, second half of expiration; I, inspiration; post-I, post-inspiration

The acute neuronal inhibition using Alst was previously reported in transfected animals expressing AlstR (Lechner, Lein, & Callaway, 2002; Magalhães et al., 2018; Moraes et al., 2017). *Drosophila* AlstR, whose activation allows reversible neuronal inhibition over a short period of time, is a G-coupled protein receptor that causes activation of inwardly rectifying potassium channels, silencing neuronal activity

(Birgöl, Weise, Kreienkamp, & Richter, 1999). This receptor is activated by Alst peptide, but cannot be activated by mammalian endogenous ligands (Birgöl et al., 1999). In the present study, we confirmed the expression of the AlstR-GFP construct in almost 90% of the A6 neurons, suggesting that Alst effectively inhibited a significant proportion of the LC NE neurons. In addition, Alst did not affect the

FIGURE 4 Grouped data of the effect of inhibition of A6 neurons during baseline conditions on the respiratory motor responses to hypercapnia/acidosis. Grouped data showing the DI, DE and cVN pre-I duration in the presence (a,b) and absence (c,d) of the AbN active expiration (Late-E event) in response to hypercapnia/acidosis before and after inhibition of A6 neurons

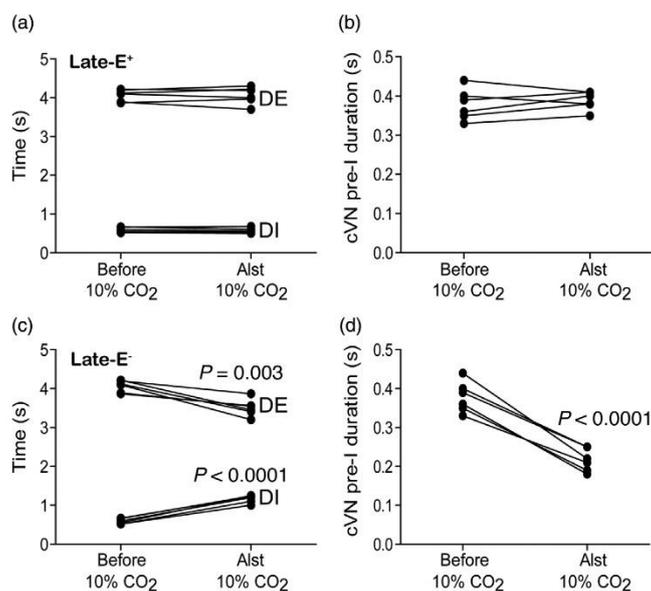
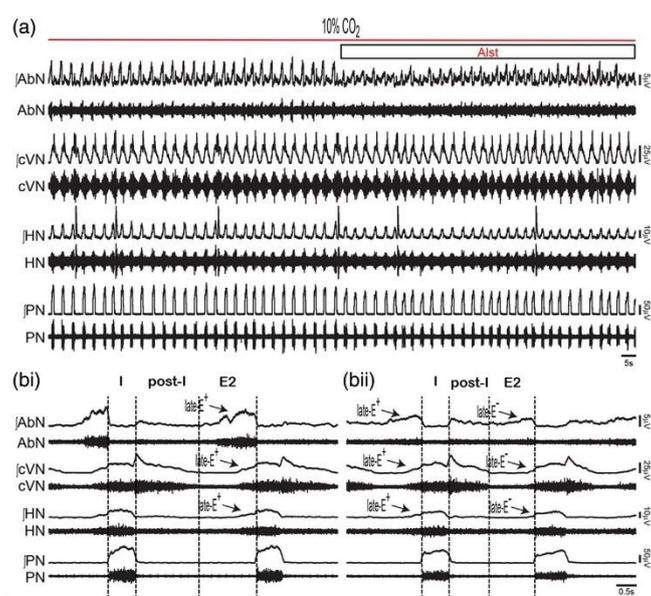


FIGURE 5 Effects of inhibition of A6 neurons during hypercapnia/acidosis on respiratory motor responses. (a) Integrated (I) and raw records of AbN, cVN, HN and PN activities of an *in situ* preparation of rat, bilaterally transfected with PRSx8-AlstR-GFP-LVV in the LC neurons, before and after the application of Alst during hypercapnia/acidosis. (b) Magnification of two respiratory cycles from the same *in situ* preparation of rat before (bi) and after (bii) inhibition of A6 neurons during hypercapnia/acidosis. Note the incidence of the late-E event in the AbN, cVN and HN, preceding the beginning of PN activity, in all respiratory cycles. After inhibition of LC NE neurons, we observed a reduction in the incidence of late-E activity in the AbN (active expiration), cVN and HN, as well as their amplitudes. E2, second half of expiration; I, inspiration; post-I, post-inspiration



respiratory pattern in the absence of AlstR as revealed in rats in which we expressed only GFP.

During baseline conditions, acute inhibition of A6 neurons did not affect the respiratory pattern (inspiration, post-I and E2 phase). Similar

results on ventilatory parameters (Biancardi et al., 2008, 2010), as well as on the inspiratory and expiratory activities (Magalhães et al., 2018), of anaesthetised rats during eupnoea have been demonstrated using permanent ablation or acute (pharmacogenetics) inhibition of

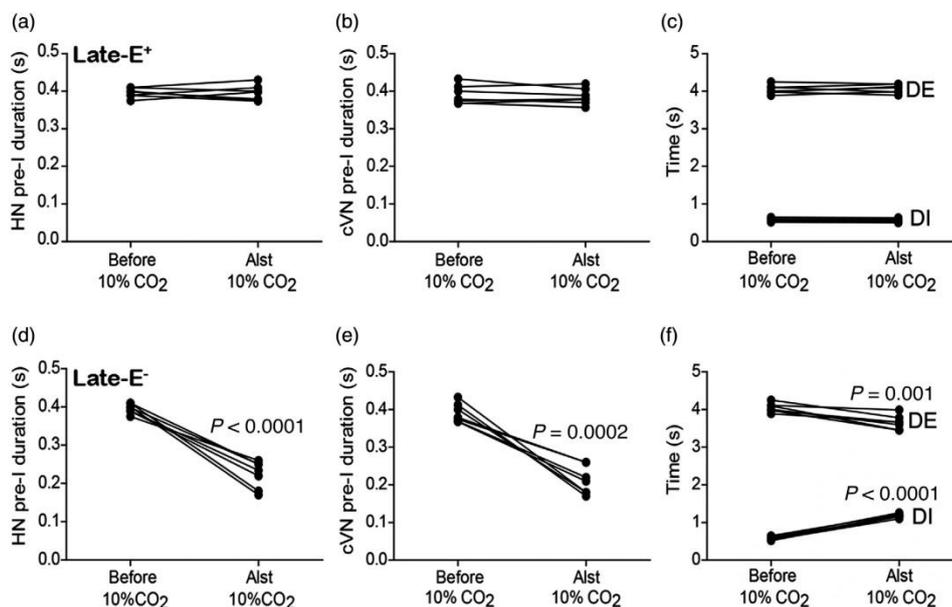


FIGURE 6 Grouped data of the effects of inhibition of A6 neurons during hypercapnia/acidosis on respiratory motor responses, showing the HN and cVN pre-I duration, DI and DE in the presence (a,b,c) and absence (d,e,f) of AbN active expiration (late-E event) before and after application of Alst during hypercapnia/acidosis

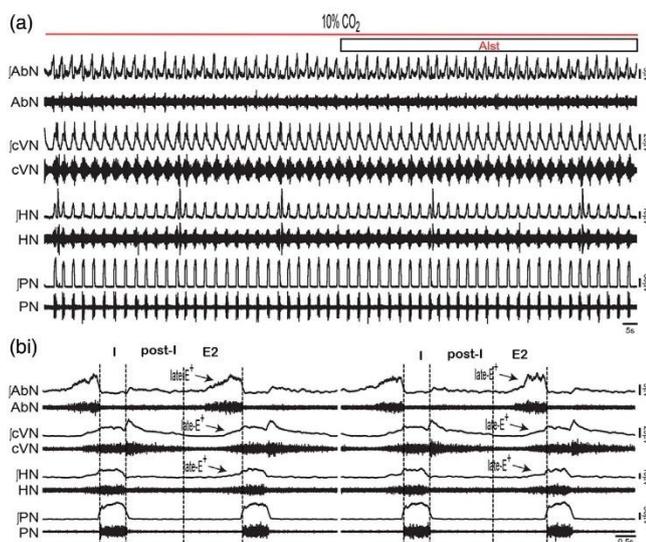


FIGURE 7 Effects of Alst addition in the absence of expression of AlstR on the respiratory motor responses to hypercapnia/acidosis. (a) Integrated (I) and raw records of AbN, cVN, HN and PN activities of an *in situ* preparation of rat, bilaterally transfected with PRSx8-GFP-LVV in the LC before and after application of Alst during hypercapnia/acidosis. (b) Magnification of two respiratory cycles from the same *in situ* preparation of rat before (bi) and after (bii) addition of Alst during hypercapnia/acidosis. Note the incidence of the late-E event in the AbN, cVN and HN, preceding the beginning of PN activity, in all respiratory cycles. Additionally, note the absence of changes in the responses of these motor nerves to hypercapnia/acidosis after administration of Alst in rats that did not express AlstR. E2, second half of expiration; I, inspiration; post-I, post-inspiration

A6 neurons. Thus, this neuronal population acts as a vigilance centre (Aston-Jones, 1986), which includes the modulation of breathing under conditions of high chemical drive, such as during hypercapnia/acidosis, but not in normocapnic conditions.

Hypercapnia/acidosis increases the firing frequency of A6 neurons *in vivo* (Guyenet, Koshiya, Huangfu, Verberne, & Riley, 1993), *in situ* (Magalhães et al., 2018) and *in vitro* preparations of rats (Elam, Yao, Thore'n, & Svensson, 1981; Pineda & Aghajanian, 1997). Previous studies have also used permanent ablation and pharmacogenetics to study the role of A6 neurons in the chemosensory control of breathing under hypercapnia/acidosis (Biancardi et al., 2008; de Carvalho et al., 2010; Li & Nattie, 2006; Magalhães et al., 2018). Our findings show an important involvement of the A6 neurons in the inspiratory (PN and HN amplitude) and expiratory motor responses (AbN late-E magnitude and incidence – active expiration), as well as in the simultaneous and associated changes in the motor outflows controlling upper airway resistance (HN and cVN pre-I activities) to hypercapnia/acidosis. There is evidence that A6 neurons project to the pre-BötC and modulate the generation of inspiration (Hilaire, Viemari, Coulon, Simonneau, & Béveugnot, 2004; Viemari, Garcia III, Doi, & Ramirez, 2011). Acute inhibition of A6 neurons during hypercapnia/acidosis reduced the PN and HN inspiratory responses. Hypercapnia/acidosis stimulates A6 neurons, which may increase the activity of pre-BötC inspiratory neurons through the activation of α_1 -adrenergic receptors (Viemari & Ramirez, 2006). Thus, we propose that this pathway modulates the increase of the PN amplitude to hypercapnia/acidosis. The pre-BötC also project to the hypoglossal motor nucleus (XII), where the hypoglossal motoneurons are located (Smith, Abdala, Borgmann, Rybak, & Paton, 2013), explaining the concomitant decrease of HN and PN inspiratory responses to hypercapnia/acidosis after A6 neuronal inhibition. Therefore, A6 neurons provide an excitatory drive to inspiratory neural networks controlling the PN and neurons regulating oropharyngeal resistance (tongue protrusion) at inspiration during hypercapnia/acidosis.

The Kölliker–Fuse (KF) nucleus, in the dorsolateral pons, regulates the inspiratory–expiratory phase transition and upper airway resistance (Dhingra, Dutschmann, Galán, & Dick, 2017). Activation of KF nucleus enhances expiration and post-inspiratory laryngeal adduction by excitation of post-inspiratory neurons (Dutschmann & Herbert, 2006). We observed that hypercapnia/acidosis reduced the duration of cVN post-inspiratory activity, which is consistent with previous studies (Abdala et al., 2009; Jenkin, Milsom, & Zoccal, 2017). It suggests that hypercapnia/acidosis inhibits KF neurons, reducing the modulation of post-inspiratory neurons in the Bötzing Complex (BötC) (Jenkin et al., 2017). Acute inhibition of A6 neurons during hypercapnia/acidosis further reduced the cVN post-inspiratory activity. There is evidence that KF neurons project to the LC (Lopes et al., 2016). Besides, the later projects to the nucleus ambiguus (NA) (Benarroch, 2018; Wang, Pinöl, Byrne, & Mendelowitz, 2014), where the laryngeal pre-ganglionic motoneurons are located. We propose that these projections subserves A6 neuronal modulation of post-inspiratory activity, and consequently the post-inspiratory glottal adduction, during hypercapnia/acidosis.

Acute inhibition of A6 neurons also reduced the amplitude and incidence of AbN late-E event (active expiration) during hypercapnia/acidosis. Recent findings suggest that under hypercapnia/acidosis the generation of active expiration is dependent upon pFRG disinhibition (de Britto & Moraes, 2017) and/or excitation by the RTN chemosensitive neurons (Zoccal et al., 2018). In addition, local inhibition of acetylcholinesterase or microinjections of carbachol cholinomimetic (Boutin, Alshafi, & Pagliardini, 2017) and serotonin (Lemes, Colombari, & Zoccal, 2016) microinjections into pFRG induced active expiration in anaesthetized rats. We propose that other chemosensitive neurons, such as A6 neurons, can also modulate active expiration during hypercapnia/acidosis via either the conditional expiratory oscillator in the pFRG or premotor expiratory bulbospinal neurons in the caudal ventral respiratory group. In this regard, anatomical evidence demonstrates that A6 neurons project to neurons in the region corresponding to RTN/pFRG (Lopes et al., 2016).

The pFRG expiratory neurons exert an excitatory modulation of the pre-I activities of cranial motoneurons controlling oropharyngeal (HN) and laryngeal (cVN) resistance. Activation of pFRG neurons induces active expiration and simultaneous increases in HN and SLN (branch of the cVN) pre-I activities, at the end of the E2 phase, to control upper airway resistance (tongue protrusion and glottal abduction) (de Britto & Moraes, 2017). Acute inhibition of A6 neurons reduced both the active expiration and the duration of the HN and cVN pre-I activities during hypercapnia/acidosis. Thus, we propose that besides the excitatory role in the central generation of active expiration, A6 neurons also modulate upper airway resistance during hypercapnia/acidosis. Our hypothesis is that this modulation is mediated by connections with the pFRG expiratory neurons. A6 neurons also project to the NA and XII (Brancatisano, Dodd, & Engel, 1991; Fregosi & Ludlow, 2014; Lui, Torontali, Tadjalli, & Peever, 2018). Therefore, A6 neurons might reduce upper airway resistance during pre-I in response to hypercapnia/acidosis regardless of any connections with pFRG neurons.

In conclusion, A6 neurons exert a substantial excitatory drive affecting the central generation of both inspiratory and active expiratory responses, as well as the associated changes in upper airway resistance during hypercapnia/acidosis in rats. Hypercapnia/acidosis produces different degrees of alertness and arousal (Wulbrand, Mcnamara, Thach, Edward, & Louis, 2008), and this behaviour is associated with activation of A6 neurons (Carter et al., 2010). Therefore, we propose that the A6 modulation of oropharyngeal (HN) and laryngeal (cVN) motor activity during hypercapnia/acidosis is an important component of the breathing response in readiness for flight or fight.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Marcio Chaim Bajgelman (Brazilian Biosciences National Laboratory, Campinas, Brazil) for making the LVV.

COMPETING INTERESTS

None declared.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

K.S.M., A.A.B. and D.J.A.M performed the experiments. K.S.M., J.F.R.P. 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 have read and approved the final version of this manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. All persons designated as authors qualify for authorship, and all those who qualify for authorship are listed.

ORCID

Karolyne S. Magalhães  <https://orcid.org/0000-0001-5755-6147>

Davi J. A. Moraes  <https://orcid.org/0000-0001-6132-0217>

REFERENCES

- Abdala, A. P. L., Rybak, I. A., Smith, J. C., & Paton, J. F. R. (2009). Abdominal expiratory activity in the rat brainstem-spinal cord in situ: Patterns, origins and implications for respiratory rhythm generation. *Journal of Physiology*, 587(14), 3539–3559. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.167502>
- Anderson, T. M., Garcia, A. J., Baertsch, N. A., Pollak, J., Bloom, J. C., Wei, A. D., ... Ramirez, J.-M. (2016). A novel excitatory network for the control of breathing. *Nature*, 536(7614), 76–80. <https://doi.org/10.1038/nature18944>
- Aston-Jones, G. (1986). Behavioral functions of locus coeruleus derived from cellular attributes. *Physiological Psychology*, 13(3), 118–126. <https://doi.org/10.3758/BF03326513>
- Benarroch, E. E. (2018). Locus coeruleus. *Cell and Tissue Research*, 373(1), 221–232. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2649-1>
- Berridge, C. W., & Waterhouse, B. D. (2003). The locus coeruleus-noradrenergic system: Modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Research Reviews*, 42(1), 33–84. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(03\)00143-7](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(03)00143-7)
- Biancardi, V., Bicego, K. C., Almeida, M. C., & Gargaglioni, L. H. (2008). Locus coeruleus noradrenergic neurons and CO₂ drive to breathing. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 455(6), 1119–1128. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0338-8>
- Biancardi, V., da Silva, L. T., Bicego, K. C., & Gargaglioni, L. H. (2010). Role of locus coeruleus noradrenergic neurons in cardiorespiratory and thermal control during hypoxia. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 170(2), 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2009.12.004>
- Birgöl, N., Weise, C., Kreienkamp, H. J., & Richter, D. (1999). 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*, 18(21), 5892–5900. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.21.5892>
- Boutin, R. C. T., Alshafiq, Z., & Pagliardini, S. (2017). Cholinergic modulation of the parafacial respiratory group. *Journal of Physiology*, 595(4), 1377–1392. <https://doi.org/10.1113/jp273012>
- Brancaisano, A., Dodd, D. S., & Engel, L. A. (1991). Posterior cricoarytenoid activity and glottic size during hyperpnea in humans. *Journal of Applied Physiology*, 71, 977–982. <https://doi.org/10.1152/jappl.1991.71.3.977>
- Carter, M. E., Yizhar, O., Chikahisa, S., Nguyen, H., Adamantidis, A., Nishino, S., ... de Lecea, L. (2010). Tuning arousal with optogenetic modulation of locus coeruleus neurons. *Nature Neuroscience*, 13(12), 1526–1533. <https://doi.org/10.1038/nn.2682>
- Coleman, J. E., Huentelman, M. J., Kasparov, S., Metcalfe, B. L., Paton, J. F. R., Katovich, M. J., ... Raizada, M. K. (2003). Efficient large-scale production and concentration of HIV-1-based lentiviral vectors for use in vivo. *Physiological Genomics*, 12(3), 221–228. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00135.2002>
- de Britto, A. A., & Moraes, D. J. A. (2017). Non-chemosensitive parafacial neurons simultaneously regulate active expiration and airway patency under hypercapnia in rats. *Journal of Physiology*, 595(6), 2043–2064. <https://doi.org/10.1113/jp273335>
- de Carvalho, D., Bicego, K. C., de Castro, O. W., da Silva, G. S. F., Garcia-Cairasco, N., & Gargaglioni, L. H. (2010). Role of neurokinin-1 expressing neurons in the locus coeruleus on ventilatory and cardiovascular responses to hypercapnia. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 172(1–2), 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2010.04.016>
- Dhingra, R. R., Dutschmann, M., Galán, R. F., & Dick, T. E. (2017). Kölliker-Fuse nuclei regulate respiratory rhythm variability via a gain-control mechanism. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 312(2), R172–R188. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00238.2016>
- Dutschmann, M., & Dick, T. E. (2012). Pontine Mechanisms of Respiratory Control. In *Comprehensive Physiology* (Vol. 2, pp. 2443–2469). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/cphy.c100015>
- Dutschmann, M., & Herbert, H. (2006). 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*, 24(4), 1071–1084. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04981.x>
- Elam, M., Yao, T., Thorén, P., & Svensson, T. H. (1981). Hypercapnia and hypoxia: Chemoreceptor-mediated control of locus coeruleus neurons and splanchnic, sympathetic nerves. *Brain Research*, 222(2), 373–381. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(81\)91040-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(81)91040-4)
- Fregosi, R. F., & Ludlow, C. L. (2014). Activation of upper airway muscles during breathing and swallowing. *Journal of Applied Physiology*, 116(3), 291–301. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00670.2013>
- Gargaglioni, L. H., Hartzler, L. K., & Putnam, R. W. (2010). The locus coeruleus and central chemosensitivity. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 173(3), 264–273. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2010.04.024>
- Guyenet, P. G., Koshiya, N., Huangfu, D., Verberne, A. J., & Riley, T. A. (1993). Central respiratory control of A5 and A6 pontine noradrenergic neurons. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 264(3), R1035–R1044. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2917-06.2006>
- Hickey, L., Li, Y., Fyson, S. J., Watson, T. C., Perrins, R., Hewinson, J., ... Pickering, A. E. (2014). Optoactivation of locus coeruleus neurons evokes bidirectional changes in thermal nociception in rats. *Journal of Neuroscience*, 34(12), 4148–4160. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4835-13.2014>
- Hilaire, G., Viemari, J. C., Coulon, P., Simonneau, M., & Bévençut, M. (2004). Modulation of the respiratory rhythm generator by the pontine noradrenergic A5 and A6 groups in rodents. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 143(2–3), 187–197. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2004.04.016>
- Hobson, J., McCarley, R., & Wyzinski, P. (1975). Sleep cycle oscillation: Reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science*, 189(4196), 55–58. <https://doi.org/10.1126/science.1094539>
- Huckstepp, R. T. R., Cardoza, K. P., Henderson, L. E., & Feldman, J. L. (2015). Role of parafacial nuclei in control of breathing in adult rats. *Journal of Neuroscience*, 35(3), 1052–1067. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2953-14.2015>
- Jenkin, S. E. M., Milsom, W. K., & Zoccal, D. B. (2017). The Kölliker-Fuse nucleus acts as a timekeeper for late-expiratory abdominal activity. *Neuroscience*, 348, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.01.050>
- Lechner, H. A. E., Lein, E. S., & Callaway, E. M. (2002). A genetic method for selective and quickly reversible silencing of mammalian neurons.

- The Journal of Neuroscience*, 22(13), 5287–5290. <https://doi.org/20026527>
- Lee Coates, E., Li, A., & Nattie, E. E. (1993). Widespread sites of brain stem ventilatory chemoreceptors. *Journal of Applied Physiology*, 75(1), 5–14. <https://doi.org/10.1152/jappl.1993.75.1.5>
- Lemes, E. V., Colombari, E., & Zoccal, D. B. (2016). Generation of active expiration by serotonergic mechanisms of the ventral medulla of rats. *Journal of Applied Physiology*, 121(5), 1135–1144. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00470.2016>
- Li, A., & Nattie, E. (2006). Catecholamine neurones in rats modulate sleep, breathing, central chemoreception and breathing variability. *Journal of Physiology*, 570(2), 385–396. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.099325>
- Lopes, L. T., Patrone, L. G. A., Li, K.-Y., Imber, A. N., Graham, C. D., Gargaglioni, L. H., & Putnam, R. W. (2016). Anatomical and functional connections between the locus coeruleus and the nucleus tractus solitarius in neonatal rats. *Neuroscience*, 324, 446–468. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.03.036>
- Lui, S., Torontali, Z., Tadjalli, A., & Peever, J. (2018). Brainstem nuclei associated with mediating apnea-induced respiratory motor plasticity. *Scientific Reports*, 8(1), 12709. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28578-5>
- Magalhães, K. S., Spiller, P. F., da Silva, M. P., Kuntze, L. B., Paton, J. F. R., Machado, B. H., & Moraes, D. J. A. (2018). Locus Coeruleus as a vigilance centre for active inspiration and expiration in rats. *Scientific Reports*, 8(1), 15654. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34047-w>
- Marina, N., Abdala, A. P. L., Korsak, A., Simms, A. E., Allen, A. M., Paton, J. F. R., & Gourine, A. V. (2011). Control of sympathetic vasomotor tone by catecholaminergic C1 neurones of the rostral ventrolateral medulla oblongata. *Cardiovascular Research*, 91(4), 703–710. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr128>
- Martins, A. R. O., & Froemke, R. C. (2015). Coordinated forms of noradrenergic plasticity in the locus coeruleus and primary auditory cortex. *Nature Neuroscience*, 18(10), 1483–1492. <https://doi.org/10.1038/nn.4090>
- Molkov, Y. I., Abdala, A. P. L., Bacak, B. J., Smith, J. C., Paton, J. F. R., & Rybak, I. A. (2010). Late-expiratory activity: Emergence and interactions with the respiratory CpG. *Journal of Neurophysiology*, 104(5), 2713–2729. <https://doi.org/10.1152/jn.00334.2010>
- Molkov, Y. I., Zoccal, D. B., Moraes, D. J. A., Paton, J. F. R., Machado, B. H., & Rybak, I. A. (2011). Intermittent hypoxia-induced sensitization of central chemoreceptors contributes to sympathetic nerve activity during late expiration in rats. *Journal of Neurophysiology*, 105(6), 3080–3091. <https://doi.org/10.1152/jn.00070.2011>
- Moraes, D. J. A., Dias, M. B., Cavalcanti-Kwiatkoski, R., Machado, B. H., & Zoccal, D. B. (2012). Contribution of the retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory region to the expiratory-sympathetic coupling in response to peripheral chemoreflex in rats. *Journal of Neurophysiology*, 108(3), 882–890. <https://doi.org/10.1152/jn.00193.2012>
- Moraes, Davi J. A., Bonagamba, L. G. H., da Silva, M. P., Paton, J. F. R., & Machado, B. H. (2017). Role of ventral medullary catecholaminergic neurons for respiratory modulation of sympathetic outflow in rats. *Scientific Reports*, 7(1), 16883. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17113-7>
- Oyamada, Y., Ballantyne, D., Mückenhoff, K., & Scheid, P. (1998). 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*, 513(2), 381–398. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.381bb.x>
- Pagliardini, S., Janczewski, W. A., Tan, W., Dickson, C. T., Deisseroth, K., & Feldman, J. L. (2011). Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult anesthetized rats. *Journal of Neuroscience*, 31(8), 2895–2905. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5338-10.2011>
- Paton, J. F. R. (1996). A working heart-brainstem preparation of the mouse. *Journal of Neuroscience Methods*, 65(1), 63–68. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(95\)00147-6](https://doi.org/10.1016/0165-0270(95)00147-6)
- Paton, J. F. R., Abdala, A. P. L., Koizumi, H., Smith, J. C., & St-John, W. M. (2006). Respiratory rhythm generation during gasping depends on persistent sodium current. *Nature Neuroscience*, 9(3), 311–313. <https://doi.org/10.1038/nn1650>
- Pineda, J., & Aghajanian, G. K. (1997). Carbon dioxide regulates the tonic activity of locus coeruleus neurons by modulating a proton- and polyamine-sensitive inward rectifier potassium current. *Neuroscience*, 77(3), 723–743. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(96\)00485-X](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(96)00485-X)
- Pisanski, A., & Pagliardini, S. (2018). The parafacial respiratory group and the control of active expiration. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 265, 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2018.06.010>
- Poon, C.-S., & Song, G. (2014). Bidirectional plasticity of pontine pneumotoxic postinspiratory drive: implication for a pontomedullary respiratory central pattern generator. *Progress in Brain Research* 209, 235–254. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63274-6.00012-6>
- Putnam, R. W., Filosa, J. A., & Ritucci, N. A. (2004). Cellular mechanisms involved in CO₂ and acid signaling in chemosensitive neurons. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 287(6), C1493–C1526. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00282.2004>
- Richter, D. W. (1982). Generation and maintenance of the respiratory rhythm. *Journal of Experimental Biology*, 100(1), 93–107. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01794.x>
- Richter, D. W., & Smith, J. C. (2014). Respiratory rhythm generation in vivo. *Physiology*, 29(1), 58–71. <https://doi.org/10.1152/physiol.00035.2013>
- Samuels, E., & Szabadi, E. (2008). 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*, 6(3), 235–253. <https://doi.org/10.2174/157015908785777229>
- Sara, S. J., & Bouret, S. (2012). Orienting and reorienting: the locus coeruleus mediates cognition through arousal. *Neuron*, 76(1), 130–141. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.011>
- Smith, J. C., Abdala, A. P. L., Borgmann, A., Rybak, I. A., & Paton, J. F. R. (2013). Brainstem respiratory networks: Building blocks and microcircuits. *Trends in Neurosciences*, 36(3), 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.11.004>
- Smith, J. C., Ellenberger, H., Ballanyi, K., Richter, D., & Feldman, J. (1991). Pre-Bötzinger complex: A brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science*, 254(5032), 726–729. <https://doi.org/10.1126/science.1683005>
- Sved, A. F., & Felsten, G. (1987). Stimulation of the locus coeruleus decreases arterial pressure. *Brain Research*, 414(1), 119–132. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)91332-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)91332-1)
- Takeuchi, T., Duszkievicz, A. J., Sonneborn, A., Spooner, P. A., Yamasaki, M., Watanabe, M., ... Morris, R. G. M. (2016). Locus coeruleus and dopaminergic consolidation of everyday memory. *Nature*, 537(7620), 357–362. <https://doi.org/10.1038/nature19325>
- Teschemacher, A. G., Wang, S., Raizada, M. K., Paton, J. F. R., & Kasparov, S. (2008). Area-specific differences in transmitter release in central catecholaminergic neurons of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 52(2), 351–358. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.114371>
- Viemari, J.-C., Garcia, A. J., III, Doi, A., & Ramirez, J.-M. (2011). 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*, 33(12), 2228–2237. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07706.x>
- Viemari, J.-C., & Ramirez, J.-M. (2006). Norepinephrine differentially modulates different types of respiratory pacemaker and nonpacemaker

- neurons. *Journal of Neurophysiology*, 95(4), 2070–2082. <https://doi.org/10.1152/jn.01308.2005>
- Wang, X., Pinöl, R., Byrne, P., & Mendelowitz, D. (2014). Optogenetic stimulation of locus ceruleus neurons augments inhibitory transmission to parasympathetic cardiac vagal neurons via activation of brainstem $\alpha 1$ and $\beta 1$ receptors. *The Journal of Neuroscience*, 34(18), 6182–6189. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5093-13.2014>
- Wulbrand, H., Mcnamara, F., Thach, B. T., Edward, T., & Louis, S. (2008). The role of arousal related brainstem reflexes in causing recovery from upper airway occlusion in infants. *Sleep*, 31(6), 833–840.
- Zoccal, D. B., Silva, J. N., Barnett, W. H., Lemes, E. V., Falquetto, B., Colombari, E., ... Takakura, A. C. (2018). 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*, 315(5), L891–L909. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00011.2018>

How to cite this article: Magalhães KS, de Britto AA, Paton JFR, Moraes DJA. A6 neurons simultaneously modulate active expiration and upper airway resistance in rats. *Experimental Physiology*. 2020;105:53–64. <https://doi.org/10.1113/EP088164>

8.2. Artigo publicado na revista *Experimental Physiology* (2020)



Received: 23 July 2019 | Accepted: 6 December 2019

DOI: 10.1113/EP088046



RESEARCH PAPER

Active expiratory oscillator regulates nasofacial and oral motor activities in rats

Alan A. de Britto¹ | Karolyne S. Magalhães¹ | Melina P. da Silva¹ |
Julian F. R. Paton² | Davi J. A. Moraes¹

¹School of Medicine of Ribeirão Preto, Department of Physiology, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

²Department of Physiology, Faculty of Medical & Health Sciences, University of Auckland, Park Road, Grafton, Auckland, New Zealand

Correspondence

Davi J. A. Moraes, Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Email: davimoraes@fmrp.usp.br

Funding information

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; Undergraduate Fellowship to A.A.B. 2016/24994-3; Master Fellowship to K.S.M. 2017/09071-9; Post-doctoral Fellowship to M.P.S. 2015/01073-7). J.F.R.P. is funded by the British Heart Foundation (RG/12/6/29670).

Edited by: Jeremy Ward

Abstract

Active expiration is mediated by an expiratory oscillator located in the parafacial respiratory group (pFRG). Active expiration requires more than contracting expiratory muscles as multiple cranial nerves are recruited to stabilize the naso- and oropharyngeal airways. We tested the hypothesis that activation of the pFRG recruits facial and trigeminal motoneurons to coordinate nasofacial and oral motor activities that engage muscles controlling airways in rats during active expiration. Using a combination of electrophysiological and pharmacological approaches, we identified brainstem circuits that phase-lock active expiration, nasofacial and oral motor outputs in an *in situ* preparation of rat. We found that either high chemical drive (hypercapnia/acidosis) or unilateral excitation (glutamate microinjection) of the pFRG evoked active expiration and stimulated motoneurons (facial and trigeminal) and motor nerves responsible for the control of nasofacial (buccal and zygomatic branches of the facial nerve) and oral (mylohyoid nerve) motor outputs simultaneously. Bilateral pharmacological inhibition (GABAergic and glycinergic receptor activation) of the pFRG abolished active expiration and the simultaneous nasofacial and oral motor activities induced by hypercapnia/acidosis. We conclude that the pFRG provides the excitatory drive to phase-lock rhythmic nasofacial and oral motor circuits during active expiration in rats. Therefore, the pFRG is more than a rhythmic oscillator for expiratory pump muscles: it also coordinates nasofacial and oral motor commands that engage muscles controlling airways in rats during active expiration.

KEYWORDS

active expiration, facial motoneurons, parafacial respiratory group, trigeminal motoneurons, hypercapnia/acidosis

1 | INTRODUCTION

Breathing in rats comprises three phases due to the interactions between brainstem respiratory neurons: active inspiration, post-inspiration (stage 1 of expiration) and passive expiration (stage 2 of expiration) (Del Negro, Funk, & Feldman, 2018; Smith, Abdala, Koizumi, Rybak, & Paton, 2007). The pre-Bötzinger complex (pre-BötC), located in the ventral medulla, is responsible for generating the active inspiratory motor behaviour (Smith, Ellenberger, Ballanyi, Richter, & Feldman, 1991). During high chemical drive, such as increases in CO₂ (hypercapnia) and/or in [H⁺] (acidosis), expiratory muscles contract to force exhalation during stage 2 of expiration, thereby enhancing pulmonary ventilation (Abdala, Rybak, Smith, & Paton, 2009; Leirao,

Silva, Gargaglioni, & da Silva, 2017; Magalhaes et al., 2018; Pisanski & Pagliardini, 2019). This phenomenon is mediated by phasic late-expiratory (late-E) neurons located in the parafacial respiratory group (pFRG), adjacent to the ventrolateral portion of the facial nucleus in rats (Abdala et al., 2009; Pagliardini et al., 2011). These neurons are synaptically inhibited at rest (Pagliardini et al., 2011) and disinhibited during hypercapnia/acidosis and start firing at the end of stage 2 of expiration (late-E) (Abdala et al., 2009; de Britto & Moraes, 2017).

Ventilation requires more than just contraction of pump muscles. Multiple cranial nerves are required to dilate or stiffen the nasopharyngeal, oropharyngeal and laryngeal airways maintaining their patency (Abdala et al., 2009; de Britto & Moraes, 2017; St-John, Rudkin, & Leiter, 2010). Indeed, several studies demonstrated that

breathing modulates the nasofacial and oral motor outflows in rats (Kleinfeld, Moore, Wang, & Deschênes, 2014b). Breathing has not only its physiological role in blood gas homeostasis but also serves as a common clock that couples nasofacial and oral senses during exploratory behaviours such as sniffing (Kleinfeld, Deschênes, Wang, & Moore, 2014a). Anatomically, the nasal region of rats is composed of intrinsic and extrinsic muscles specialized for retraction and dilatation, respectively, of nares, actions which will increase the nasal airflow (Berg & Kleinfeld, 2003; Dorfl, 1982). These muscles are innervated by clusters of motoneurons located in the ventrolateral and dorso-lateral regions of the facial nucleus (Deschênes, Kurnikova, Elbaz, & Kleinfeld, 2016a; Dörfel, 1985; Takatoh et al., 2013). Morphological studies demonstrated that the pre-BötC and pFRG project to this motor nucleus (Deschênes et al., 2016a; Takatoh et al., 2013) and electrophysiological recordings showed that facial motoneurons innervating the intrinsic and extrinsic muscles discharge in a manner phase-locked with the respiratory cycle (Deschênes et al., 2016b). The pre-BötC generates high-frequency shallow breathing (sniffing), synchronized with whisker twitching (whisking), by recruiting facial motoneurons (Deschênes et al., 2016a; Moore et al., 2013). However, the impact of activating the pFRG expiratory oscillator and the sequential recruitment of active expiration during high chemical drive (hypercapnia/acidosis) on the electrical activity of facial motor outflows controlling nasal airways remains unknown.

Oral breathing, associated with jaw movements, is presumed to be a survival skill during airway obstruction or high chemical drive (Carlo, Miller, & Martin, 1985; Saiki & Matsumoto, 2004), but also gasping (St-John et al., 2010). Jaw movements are produced mainly by trigeminal motoneurons, which cause jaw opening, driven by motoneurons located in the ventromedial division of the trigeminal nucleus, and jaw closing mediated by motoneurons in the dorsolateral division (Mizuno, Konishi, & Sato, 1975; Oka et al., 2013). Trigeminal nerve and motoneurons are modulated by the pre-BötC inspiratory rhythm generator neurons (Koizumi, Nomura, Ishihama, Kogo, & Matsuya, 1999). The rhythmic jaw movements during oral breathing may also be required, particularly under hypercapnia/acidosis, to reduce oropharyngeal resistance and improve airflow. Despite evidence of respiratory modulation of nasofacial and oral motor outflows during breathing-related exploratory behaviours, the brainstem mechanisms responsible for these interactions under high chemical drive are not fully explored. Herein, we hypothesized that activation of the pFRG expiratory oscillator recruits facial and trigeminal motoneurons to coordinate nasofacial and oral motor activities that engage muscles controlling airways in rats during active expiration. We identified brainstem circuits that phase-lock active expiration with nasofacial and oral motor outflows in rats.

2 | METHODS

2.1 | Animals and ethical approval

Experiments were performed on male Wistar rats (85–100 g) from the Animal Care Facility of the University of São Paulo, Campus of Ribeirão

New Findings

• What is the central question of this study?

Does the parafacial respiratory group (pFRG), which mediates active expiration, recruit nasofacial and oral motoneurons to coordinate motor activities that engage muscles controlling airways in rats during active expiration.

• What is the main finding and its importance?

Hypercapnia/acidosis or pFRG activation evoked active expiration and stimulated the motoneurons and nerves responsible for the control of nasofacial and oral airways patency simultaneously. Bilateral pFRG inhibition abolished active expiration and the simultaneous nasofacial and oral motor activities induced by hypercapnia/acidosis. The pFRG is more than a rhythmic oscillator for expiratory pump muscles: it also coordinates nasofacial and oral motor commands that engage muscles controlling airways.

Preto, Brazil. The animals were maintained in standard environmental conditions ($23 \pm 2^\circ\text{C}$; 12 h–12 h dark–light cycle) with water and chow available *ad libitum*. All experimental protocols were approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (no. 1/2016-1). The experiments also conform to the principles and regulations of journal policy and regulations on animal experimentation (Grundy, 2015).

2.2 | Ventral and dorsal approaches of *in situ* brainstem preparation

The perfusion solution was composed of (mM): 125 NaCl, 24 NaHCO₃, 3 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.25 MgSO₄, 1.25 KH₂PO₄ and 10 glucose. Other substances added to the perfusion solution included an oncotic agent (polyethylene glycol, *M_r* 16,000–24,000, 1.25%, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and a neuromuscular blocker (vecuronium bromide 3–4 µg ml⁻¹, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, Brazil). Initially, the animals were deeply anaesthetized with halothane (100%; AstraZeneca do Brasil Ltda, Cotia, Brazil). The depth of anaesthesia was verified by tail pinching and absence of the withdrawal reflex response. The animals were transected caudal to the diaphragm, exsanguinated and submerged in a cooled perfusion solution. Rats were decerebrated immediately at the precollicular level to render them insentient, and skinned. The ventral medullary surface was exposed (Moraes, Machado, & Paton, 2015) for microinjections into the pFRG and recording of motoneurons in the facial motor nucleus. Motoneuron recording from the trigeminal motor nucleus were made with a dorsal approach (Paton, 1996). All preparations were transferred to a recording chamber and the descending aorta was cannulated and perfused with the perfusion solution, continuously gassed with 5% CO₂ and 95% O₂, using a 5205 peristaltic pump

(Watson-Marlow, Falmouth, UK). The perfusate was warmed to 31°C and filtered using a nylon mesh (pore size: 22 µm; Millipore, Burlington, MA, USA). Hypercapnia/acidosis (15 min) was performed by switching the perfusate with 5% CO₂ to another one with 10% and 90% O₂ (Gas mixer Pegas 4000; Columbus Instruments, Columbus, OH, USA).

Motor nerves were isolated and recorded using bipolar glass suction electrodes mounted on 3D micromanipulators (YOU-1; Narishige, Setagaya, Japan). Left phrenic nerve (PN) activity was recorded from its central end in all preparations. The lower thoracic spinal segment (T12) of abdominal nerve (AbN) was isolated from the abdominal oblique internal muscle, cut distally for recording also in all preparations. The buccal branch of the facial nerve (BN), which innervates the intrinsic muscles of the nasal region, and the zygomatic branch of the facial nerve (ZN), which innervates the extrinsic muscles of the nasal region (Dorfl, 1982; Takatoh et al., 2013), were both isolated from the surface of the masseter muscle (the first at the most rostral level and the second close to the ear of the rat), sectioned and their central activity simultaneously recorded. The mylohyoid branch of the trigeminal nerve (MhN), which contains jaw-opening motoneurons located in the trigeminal motor nucleus (Oka et al., 2013), was dissected in the digastric muscle, sectioned and its central activity recorded. The hypoglossal nerve (HN) was isolated in the cervical region, cut distally and its activity recorded, simultaneously with MhN, from its cut central end. All nerves were recorded (1700 amplifier; A-M Systems, Sequim, WA, USA) in absolute units (µV).

Motoneurons were impaled and stable intracellular recordings (0.5 M potassium acetate, 50–70 MΩ; Duo 773 Electrometer; World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) were made to study the effects of hypercapnia/acidosis on firing frequency and membrane potential trajectory. Motoneurons located in the ventrolateral or dorsolateral regions of the facial motor nucleus or in the ventromedial region of the trigeminal motor nucleus were mapped by searching for antidromic field potentials following stimulation of the BN, ZN and MhN (10 V, 1 Hz, 0.2 ms pulse width), respectively, with the aid of stereotaxic coordinates from an atlas (Paxinos & Watson, 1997). All signals were amplified, band-pass filtered (300 Hz to 5 kHz) and acquired at 10 kHz sample frequency with an A/D converter (CED 1401; Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK), using Spike2 software (Cambridge Electronic Design).

2.3 | Microinjections into pFRG

Microinjections of agonist of GABA_A and glycinergic receptors (muscimol–glycine; Mus–Gly; 1 mM; Sigma-Aldrich; de Britto & Moraes, 2017) or vehicle (saline, 0.9%) were made after 5 min of hypercapnia/acidosis. L-Glutamate (L-Glu; 10 mM; Sigma-Aldrich; Moraes, Zoccal, & Machado, 2012b) was also microinjected, but during basal conditions (normocapnia). These injections were made into the pFRG and performed in regions containing late-E neurons (de Britto & Moraes, 2017; Moraes, Dias, Cavalcanti-Kwiatkoski, Machado, & Zoccal, 2012a): 0.3–0.5 mm caudal to the trapezoid body, 1.9–2.0 mm lateral to the midline and 50–100 µm beneath the ventral surface. Microinjections were performed unilaterally (L-Glu) or bilaterally

(Mus–Gly or saline) via a calibrated glass micropipette and the injected volume measured, which was approximately 20 nl (Picospritzer II; Parker Hannifin, Hollis, NH, USA). The drugs were dissolved in vehicle with the pH adjusted to 7.4 (Spezialindikator; Merck, Darmstadt, Germany). After experiments, the brainstems were removed and stored in paraformaldehyde (4%) for 5 days. Serial transverse sections (50 µm thick) were cut and then stained with cresyl violet using the Nissl method. The confirmation of microinjections into the pFRG was performed by visualization of pipette tracks.

2.4 | Data analyses

All analyses of motor nerves were performed off-line from rectified and integrated signals (time constant: 50 ms) using 5 min of recordings. PN activity was assessed by the burst frequency and duration (time of inspiration; TI). The time intervals between consecutive PN bursts were considered the time of expiration (TE), which was divided into two equal segments: stage 1 and stage 2 of expiration. The duration of the pre-inspiratory (pre-I) components of MhN, BN, ZN and HN at the end of stage 2 of expiration was analysed by their relationship to the beginning of the PN burst. The changes in the inspiratory amplitude of motor nerves in response to hypercapnia/acidosis were expressed as absolute values (µV) in relation to basal activity (normocapnia). The start of active expiration was determined when the AbN activity at the end of stage 2 of expiration was greater (µV) than that at stage 1 of expiration. The motoneuron firing frequency and membrane potential were also analysed using 5 min of recordings.

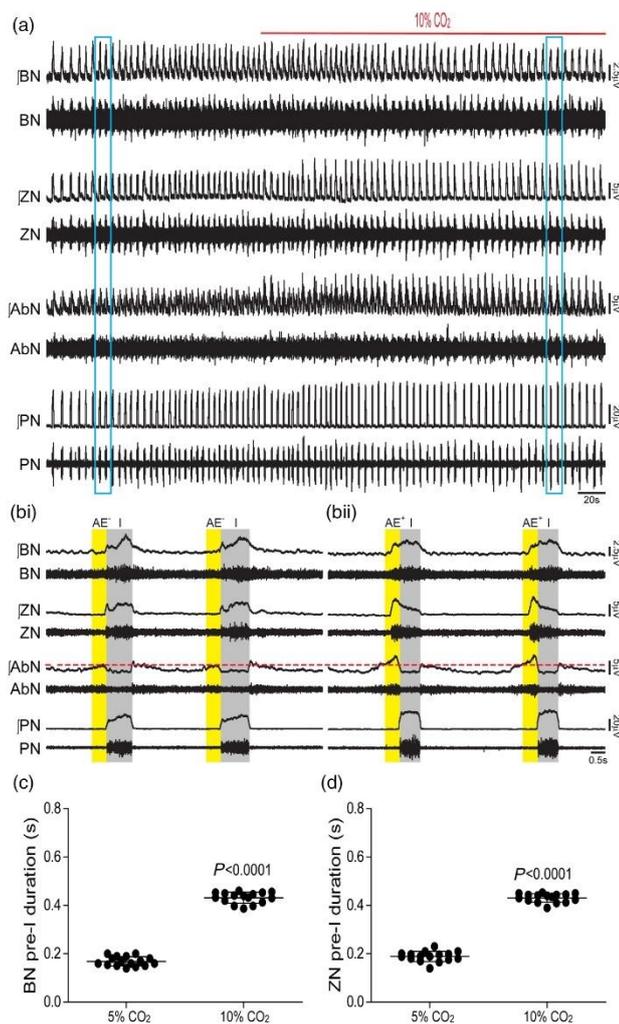
2.5 | Statistical analysis

Results are presented as means ± SD and compared using Student's paired *t* test or the Wilcoxon matched pairs test (GraphPad Prism 4, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Differences were considered significant at *P* < 0.05.

3 | RESULTS

3.1 | Modulation of nasofacial and oral motor actions by breathing

We characterized the motor outflows involved in the control of nasofacial and oral motor actions by their activity as it related to PN and AbN activities (Figures 1a and 2a). The BN, ZN, MhN and HN fired almost exclusively during inspiration (simultaneously with PN burst), with limited activity at the end of stage 2 of expiration (pre-I component; Figures 1bi and 2bi). Expiratory activity, recorded from the AbN, was of low amplitude firing mainly during stage 1 of expiration (Figures 1bi and 2bi). High chemical drive (10% CO₂) evoked active expiration, evidenced by increase in AbN amplitude at the end of stage 2 of expiration, and enhanced the duration of the pre-I components of BN (0.43 ± 0.02 vs. 0.16 ± 0.01 s; *P* < 0.0001; *n* = 16), ZN (0.43 ± 0.01 vs. 0.18 ± 0.02 s; *P* < 0.0001; *n* = 16), MhN (0.65 ± 0.04 vs. 0.19 ± 0.02 s; *P* < 0.0001; *n* = 14) and HN (0.42 ± 0.02 vs.



0.18 ± 0.02 s; $P < 0.0001$; $n = 14$) at the same phase of the respiratory cycle (Figures 1a–d and 2a–d). During active expiration, there was a significant increase of TE (4.24 ± 0.16 vs. 3.36 ± 0.18 s; $P < 0.0001$) and reduction in TI (0.54 ± 0.03 vs. 1.26 ± 0.07 s; $P < 0.0001$), maintaining the respiratory frequency constant (PN frequency; 0.25 ± 0.03 vs. 0.26 ± 0.07 Hz; $n = 30$; Figures 1a–bii and 2a–bii). We also observed an enhancement of the amplitude of PN inspiratory activity (41.5 ± 1.12 vs. 29.4 ± 0.91 μ V; $P < 0.05$), which was reflected in HN (34.2 ± 0.86 vs. 21.3 ± 1.14 μ V; $P < 0.0001$), but not in BN (5.12 ± 0.88 vs. 4.89 ± 0.69 μ V), ZN (5.22 ± 0.97 vs. 5.59 ± 0.89 μ V) and MhN (11.77 ± 1.33 vs. 12.45 ± 1.22 μ V) activities (Figures 1a–bii and 2a–bii). These results suggest that neurons from the brainstem inspiratory (basal) and

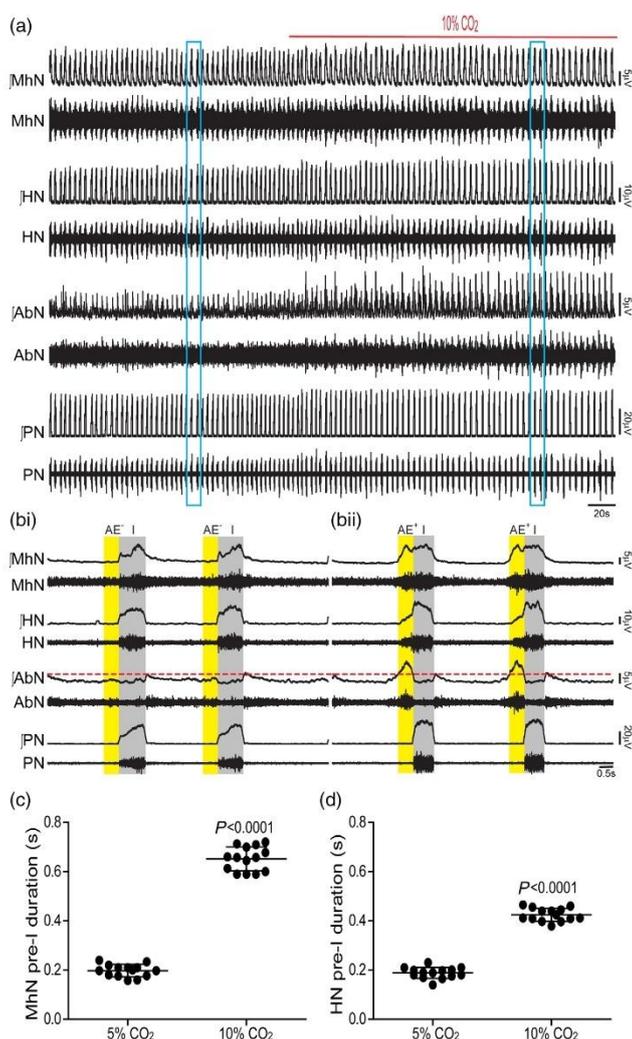
expiratory (high chemical drive) rhythm generators control different groups of facial, trigeminal and hypoglossal motoneurons, affecting naso- and oropharyngeal resistance in a state-dependent manner.

3.2 | Pharmacological inhibition of pFRG neurons reduces the pre-I component of nasofacial and oral motor responses to high chemical drive

We determined the role of the expiratory rhythm generator (pFRG neurons) in controlling nasofacial and oral motor outflows. Bilateral activation of GABAergic and glycinergic receptors (Mus–Gly) in the pFRG (Figure 3a,b) abolished active expiration (AbN activity at stage

FIGURE 1 Hypercapnia/acidosis evokes active expiration and enhances the pre-I component of nasofacial motor activities. (a) Raw and integrated (I) records of BN, ZN, AbN and PN activities from one *in situ* preparation of rat under normocapnia and hypercapnia/acidosis (10% CO₂). (b) Magnification of two respiratory cycles from the same *in situ* preparation of rat under normocapnia (bi) and hypercapnia/acidosis (bii). Note that high chemical drive evoked active expiration (AE⁺: AbN activity above the levels at stage 1 of expiration – red line) and enhanced the duration of BN and ZN pre-I components. I, inspiration. (c,d) Grouped data comparing the duration of BN (c) and ZN (d) pre-I components under normocapnia and hypercapnia/acidosis

FIGURE 2 Hypercapnia/acidosis evokes active expiration and enhances the pre-I component of oral motor activities. (a) Raw and integrated (*I*) records of MhN, HN, AbN and PN activities from one *in situ* preparation of rat under normocapnia and hypercapnia/acidosis (10% CO₂). (b) Magnification of two respiratory cycles from the same *in situ* preparation of rat under normocapnia (bi) and hypercapnia/acidosis (bii). Note that high chemical drive evoked active expiration (AE⁺: AbN activity above the levels at stage 1 of expiration – red line) and enhanced the duration of MhN and HN pre-I components. I, inspiration. (c,d) Grouped data comparing the duration of MhN (c) and HN (d) pre-I components under normocapnia and hypercapnia/acidosis



2 of expiration) and reduced the duration of the pre-I component of BN (0.22 ± 0.05 vs. 0.43 ± 0.02 s; $P = 0.0004$; $n = 6$), ZN (0.21 ± 0.05 vs. 0.43 ± 0.01 s; $P = 0.0004$; $n = 6$), MhN (0.2 ± 0.02 vs. 0.65 ± 0.04 s; $P < 0.0001$; $n = 5$) and HN (0.19 ± 0.02 vs. 0.42 ± 0.02 s; $P < 0.0001$; $n = 5$) at the same phase of respiratory cycle (Figures 4a–d and 5a–d). Inhibition of pFRG neurons reduced TE (3.32 ± 0.23 vs. 4.33 ± 0.15 s; $P < 0.0001$) and increased TI (1.28 ± 0.12 vs. 0.54 ± 0.03 s; $P = 0.001$; $n = 11$), but did not modify the inspiratory amplitude of either PN (39.2 ± 2.6 vs. 40.7 ± 2.11 μ V) or HN (34.12 ± 2.77 vs. 32.45 ± 2.4 μ V) during hypercapnia/acidosis (Figures 4a–bii and 5a–bii). Together, these data imply that the rhythmic expiratory oscillations of pFRG

neurons are required for the enhancement of the pre-I component of nasofacial and oral motor responses of facial, trigeminal and hypoglossal motoneurons during high chemical drive.

As a control, bilateral microinjections of vehicle (saline) into the pFRG did not show significant changes in active expiration, TE (4.21 ± 0.18 vs. 4.19 ± 0.17 s) and TI (0.52 ± 0.05 vs. 0.53 ± 0.04 s; $n = 12$) or in the respiratory pattern of nerves involved in the control of nasofacial and oral motor outflows (BN: 0.4 ± 0.05 vs. 0.42 ± 0.02 ; $n = 6$; ZN: 0.39 ± 0.03 vs. 0.42 ± 0.02 s; $n = 6$; MhN: 0.6 ± 0.09 vs. 0.65 ± 0.04 s; $n = 6$; HN: 0.4 ± 0.06 vs. 0.43 ± 0.02 s; $n = 6$) during hypercapnia/acidosis (Figures 6a–bii and 7a–bii).

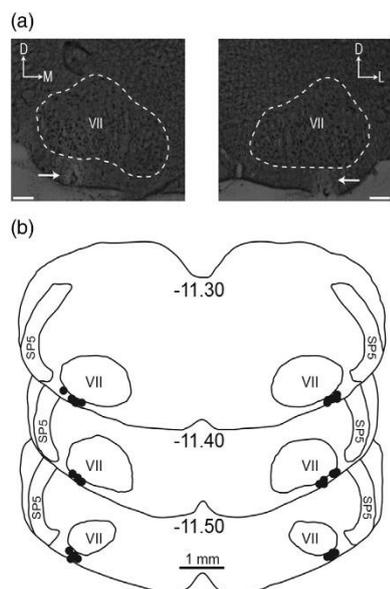


FIGURE 3 Location of pFRG microinjections. (a) Photomicrographs showing the sites of bilateral microinjections in the pFRG (at ~ 11.40 mm caudal to the bregma; ~ 200 μm rostral to the caudal pole of facial motor nucleus). The tracks of the microinjection pipette are located in the ventral surface ~ 500 μm medial to the spinal trigeminal tract (Sp5). Scale bars: 200 μm . VII, facial motor nucleus; D, dorsal; L, lateral; M, medial. (b) Schematic drawings of coronal sections of the brainstem showing the sites of the microinjections into the pFRG (100–300 μm rostral to the caudal pole of VII)

3.3 | Unilateral excitation of pFRG neurons induces active expiration and enhances the pre-I component of the nasofacial and oral motor outflows

On the basis that inhibition of pFRG neurons reduces the pre-I component of nasofacial and oral motor activities evoked by high chemical drive, we sought to determine the effects of stimulating the pFRG on nasofacial and oral motor outflows. Unilateral microinjections of L-Glu into pFRG (ipsilateral to the recorded nerves) produced incrementing bursts in AbN activity at the end of stage 2 of expiration (i.e. active expiration; Figure 8a,b,e,f). Concomitant with this active expiration, the duration of the pre-I component of the BN (0.39 ± 0.05 vs. 0.15 ± 0.03 s; $P = 0.002$; $n = 4$) and ZN (0.36 ± 0.06 vs. 0.17 ± 0.04 s; $P = 0.04$; $n = 4$) was enhanced (Figure 8a–d). Simultaneous increases in the duration of the pre-I component of MhN (0.51 ± 0.11 vs. 0.19 ± 0.03 s; $P = 0.007$; $n = 4$) and HN (0.34 ± 0.08 vs. 0.17 ± 0.02 s; $P = 0.03$; $n = 4$) were also observed (Figure 8e–h). On the other hand, no changes in either inspiratory PN frequency (0.27 ± 0.04 vs. 0.25 ± 0.03 Hz) or amplitude (30.2 ± 1.2 vs. 29.9 ± 0.99 μV ; $n = 4$) were observed (Figure 8a,e). These data clearly show that excitation

of the pFRG selectively induces active expiration and enhances the pre-I activity of nasofacial and oral motor activities, which will affect the naso- and oropharyngeal resistance.

3.4 | High chemical drive enhances pre-I activity in nasofacial and oral motoneurons

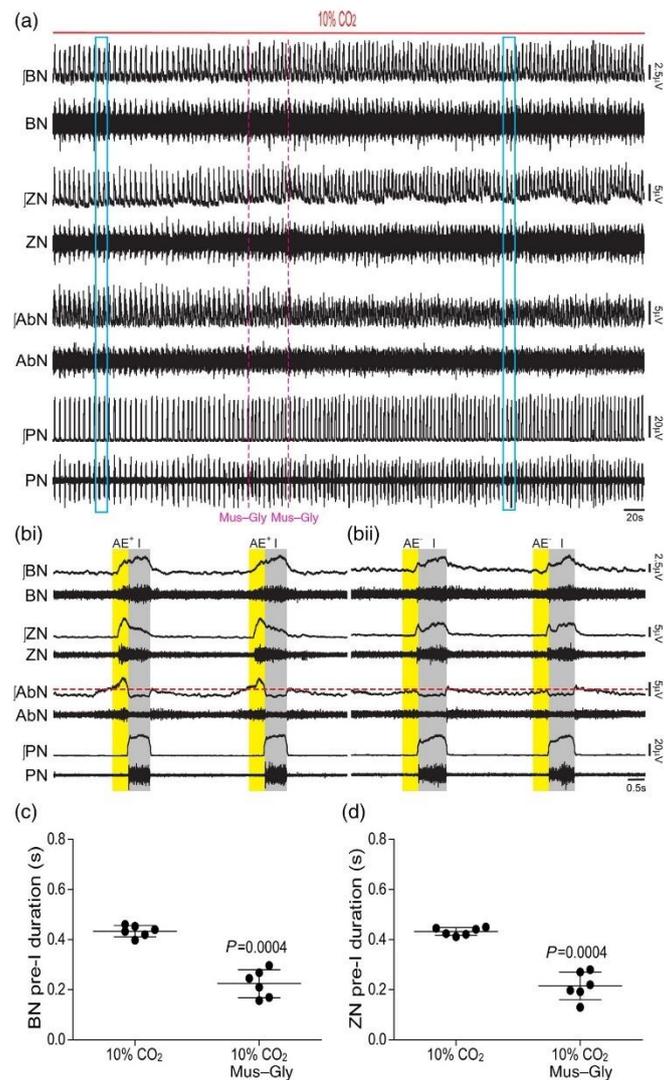
The BN contains the axons from motoneurons located in the ventrolateral regions of the facial motor nucleus, while the ZN contains axons from motoneurons located in dorsolateral and most lateral sections (Deschênes et al., 2016a; Dörfel, 1985; Takatoh et al., 2013). We recorded motoneurons firing during pre-I and inspiratory phases in the ventrolateral region of facial motor nucleus ($n = 4$; Figure 9ai,aiii). Hypercapnia/acidosis did not affect their membrane potential during either stage 1 (-33.79 ± 2.99 vs. -34.8 ± 1.61 mV) or stage 2 of expiration (-33.89 ± 2.96 vs. -35.15 ± 1.64 mV), but increased their firing frequency (59.77 ± 0.46 vs. 35.7 ± 2.6 Hz; $P = 0.0005$) at the end of stage 2 expiration (i.e. pre-I component; Figure 9ai–aiii). We also recorded motoneurons firing during pre-I and inspiratory phases in the dorsolateral region of facial motor nucleus ($n = 4$; Figure 9bi,biii). Hypercapnia/acidosis did not affect their membrane potential during stage 1 (-34.94 ± 2.31 vs. -34.69 ± 1.9 mV) or stage 2 of expiration (-34.96 ± 2.27 vs. -34.92 ± 1.77 mV), but increased their firing frequency (60.93 ± 1.121 vs. 34.69 ± 7.53 Hz; $P = 0.004$) at the end of stage 2 of expiration (pre-I component; Figure 9bi–biii). Silent motoneurons were found in the facial motor nucleus in the dorsolateral region ($n = 4$; Figure 9ci,ciii), but these motoneurons became activated (22.09 ± 4.65 Hz) at the end of stage 2 of expiration (pre-I component; Figure 9ci–ciii) when exposed to hypercapnia/acidosis; there was no effect on their membrane potential during stage 1 of expiration (-40.12 ± 1.17 vs. -39.48 ± 1.23 mV) or inspiration (-37.86 ± 1.34 vs. -38.55 ± 1.84 mV; Figure 9ci–ciii).

MhN activity is determined by motoneurons located in the ventromedial region of trigeminal motor nucleus (Oka et al., 2013). We recorded motoneurons firing during pre-I and inspiratory phases in the ventromedial region of trigeminal motor nucleus ($n = 4$; Figure 9di,diii). Hypercapnia/acidosis did not affect their membrane potential during stage 1 (-36.15 ± 1.27 vs. -34.87 ± 1.16 mV) or stage 2 of expiration (-36.24 ± 1.4 vs. -35.12 ± 1 mV), but increased their firing frequency (61.91 ± 2.59 vs. 42.16 ± 9.85 Hz; $P = 0.01$) at the end of stage 2 of expiration (pre-I component; Figure 9di–diii). On the basis of these data, we can conclude that high chemical drive selectively enhances the pre-I activity of BN, ZN and MhN facial and trigeminal motoneurons.

4 | DISCUSSION

We have identified brainstem circuits that provide active expiratory drive to the nasofacial and oral motor outflows during high chemical drive in rats. During active expiration nasofacial and oral motor functions must maintain upper airway patency (Moore, Kleinfeld, &

FIGURE 4 pFRG inhibition eliminates the hypercapnia/acidosis-evoked active expiration and reduces the pre-I component of nasofacial motor responses. (a) Raw and integrated (I) records of BN, ZN, AbN and PN activities from one *in situ* preparation of rat under hypercapnia/acidosis before and after bilateral microinjections of Mus-Gly into the pFRG. (b) Magnification of two respiratory cycles from the same *in situ* preparation of rat under hypercapnia/acidosis before (bi) and after (bii) pFRG inhibition. Note that pFRG inhibition eliminated the hypercapnia/acidosis-evoked active expiration (AE⁺: AbN activity above the levels at stage 1 of expiration – red line) and reduced the pre-I component of the nasofacial motor responses. (c,d) Grouped data comparing the duration of BN (c) and ZN (d) pre-I components under hypercapnia/acidosis before and after pFRG inhibition



Wang, 2014). Herein, we demonstrated that multiple cranial nerves (facial, trigeminal and hypoglossal) are all recruited to affect the naso- and oropharyngeal airways in rats during active expiration. This is coordinated by the expiratory neurons in the pFRG that synchronize the activity of the nares-dilating facial, jaw-opening trigeminal and tongue-protruding hypoglossal motoneurons, thereby lowering the resistance to airflow through the naso- and oropharyngeal regions.

Nasofacial and oral motor activity are modulated by breathing in rodents. The inspiratory pre-BötC neurons control the nasal muscles

during whisking (Moore et al., 2014) and sniffing (Deschênes et al., 2016a; McElvain et al., 2018). Previous studies proposed that this temporal sequence of events (i.e. breathing, whisking and sniffing) can improve the fidelity of decoding stimuli during exploratory behaviour in rodents (McElvain et al., 2018). We observed that nasofacial (BN and ZN), pharyngeal (HN) and submandibular (MhN) nerves exhibit predominantly inspiratory modulation, but also a small pre-I component, during basal breathing (normocapnia). This observed synchronization may play a pivotal role in controlling the aperture of

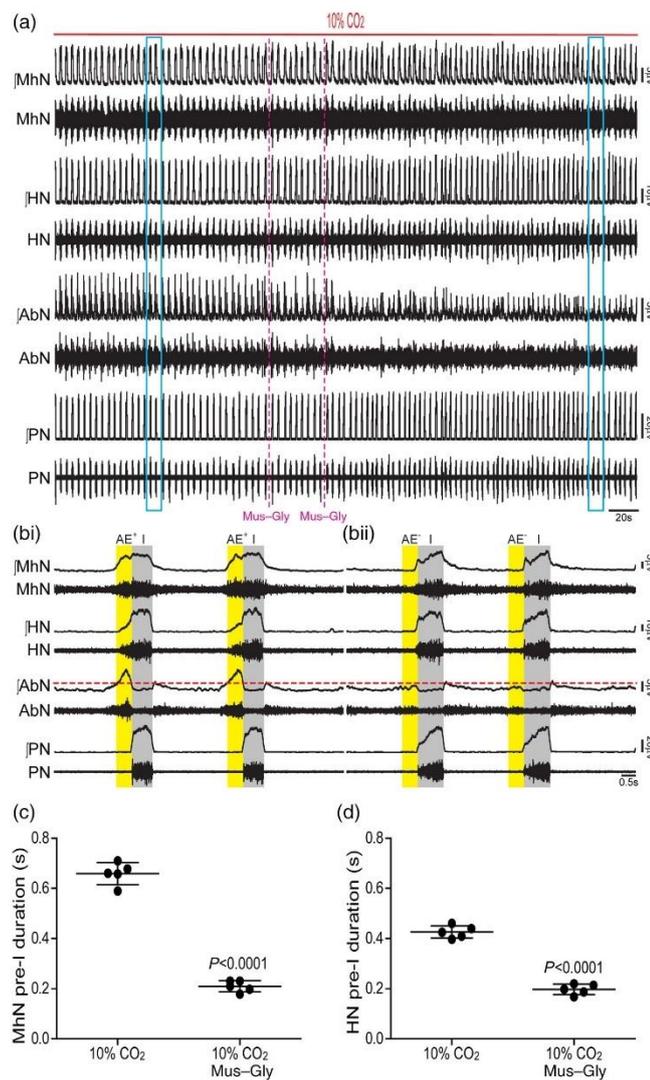


FIGURE 5 pFRG inhibition eliminates the hypercapnia/acidosis-evoked active expiration and reduces the pre-I component of oral motor responses. (a) Raw and integrated (\int) records of MhN, HN, AbN and PN activities from one *in situ* preparation of rat under hypercapnia/acidosis before and after bilateral microinjections of Mus-Gly into the pFRG. (b) Magnification of two respiratory cycles from the same *in situ* preparation of rat under hypercapnia/acidosis before (bi) and after (bii) pFRG inhibition. Note that pFRG inhibition eliminated the hypercapnia/acidosis-evoked active expiration (AE⁺: AbN activity above the levels at stage 1 of expiration - red line) and reduced the pre-I component of the oral motor responses. (c,d) Grouped data comparing the duration of MhN (c) and HN (d) pre-I components under hypercapnia/acidosis before and after pFRG inhibition

the naso- and oropharynx, as well as stabilizing the airways during pre-I and inspiratory phases. In fact, there is high coordination of the motor pattern sequence so that the decrease of airway resistance precedes the onset of lung inflation (inspiration). The nasal airflow is controlled by the size of the nares during both pre-I and inspiratory phases, thereby reducing upper airways resistance (Haight and Cole, 1983). Tongue movement is also important for controlling oropharyngeal resistance (McElvain et al., 2018). Tongue protrusion during pre-I and inspiratory phases also improves airway flow by

dilating the oropharynx (Leiter & St-John, 2004; Lowe & Sessle, 1973; Sawczuk & Mosier, 2001). The same is true for the glottal control of laryngeal airway resistance during pre-I and inspiratory phases (Paton & Dutschmann, 2002; Richter & Smith, 2014). On the other hand, oral breathing associated with jaw movements is presumed to be a transient behaviour that appears during airway obstruction or high chemical drive (Carlo et al., 1985; Saiki & Matsumoto, 2004). In this regards, previous studies reported inspiratory-related activity in jaw-opening sub-mandibular muscles (including digastric) during asphyxia and apnoea

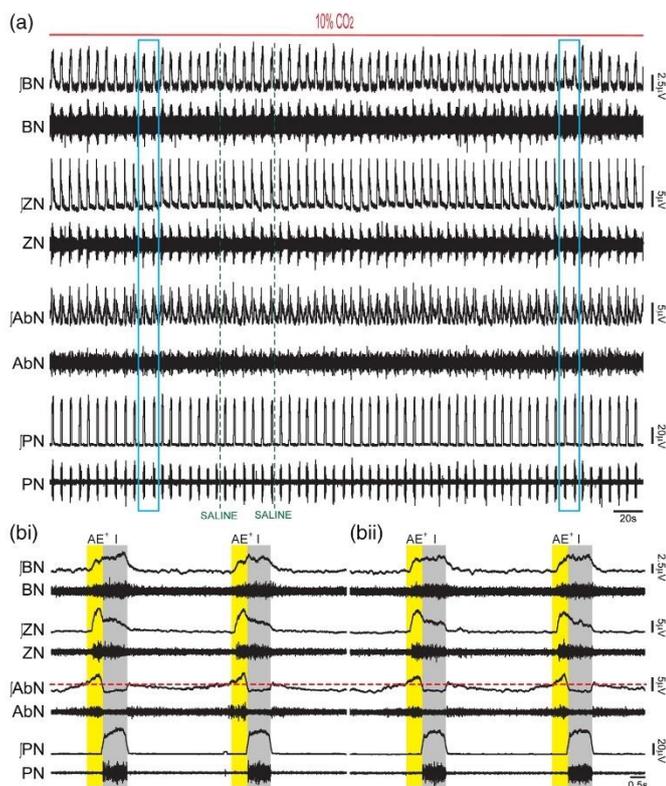


FIGURE 6 Bilateral microinjections of vehicle into pFRG do not affect the respiratory and nasofacial motor responses to hypercapnia/acidosis. (a) Raw and integrated (I) records of BN, ZN, AbN and PN activities from one *in situ* preparation of rat under hypercapnia/acidosis before and after bilateral microinjections of saline into the pFRG. (b) Magnification of two respiratory cycles from the same *in situ* preparation of rat before (bi) and after (bii) saline microinjections. Note the absence of changes in the respiratory and nasofacial motor responses after saline bilateral microinjections. AE*: active expiration

(Carlo et al., 1985). It is possible that in the *in situ* decerebrated preparation the pathway that exists allowing the MhN to be incorporated into events that require synchronization with inspiratory breathing, such as gasping and hypoxia, is being utilized to transmit this signal in the absence of cortical control. However, it has been reported previously that neonatal and juvenile rats present inspiratory-related activity in digastric muscle during basal breathing (Saiki & Matsumoto, 2004), suggesting that the observed pre-I and inspiratory modulation of MhN in normocapnia is an essential component of the respiratory control of oropharyngeal resistance, at least in juvenile rats.

Electromyographic recordings in conscious rats showed that nasal intrinsic and extrinsic muscles (nasolabialis, maxillolabialis and nasolabialis profundus) discharge in phase with breathing (Deschênes et al., 2016a; Moore et al., 2013). Intrinsic and nasolabialis profundus muscles contract during pre-I and inspiratory phases contributing to retraction and dilatation of the nares, respectively (Deschênes

et al., 2015; McElvain et al., 2018). The extrinsic nasolabialis and maxillolabialis muscles contract during expiration but only when the rate or amplitude of respiration increases, such as during a sniff (Hill, Bermejo, Zeigler, & Kleinfeld, 2008; McElvain et al., 2018; Sherrey & Megirian, 1977). Therefore, we believe that the pre-I and inspiratory components of the BN and ZN at basal breathing reflect the activities of the intrinsic and extrinsic nasolabialis profundus muscles, respectively, to functionally reduce nasopharyngeal resistance. On the other hand, high chemical drive or pFRG activation enhances the pre-I components of nasofacial nerves, suggesting a synchronization between retraction and dilatation of the nares, as well as active expiratory pumping from abdominal muscles; this is predicted to reduce resistance and enhance airflow during exhalation. We cannot rule out that the observed pre-I activity in ZN reflects the recruitment of the extrinsic nasolabialis and maxillolabialis muscles to translate the mystacial pad caudally at the end of expiration, affecting

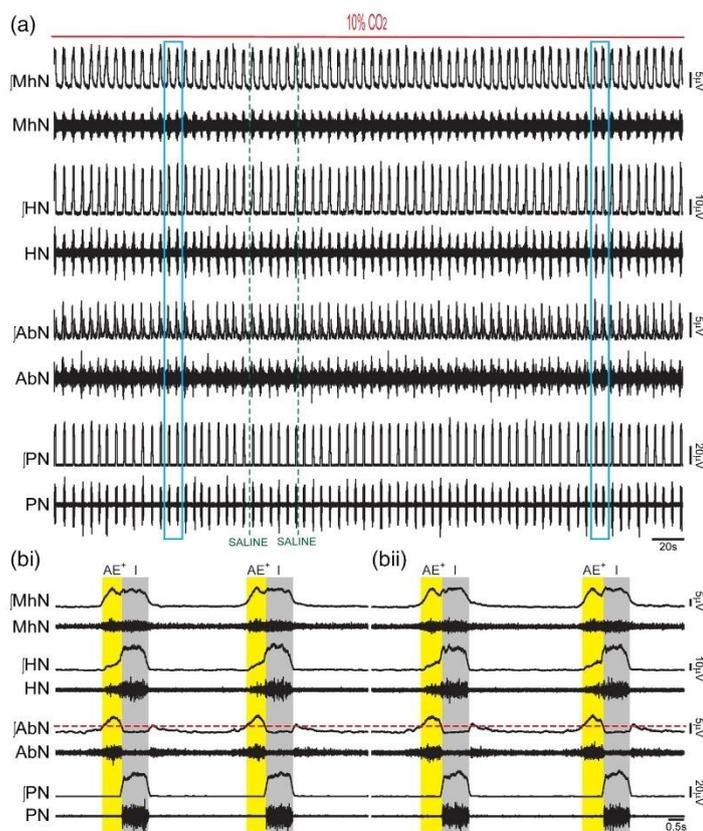


FIGURE 7 Bilateral microinjections of vehicle into the pFRG do not affect the respiratory and oral motor responses to hypercapnia/acidosis. (a) Raw and integrated (I) records of MhN, HN, AbN and PN activities from one *in situ* preparation of rat under hypercapnia/acidosis before and after bilateral microinjections of saline into pFRG. (b) Magnification of two respiratory cycles from the same *in situ* preparation of rat before (b) and after (bii) saline microinjections. Note the absence of changes in the respiratory and oral motor responses after saline bilateral microinjections. AE⁺: active expiration

the vibrissae (retraction) and nose (protraction) (McElvain et al., 2018).

Nasofacial muscles of rodents are innervated by facial motoneurons, which are distributed in clusters (Deschênes et al., 2016a; Hinrichsen & Watson, 1984; Watson, Sakai, & Armstrong, 1982). Intrinsic muscles are innervated by motoneurons located in the ventrolateral part of the nucleus, while motoneurons innervating the extrinsic muscles were found dorsolaterally and at the lateral edge (Deschênes et al., 2016a; Takatoh et al., 2013). Innervation of the lateral sector of the facial motor nucleus by pre-BötC neurons in rats (Deschênes et al., 2016b; Takatoh et al., 2013) is consistent with the phasic activation of the intrinsic (facial motoneurons in the ventrolateral region) and extrinsic (facial motoneurons in the dorsolateral region) motoneurons and nerves (BN and ZN, respectively) from rats

at pre-I and inspiratory phases during basal breathing. The pFRG is located ventrolateral to the facial motor nucleus and modulates the activity of facial motoneurons (Abdala et al., 2009; Pagliardini et al., 2011). pFRG neurons innervate the lateral regions of the facial motor nucleus (Moore et al., 2013), where motoneurons controlling both the intrinsic and extrinsic muscles of nasal region are clustered. This is consistent with our intracellular recordings, which revealed that motoneurons in the dorsolateral and ventrolateral regions of facial motor nucleus are activated but only at the pre-I phase during hypercapnia/acidosis. Besides, pFRG inhibition selectively eliminated active expiration and reduced the simultaneous pre-I components of the BN and ZN activities evoked by hypercapnia/acidosis. This suggests that pFRG neurons control the retraction and dilatation of the nares during high chemical drive. In a previous study, we demonstrated that pFRG

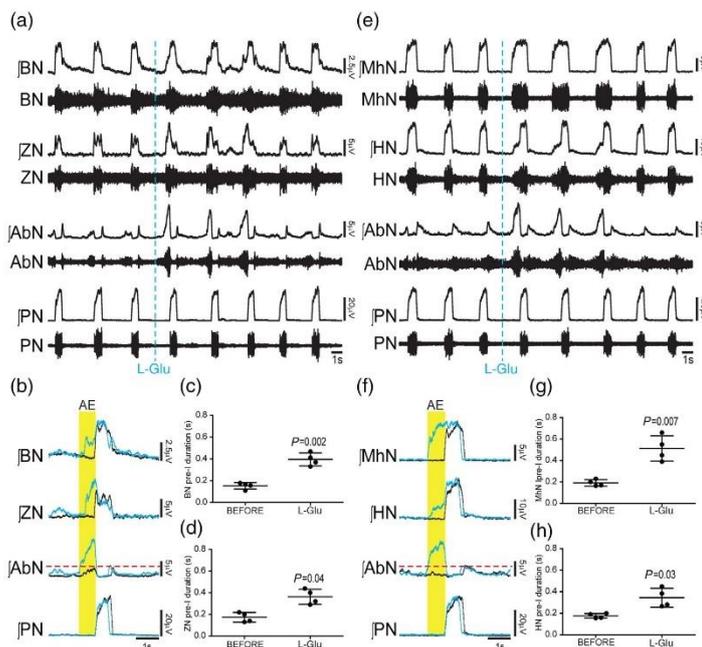


FIGURE 8 pFRG excitation induces active expiration and enhances the pre-I component of nasofacial and oral motor activities. (a) Raw and integrated (I) records of BN, ZN, AbN and PN activities from one *in situ* preparation of rat under normocapnia before and after unilateral microinjection of L-Glu into the pFRG. (b) PN-triggered averages from the same *in situ* preparation of rat under normocapnia before (black) and after (blue) pFRG excitation. Note that pFRG excitation induces active expiration (AE⁺: AbN activity above the levels at stage 1 of expiration – red line) and enhanced the pre-I component of nasofacial motor activities. (c,d) Grouped data comparing the duration of BN (c) and ZN (d) pre-I components under normocapnia before and after pFRG excitation. (e) Raw and integrated (I) records of MhN, HN, AbN and PN activities from one *in situ* preparation of rat under normocapnia before and after unilateral microinjection of L-Glu into pFRG. (f) PN-triggered averages from the same *in situ* preparation of rat under normocapnia before (black) and after (blue) pFRG excitation. Note that pFRG excitation induces AE and enhanced the pre-I component of oral motor activities. (c,d) Grouped data comparing the duration of MhN (c) and HN (d) pre-I components under normocapnia before and after pFRG excitation

expiratory neurons are disinhibited to generate synaptic excitation of the abdominal, hypoglossal and laryngeal motoneurons in rats under hypercapnia/acidosis (de Britto & Moraes, 2017). The Kölliker-Fuse nucleus is likely to be the source of the synaptic inhibition to the pFRG, controlling the incidence and onset timing of active expiration during hypercapnia/acidosis (Barnett et al., 2018; Jenkin, Milsom, & Zoccal, 2017). However, future studies are required to understand the synaptic mechanisms by which high chemical drive/pFRG activation evokes expiratory rhythmic activity in the facial motoneurons and the consequence for nasopharyngeal resistance in rats.

A restriction of lung expansion, airway obstruction or high chemical drive all induce oral breathing associated with jaw movements (Bartlett & St John, 1988; Carlo et al., 1985; Saiki & Matsumoto, 2004; Song & Pae, 2001). Oral breathing is produced by trigeminal motoneurons, which consist of the jaw-opening motoneurons, innervating the anterior digastric and mylohyoid muscles, and the jaw-closing motoneurons innervating the masseter, temporal and

pterygoid muscles (Oka et al., 2013). These motoneurons are organized in clusters. Jaw-opening motoneurons are located in the ventromedial division of the trigeminal motor nucleus in rats (Limwongse & DeSantis, 1977; Mizuno et al., 1975). Our recording from MhN (which innervates the digastric muscle) and our intracellular recordings demonstrated that trigeminal jaw-opening motoneurons receive inputs from the neuronal circuit controlling pre-I and inspiratory phases, which is consistent with several previous studies (Koizumi et al., 1999; Koizumi et al., 2002). High chemical drive, as well as pFRG activation, enhanced the pre-I firing component in these motoneurons and in the MhN, while pFRG pharmacological inhibition eliminated it during hypercapnia/acidosis. There is no evidence yet that the pFRG contains jaw-opening premotor neurons in rats, but they innervate the nucleus of the solitary tract (NTS) (Pagliardini et al., 2011), a well-known jaw-opening premotor region (Oka et al., 2013). Therefore, it is possible that the pFRG neurons activate the trigeminal jaw-opening premotor neurons within the NTS, an issue that deserves further experiments.

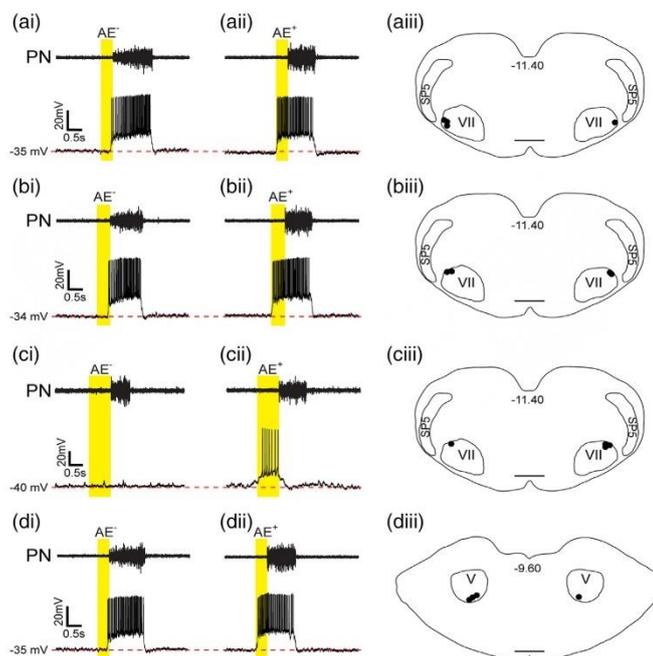


FIGURE 9 Hypercapnia/acidosis enhances the pre-I activity of nasofacial and oral motoneurons. (a) Raw records of PN and intracellular records of an inspiratory modulated facial motoneuron from one *in situ* preparation of rat under normocapnia (ai) and hypercapnia/acidosis (aii). Note the increased firing frequency at the end of stage 2 of expiration evoked by hypercapnia/acidosis. (aiii) Recorded sites of the motoneurons in the dorsolateral section of the facial motor nucleus (VII; 11.40 mm caudal to the bregma) located by the presence of field potentials to ZN stimulation. (b) Raw records of PN and intracellular records of an inspiratory modulated facial motoneuron from one *in situ* preparation of rat under normocapnia (bi) and hypercapnia/acidosis (bii). Note the increased firing frequency at the end of stage 2 of expiration evoked by hypercapnia/acidosis. (biii) Recorded sites of the motoneurons in the dorsolateral section of the VII (11.40 mm caudal to the bregma) located by the presence of field potentials to ZN stimulation. (c) Raw records of PN and intracellular records of a silent facial motoneuron from one *in situ* preparation of rat under normocapnia (ci) and hypercapnia/acidosis (cii). Note that hypercapnia/acidosis evoked action potentials only at the end of stage 2 of expiration. (ciii) Recorded sites of the motoneurons in the dorsolateral section of the VII (11.40 mm caudal to the bregma) also located by the presence of field potentials to ZN stimulation. (d) Raw records of PN and intracellular records of an inspiratory modulated trigeminal motoneuron from one *in situ* preparation of rat under normocapnia (di) and hypercapnia/acidosis (dii). Note that hypercapnia/acidosis increased its firing frequency at the end of stage 2 of expiration. (diii) Recorded sites of the motoneurons in the ventromedial section of the trigeminal motor nucleus (V; 9.60 mm caudal to the bregma) located by the presence of field potentials to MhN stimulation. AE⁺: active expiration. Sp5: spinal trigeminal tract. Scale bars: 1000 μ m

Rhythmic nasofacial and oral motor outflows associated with inspiration (basal) and expiration (active expiration) must involve precise recruitment of muscle groups controlling the airways. We demonstrated that the pFRG is the common source of the pre-I rhythmic signal to several brainstem circuits throughout the facial, trigeminal, hypoglossal and laryngeal motoneurons (Figure 10a,b) and is activated by high chemical drive. These neural pathways may become activated by a variety of conditions such as vigorous exercise (Abraham et al., 2002), anoxia/hypoxia (Abdala et al., 2009; Moraes et al., 2012a), fear-like and anxiogenic behaviours (Homma & Masaoka, 2008) or during airway obstruction (Carlo et al., 1985; Song & Pae, 2001) to improve expiratory airflow. Therefore, the pFRG is more than a rhythmic oscillator for expiratory pump muscles: it also coordinates

nasofacial and oral motor commands that engage muscles controlling airways in rats during active expiration.

COMPETING INTERESTS

None.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.A.B., K.S.M., M.P.S. and D.J.A.M. performed the experiments. A.A.B., J.F.R.P. 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 have read and approved the final version of this manuscript and agree to be accountable for all

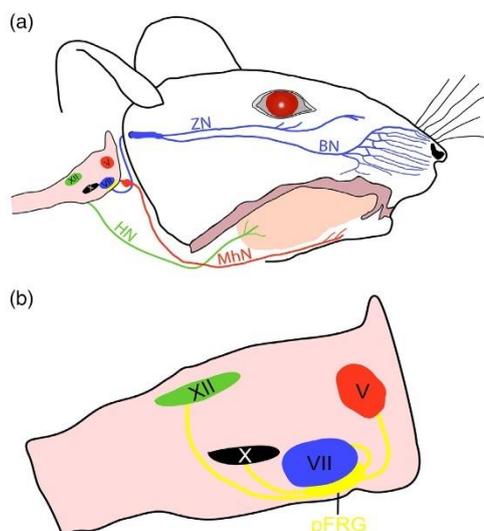


FIGURE 10 Schematic depiction of the proposed neural pathways and mechanisms by which the pFRG regulates nasofacial and oral motor responses to high chemical drive. (a) Parasagittal view of the rat head and brainstem showing the location of the buccal branch of the facial nerve (BN), which innervates the intrinsic muscles of nasal region, and the zygomatic branch of the facial nerve (ZN), which innervates the extrinsic muscles of nasal region originating from the facial motor nucleus (VII). Also shown is the location of the mylohyoid branch of the trigeminal nerve (MhN), which contains jaw-opening motoneurons located in the trigeminal motor nucleus (V), innervating the digastric muscle, as well as the tongue-protusor hypoglossal nerve (HN) originating in the hypoglossal motor nucleus (XII). (b) Magnification of the rat brainstem showing that the pFRG is the common source of the rhythmic signal to several brainstem circuits throughout the facial (VII), trigeminal (V), hypoglossal (XII) and laryngeal (nucleus ambiguus - X) motoneurons for the synchronization of active expiration, nasofacial, oral and laryngeal motor responses

aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. All persons designated as authors qualify for authorship, and all those who qualify for authorship are listed.

ORCID

Karolyne S. Magalhães <https://orcid.org/0000-0001-5755-6147>
 Davi J. A. Moraes <https://orcid.org/0000-0001-6132-0217>

REFERENCES

Abdala, A. P., Rybak, I. A., Smith, J. C., & Paton, J. F. (2009). Abdominal expiratory activity in the rat brainstem-spinal cord in situ: Patterns, origins and implications for respiratory rhythm generation. *Journal of Physiology*, 587, 3539–3559.

- Abraham, K. A., Feingold, H., Fuller, D. D., Jenkins, M., Mateika, J. H., & Fregosi, R. F. (2002). Respiratory-related activation of human abdominal muscles during exercise. *Journal of Physiology*, 541, 653–663.
- Barnett, W. H., Jenkin, S. E. M., Milsom, W. K., Paton, J. F. R., Abdala, A. P., Molkov, Y. I., & Zoccal, D. B. (2018). The Kolliker-Fuse nucleus orchestrates the timing of expiratory abdominal nerve bursting. *Journal of Neurophysiology*, 119, 401–412.
- Bartlett, D., Jr., & St John, W. M. (1988). Influence of lung volume on phrenic, hypoglossal and mylohyoid nerve activities. *Respiration Physiology*, 73, 97–109.
- Berg, R. W., & Kleinfeld, D. (2003). Rhythmic whisking by rat: Retraction as well as protraction of the vibrissae is under active muscular control. *Journal of Neurophysiology*, 89, 104–117.
- Carlo, W. A., Miller, M. J., & Martin, R. J. (1985). Differential response of respiratory muscles to airway occlusion in infants. *Journal of Applied Physiology*, 59, 847–852.
- de Britto, A. A., & Moraes, D. J. (2017). Non-chemosensitive parafacial neurons simultaneously regulate active expiration and airway patency under hypercapnia in rats. *Journal of Physiology*, 595, 2043–2064.
- Del Negro, C. A., Funk, G. D., & Feldman, J. L. (2018). Breathing matters. *Nature Reviews Neuroscience*, 19, 351–367.
- Deschênes, M., Haidarliu, S., Demers, M., Moore, J., Kleinfeld, D., & Ahissar, E. (2015). Muscles involved in naris dilation and nose motion in rat. *Anatomical Record*, 298, 546–553.
- Deschênes, M., Kurnikova, A., Elbaz, M., & Kleinfeld, D. (2016a). Circuits in the ventral medulla that phase-lock motoneurons for coordinated sniffing and whisking. *Neural Plasticity*, 2016, 7493048.
- Deschênes, M., Takatoh, J., Kurnikova, A., Moore, J. D., Demers, M., Elbaz, M., ... Kleinfeld, D. (2016b). Inhibition, not excitation, drives rhythmic whisking. *Neuron*, 90, 374–387.
- Dorfl, J. (1982). The musculature of the mystacial vibrissae of the white mouse. *Journal of Anatomy*, 135, 147–154.
- Dörfl, J. (1985). The innervation of the mystacial region of the white mouse: A topographical study. *Journal of Anatomy*, 142, 173–184.
- Grundy, D. (2015). Principles and standards for reporting animal experiments in *The Journal of Physiology* and *Experimental Physiology*. *Experimental Physiology*, 100, 755–758.
- Haight, J. S., & Cole, P. (1983). The site and function of the nasal valve. *Laryngoscope*, 93(1), 49–55.
- Hill, D. N., Bermejo, R., Zeigler, H. P., & Kleinfeld, D. (2008). Biomechanics of the vibrissa motor plant in rat: Rhythmic whisking consists of triphasic neuromuscular activity. *Journal of Neuroscience*, 28, 3438–3455.
- Hinrichsen, C. F., & Watson, C. D. (1984). The facial nucleus of the rat: Representation of facial muscles revealed by retrograde transport of horseradish peroxidase. *Anatomical Record*, 209, 407–415.
- Homma, I., & Masaoka, Y. (2008). Breathing rhythms and emotions. *Experimental Physiology*, 93, 1011–1021.
- Jenkin, S. E., Milsom, W. K., & Zoccal, D. B. (2017). The Kolliker-Fuse nucleus acts as a timekeeper for late-expiratory abdominal activity. *Neuroscience*, 348, 63–72.
- Kleinfeld, D., Deschênes, M., Wang, F., & Moore, J. D. (2014a). More than a rhythm of life: Breathing as a binder of orofacial sensation. *Nature Neuroscience*, 17, 647–651.
- Kleinfeld, D., Moore, J. D., Wang, F., & Deschênes, M. (2014b). The brainstem oscillator for whisking and the case for breathing as the master clock for orofacial motor actions. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 79, 29–39.
- Koizumi, H., Ishihama, K., Nomura, K., Yamanishi, T., Kogo, M., & Matsuya, T. (2002). Differential discharge patterns of rhythmical activity in trigeminal motoneurons during fictive mastication and respiration in vitro. *Brain Research Bulletin*, 58, 129–133.
- Koizumi, H., Nomura, K., Ishihama, K., Kogo, M., & Matsuya, T. (1999). Temporal patterns of trigeminal respiratory activity in rat brainstem-spinal cord in vitro. *Neuroreport*, 10, 2609–2613.

- Leirao, I. P., Silva, C. A., Jr, Gargaglioni, L. H., & da Silva, G. S. F. (2017). Hypercapnia-induced active expiration increases in sleep and enhances ventilation in unanaesthetized rats. *Journal of Physiology*, *596*, 3271–3283.
- Leiter, J. C., & St -John, W. M. (2004). Phrenic, vagal and hypoglossal activities in rat: Pre-inspiratory, inspiratory, expiratory components. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, *142*, 115–126.
- Limwongse, V., & DeSantis, M. (1977). Cell body locations and axonal pathways of neurons innervating muscles of mastication in the rat. *American Journal of Anatomy*, *149*, 477–488.
- Lowe, A. A., & Sessle, B. J. (1973). Tongue activity during respiration, jaw opening, and swallowing in cat. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *51*, 1009–1011.
- Magalhaes, K. S., Spiller, P. F., da Silva, M. P., Kuntze, L. B., Paton, J. F. R., Machado, B. H., & Moraes, D. J. A. (2018). Locus Coeruleus as a vigilance centre for active inspiration and expiration in rats. *Scientific Reports*, *8*, 15654.
- McElvain, L. E., Friedman, B., Karten, H. J., Svoboda, K., Wang, F., Deschênes, M., & Kleinfeld, D. (2018). Circuits in the rodent brainstem that control whisking in concert with other orofacial motor actions. *Neuroscience*, *368*, 152–170.
- Mizuno, N., Konishi, A., & Sato, M. (1975). Localization of masticatory motoneurons in the cat and rat by means of retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *Journal of Comparative Neurology*, *164*, 105–115.
- Moore, J. D., Deschênes, M., Furuta, T., Huber, D., Smear, M. C., Demers, M., & Kleinfeld, D. (2013). Hierarchy of orofacial rhythms revealed through whisking and breathing. *Nature*, *497*, 205–210.
- Moore, J. D., Kleinfeld, D., & Wang, F. (2014). How the brainstem controls orofacial behaviors comprised of rhythmic actions. *Trends in Neuroscience*, *37*, 370–380.
- Moraes, D. J., Dias, M. B., Cavalcanti-Kwiatkoski, R., Machado, B. H., & Zoccal, D. B. (2012a). Contribution of the retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory region to the expiratory-sympathetic coupling in response to peripheral chemoreflex in rats. *Journal of Neurophysiology*, *108*, 882–890.
- Moraes, D. J., Machado, B. H., & Paton, J. F. (2015). Carotid body overactivity induces respiratory neurone channelopathy contributing to neurogenic hypertension. *Journal of Physiology*, *593*, 3055–3063.
- Moraes, D. J., Zoccal, D. B., & Machado, B. H. (2012b). Sympathoexcitation during chemoreflex active expiration is mediated by L-glutamate in the RVLM/Bötzing complex of rats. *Journal of Neurophysiology*, *108*, 610–623.
- Oka, A., Yamamoto, M., Takeda, R., Ohara, H., Sato, F., Akhter, F., ... Yoshida, A. (2013). Jaw-opening and -closing premotoneurons in the nucleus of the solitary tract making contacts with laryngeal and pharyngeal afferent terminals in rats. *Brain Research*, *1540*, 48–63.
- Pagliardini, S., Janczewski, W. A., Tan, W., Dickson, C. T., Deisseroth, K., & Feldman, J. L. (2011). Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult anesthetized rats. *Journal of Neuroscience*, *31*, 2895–2905.
- Paton, J. F. (1996). A working heart-brainstem preparation of the mouse. *Journal of Neuroscience Methods*, *65*, 63–68.
- Paton, J. F., & Dutschmann, M. (2002). Central control of upper airway resistance regulating respiratory airflow in mammals. *Journal of Anatomy*, *201*, 319–323.
- Paxinos, G., & Watson, C. (1997). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. London: Academic Press. Third edition.
- Pisanski, A., & Pagliardini, S. (2019). The parafacial respiratory group and the control of active expiration. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, *265*, 153–160.
- Richter, D. W., & Smith, J. C. (2014). Respiratory rhythm generation in vivo. *Physiology*, *29*, 58–71.
- Saiki, C., & Matsumoto, S. (2004). Digastric muscle activities in anoxic infant rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *82*, 960–968.
- Sawczuk, A., & Mosier, K. M. (2001). Neural control of tongue movement with respect to respiration and swallowing. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, *12*, 18–37.
- Sherrey, J. H., & Megirian, D. (1977). State dependence of upper airway respiratory motoneurons: Functions of the cricothyroid and nasolabial muscles of the unanesthetized rat. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, *43*, 218–228.
- Smith, J. C., Abdala, A. P., Koizumi, H., Rybak, I. A., & Paton, J. F. (2007). Spatial and functional architecture of the mammalian brain stem respiratory network: A hierarchy of three oscillatory mechanisms. *Journal of Neurophysiology*, *98*, 3370–3387.
- Smith, J. C., Ellenberger, H. H., Ballanyi, K., Richter, D. W., & Feldman, J. L. (1991). Pre-Bötzing complex: A brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science*, *254*, 726–729.
- Song, H. G., & Pae, E. K. (2001). Changes in orofacial muscle activity in response to changes in respiratory resistance. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, *119*, 436–442.
- St-John, W. M., Rudkin, A. H., & Leiter, J. C. (2010). Mylohyoid discharge of the in situ rat: A probe of pontile respiratory activities in eupnea and gasping. *Journal of Applied Physiology*, *108*, 614–620.
- Takatoh, J., Nelson, A., Zhou, X., Bolton, M. M., Ehlers, M. D., Arenkiel, B. R., ... Wang, F. (2013). New modules are added to vibrissal premotor circuitry with the emergence of exploratory whisking. *Neuron*, *77*, 346–360.
- Watson, C. R., Sakai, S., & Armstrong, W. (1982). Organization of the facial nucleus in the rat. *Brain Behavior and Evolution*, *20*, 19–28.

How to cite this article: de Britto AA, Magalhães KS, da Silva MP, Paton JFR, Moraes DJA. Active expiratory oscillator regulates nasofacial and oral motor activities in rats. *Experimental Physiology*. 2020;105:379–392. <https://doi.org/10.1113/EP088046>

8.3. Artigo publicado na revista *The Journal of Physiology* (2021)

J. Physiol 599.6 (2021) pp 1917–1932

1917

Chronic intermittent hypoxia increases excitability and synaptic excitation of protrudor and retractor hypoglossal motoneurons

Melina P. da Silva , Karolyne S. Magalhães , Daniel P. de Souza and Davi J. A. Moraes 

Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Edited by: Harold Schultz & Gregory Funk

Key points

- Dysfunctions in the hypoglossal control of tongue extrinsic muscles are implicated in obstructive sleep apnoea (OSA) syndrome.
- Chronic intermittent hypoxia (CIH), an important feature of OSA syndrome, produces deleterious effects on the motor control of oropharyngeal resistance, but whether the hypoglossal motoneurons innervating the tongue extrinsic muscles are affected by CIH is unknown.
- We show that CIH enhanced the respiratory-related activity of rat hypoglossal nerve innervating the protrudor and retractor tongue extrinsic muscles.
- Intracellular recordings revealed increases in respiratory-related firing frequency and synaptic excitation of inspiratory protrudor and retractor hypoglossal motoneurons after CIH.
- CIH also increased their intrinsic excitability, depolarised resting membrane potential and reduced K^+ -dominated leak conductance.
- CIH affected the breathing-related synaptic control and intrinsic electrophysiological properties of protrudor and retractor hypoglossal motoneurons to optimise the neural control of oropharyngeal function.

Abstract Inspiratory-related tongue movements and oropharyngeal motor actions are controlled mainly by the protrudor and retractor extrinsic tongue muscles, which are innervated by the hypoglossal motoneurons. Chronic intermittent hypoxia (CIH), an important feature of obstructive sleep apnoea syndrome, produces detrimental effects on the contractile function of the tongue extrinsic muscles and the medullary inspiratory network of rodents. However, the impact of the CIH on the electrophysiological properties of protrudor and retractor hypoglossal motoneurons has not been described before. Using nerves and intracellular recordings in *in situ* preparation of rats (5 weeks old), we tested the hypothesis that CIH (FiO_2 of 0.06, SaO_2 74%, during 30–40 s, every 9 min, 8 h/day for 10 days) increases the intrinsic excitability of protrudor and retractor motoneurons from the hypoglossal motor nucleus of rats. Recordings of hypoglossal nerve, before its bifurcation to innervate the tongue protrudor and retractor muscles, revealed that CIH

Melina P. da Silva is a Young Investigator at the School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil. She holds her PhD in Physiology at the same institution (2015). Her research is focused on Physiology, with emphasis on Cellular Biophysics and Neurophysiology. **Karolyne S. Magalhães** is a PhD Student in Physiology at the School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil. She holds her MSc degree in Physiology at the same institution (2019). She is studying the central generation of the respiratory pattern and the sensory control of breathing in mammals.



Melina P. da Silva and Karolyne S. Magalhães are joint first authors.

enhances its pre-inspiratory, simultaneously with the presence of active expiration, and inspiratory activities. These changes were mediated by increases in the respiratory-related firing frequency and synaptic excitation of inspiratory protruder and retractor hypoglossal motoneurons. Besides, CIH increases their intrinsic excitability and depolarises resting membrane potential by reducing a K^+ -dominated leak conductance. In conclusion, CIH enhances the respiratory-related neural control of oropharyngeal function of rats by increasing the synaptic excitation, intrinsic excitability, and reducing leak conductance in both protruder and retractor hypoglossal motoneurons. We propose that these network and cellular changes are important to optimise the oropharyngeal resistance in conditions related to intermittent hypoxia.

(Received 15 September 2020; accepted after revision 11 January 2021; first published online 28 January 2021)

Corresponding author D. J. A. Moraes: Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil. Email: davimoraes@fmrp.usp.br

Introduction

Breathing is a highly coordinated motor activity of the rib cage, abdominal and upper airway muscles (Del Negro *et al.* 2018). The brainstem respiratory neurones determine this coordinated motor activity by transmitting both the respiratory rhythm and pattern to medullary and spinal motoneurons (Smith *et al.* 2013). The control of upper airway resistance by respiratory motoneurons occurs during the three phases of the respiratory pattern: inspiration, post-inspiration or expiration phase 1 and expiration phase 2 (Richter, 1982). For example, the genioglossus, an extrinsic tongue muscle, whose primary functions are protrusion and depression of the tongue, decreases the oropharyngeal resistance (Wang *et al.* 2018), while the abductor laryngeal muscles produce glottal dilatation (Harding *et al.* 1980; Samson *et al.* 2007), both facilitating the airflow to the lungs during inspiration. During post-inspiration, the genioglossus muscle relaxes touching the soft palate, and causes an increase in oropharyngeal resistance (Fregosi & Fuller, 1997). The latter coincides with a partial glottal constriction determined by the adductor muscles of the larynx (Paton & Dutschmann, 2002; Wang *et al.* 2018). These increases in oropharyngeal and laryngeal resistance are essential to control the expiratory airflow, improving gas exchange, and to maintain sufficient residual volume to prevent alveolar collapse (Shiba *et al.* 1999; Paton & Dutschmann, 2002).

Obstructive sleep apnoea (OSA) is a syndrome characterised by recurrent collapse of the upper airway and repetitive hypoxic episodes in humans (Malhotra & White, 2002; Dempsey *et al.* 2010; Vicente *et al.* 2016; Labarca *et al.* 2020). Several changes in the neural control and function of upper airway muscles have been reported in OSA patients (Sériès *et al.* 1995; Saboisky *et al.* 2007, 2010; Ramchandren *et al.* 2010; Stål & Johansson, 2012; Cori *et al.* 2018), including its hyperactivity during wakefulness to avoid additional airway occlusions (Suratt *et al.* 1988; Mezzanotte *et al.* 1992; Katz & White, 2003).

Chronic intermittent hypoxia (CIH) is an important feature of the OSA syndrome and produces several effects on the motor control of oropharyngeal resistance in rodents. Studies demonstrated that CIH has negative effects on the contractile function of upper airway dilator muscle (McGuire *et al.* 2002; Bradford *et al.* 2005), as well as on the motor control of oropharyngeal resistance (O'Halloran *et al.* 2002; Stettner *et al.* 2012). Therefore, CIH induces several changes in the upper airway, which are postulated to contribute to the obstructive events and pathophysiological manifestations of OSA (Bradford *et al.* 2005).

Respiratory-related tongue movements are controlled mainly by the activities of the tongue protruder (genioglossus) and retractor (hyoglossus and styloglossus) muscles innervated by the hypoglossal nerve (HN) (Fregosi & Fuller, 1997; Fuller *et al.* 1998; Powell *et al.* 2014), which are axons of motoneurons located in the hypoglossal motor nucleus (HMN; Sawczuk & Mosier, 2001; Fregosi, 2011). These motoneurons are controlled by respiratory pre-motor neurones in the intermediate medullary reticular formation (Peever *et al.* 2002; Revill *et al.* 2015) and the neurones responsible for the inspiratory rhythm generation in the pre-Bötzinger complex (pre-BötC) (Koizumi *et al.* 2008; Garcia *et al.* 2016). In this regard, inspiratory-related activities in the tongue protruder and retractor muscles (Fuller *et al.* 1998; Bailey *et al.* 2001), as well as in motoneurons innervating these extrinsic muscles have been reported (Peever *et al.* 2001). Previous studies demonstrated that CIH has detrimental effects on the pre-BötC inspiratory network function accompanied by failed inspiratory excitation of the HMN in neonatal animals (Garcia *et al.* 2016). Reduced responsiveness to glutamate excitation of the hypoglossal motoneurons has also been described following CIH (Veasey *et al.* 2004). However, the impact of the CIH on the electrophysiological properties of the hypoglossal motoneurons has not been described before. The changes in their excitability might be involved in

the central mechanisms underlying the upper airway muscle hyperactivity during wakefulness observed in OSA patients. In the present study, the experiments were undertaken to test the hypothesis that CIH increases the intrinsic excitability of protruder and retractor inspiratory motoneurons in the HMN of rats. We use an *in situ* preparation of rats that allows the intracellular recordings of identified protruder and retractor hypoglossal motoneurons simultaneously with respiratory motor nerve recordings (Paton, 1996).

Methods

Ethical approval

All experiments complied with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* by the Brazilian National Council for Animal Experimentation Control and with the principles and regulations of Journal policy (Grundy, 2015). The experiments were approved by the Institutional Ethics Committee for Animal Experimentation of the School of Medicine of Ribeirão Preto (protocol # 060/2019). All experiments were performed on male Wistar Hanover rats (100–130 g; 5 weeks old) from the Animal Care Facility of the University of São Paulo, Campus of Ribeirão Preto, Brazil. The rats were housed in standard conditions ($23 \pm 2^\circ\text{C}$; 12 h–12 h dark–light cycle) with *ad libitum* access to standard rat chow and water.

Chronic intermittent hypoxia

The rats from control and CIH groups were placed into collective cages and always maintained at the bottom of Plexiglas chambers (210 l) equipped with gas injectors and O_2 , CO_2 , humidity and temperature sensors. The rats from the CIH group were exposed to 5 min of normoxia (fraction of inspired O_2 (FiO_2) = 0.21) followed by 4 min of N_2 (100%) injection to reduce the measured FiO_2 to 0.06, remaining at this level no longer than 30–40 s. This level of FiO_2 was externally validated daily with an O_2 analyser (ML206; ADInstruments, Bella Vista, Australia) positioned at the bottom of the Plexiglas chamber. After the period of hypoxia, O_2 was injected at a rate to return the FiO_2 to 0.21 within 15 s. The rats were exposed to this episode of hypoxia every 9 min. These 9 min cycles were repeated 8 h a day for 10 days. Gas injection cycles in the chambers were alternated by solenoid valves connected to O_2 and N_2 cylinders (Maxiair, Ribeirão Preto, SP, Brazil) and controlled by a computerised system (Oxycycler; Biospherix, Redfield, NY, USA). The control group's rats were maintained in constant normoxia for 10 days, as described in previous studies (Moraes *et al.* 2013; Moraes & Machado, 2015).

Measurements of haemoglobin saturation in arterial blood

The femoral artery was catheterised 24 h before the measurement of haemoglobin saturation in arterial blood (SaO_2) during normoxic (FiO_2 of 0.21) and hypoxic (FiO_2 of 0.06) episodes. The rats were deeply anaesthetised with a ketamine–xylazine mixture (75 and 5 mg/kg *i.p.*, respectively; Agener União, São Paulo, SP, Brazil) and the depth of anaesthesia was verified by tail pinching and absence of the withdrawal reflex responses. A polyethylene catheter was inserted into the femoral artery and directed to the abdominal aorta (PE-10 connected to PE-50 tubing; Clay Adams, Parsippany, NJ, USA) to collect arterial blood samples. The catheter was housed subcutaneously and externalised through the skin at the back of the rats' necks. After surgery, the rats received a prophylactic dose of analgesic and antipyretic flunixin (1 mg/kg *i.m.*, Banamine; Schering-Plow, São Paulo, SP, Brazil). One day after the surgery, the rats were accommodated inside the Plexiglas chamber, as described above, and the arterial catheter connected to an additional polyethylene tube (PE-50) as an extension to outside the chamber. Two samples of arterial blood (100 μl each) were collected to measure the SaO_2 (Cobas b121; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) in each rat (one during normoxia and one during hypoxia) using the same hypoxic paradigm described above. At the end of the measurements, the rats were killed with an overdose of anaesthetic (ketamine–xylazine mixture, 150 and 10 mg/kg *i.p.*, respectively) and the death was confirmed by means of the heartbeat cessation.

Dorsal approach of *in situ* brainstem preparation of rats

Perfusion solution. The perfusion solution was composed of (in mM): 125 NaCl, 24 NaHCO_3 , 3 KCl, 2.5 CaCl_2 , 1.25 MgSO_4 , 1.25 KH_2PO_4 and 10 glucose. Other substances, such as an oncotic agent (polyethylene glycol, Mr 16.000–24.000, 1.25%; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), a vasoconstrictor (vasopressin, 4 μM ; Sigma-Aldrich) and a neuromuscular blocker (vecuronium bromide 3–4 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP, Brazil) were added to the perfusion solution.

Surgical procedure. At the 11th day, the animals from control and CIH groups were prepared for the dorsal approach of *in situ* brainstem preparation (Paton, 1996). The animals were deeply anaesthetised with halothane (5%; AstraZeneca do Brasil Ltda, Cotia, SP, Brazil) until withdrawal reflexes to noxious pinching of the paw were absent. The animals were transected

caudal to the diaphragm, exsanguinated and had their head and thorax submerged in a cooled perfusion solution (4°C). Next, the animals were decerebrated immediately at the precollicular level, rendering the preparation insentient, and skinned. The dorsal medulla was exposed for motoneurone recordings in the HMN. After these procedures, all preparations were transferred to a recording chamber and the descending aorta cannulated and perfused retrogradely with the perfusion solution using a peristaltic pump (502S; Watson-Marlow, Falmouth, UK) at a flow of 21–25 ml/min. The perfusate was gassed with 5% CO₂ and 95% O₂, warmed to 31°C and filtered (22 µm of nylon mesh pore size; Millipore, Burlington, MA, USA). At the end of each experimental protocol, the rats were killed by turning off the peristaltic pump.

Electrophysiological data recording and analyses. The motor nerve activities were recorded using bipolar suction glass electrodes fixed on 3D micromanipulators (YOU-1; Narishige, Setagaya, Japan). The superior laryngeal nerve (SLN) was dissected at the cervical level, while the HN was dissected before its bifurcation into medial and lateral branches (McClung & Goldberg, 2000) and their efferent activities recorded. The abdominal nerve (AbN) was isolated at the thoracic level (T12) and cut distally for recording. Left phrenic nerve (PN) activity was also recorded. Respiratory motor nerves were recorded (1700 amplifier; A-M Systems, Sequim, WA, USA) in absolute units (µV).

Blind whole-cell patch-clamp recordings were performed to study the effects of CIH on membrane potential trajectories, firing frequency, intrinsic electrophysiological properties, spontaneous excitatory post-synaptic currents (sEPSCs) and leak currents of motoneurons located in the HMN. Electrodes (3.5–4.5 MΩ) were filled with a solution containing (in mM): 130 potassium gluconate, 10 KCl, 0.3 CaCl₂, 1.0 MgCl₂, 10 Hepes, 1.0 EGTA, 2.0 Na-ATP and 0.25 Na-GTP; biocytin 0.2% (Molecular Probes, Grand Island, NY, USA); pH 7.4; osmolality 290–295 mosmol/kg H₂O). Electrodes were mounted on a micromanipulator (PatchStar; Scientifica, Uckfield, UK) and positioned onto the dorsal medullary surface under visual control (microscope; Seiler, St Louis, MO, USA). The tongue protruder motoneurons were mapped by searching for antidromic field potentials following stimulation of the medial branch of HN (5–10 V, 1 Hz, 0.2 ms pulse width), while retractor motoneurons were mapped by HN lateral branch stimulation (Fuller *et al.* 1998). Once the inspiratory-related oscillations in the seal test were observed, voltage- and current-clamp recordings (Axopatch-200B integrating amplifier; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) were performed (Fig. 1).

sEPSCs were measured at –60 mV and isolated by locally applying 30 µM of the GABA_A and 1 µM of the glycinergic receptor antagonists picrotoxin (Sigma-Aldrich) and strychnine (Sigma-Aldrich), respectively. Leak currents were evaluated using slow voltage ramp (30 mV/s; –130 to –70 mV) and isolated pharmacologically using blockers of voltage-activated Ca²⁺ (CdCl₂ – 200 µM; Sigma-Aldrich) and K⁺ channels (tetraethyl ammonium chloride; TEA; 10 mM; Sigma-Aldrich, 4-aminopyridine; 4-AP; 5 mM; Sigma-Aldrich), as well as hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated channels (ZD7288; 40 µM; Tocris

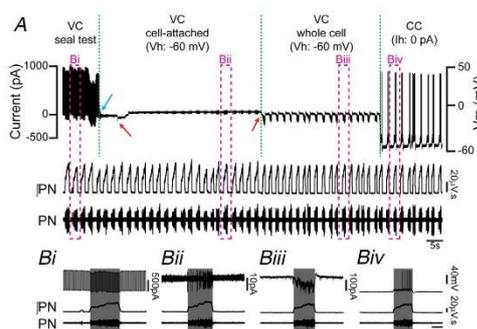


Figure 1. Electrophysiological approach to the identification of inspiratory hypoglossal motoneurons using whole-cell patch-clamp in *in situ* preparation of rats

A, whole-cell voltage- (VC) and current-clamp (CC) recordings of an inspiratory hypoglossal motoneurone, as well as the integrated (*I*) and raw records of phrenic nerve (PN) activities were obtained in one *in situ* preparation from a control rat. During electrode placement and cell approach, positive pressure was applied to the tip of the electrode. The electrode resistance was monitored continuously by applying 5 mV voltage square pulses to the electrode, while the current was measured in VC (seal test). Once contact with the cell was made, electrode resistance spontaneously increases and the positive pressure was released (blue arrow), forming the cell-attached configuration. The seal quality was improved by applying a negative (–60 mV) voltage holding (Vh). Application of negative pressure to the electrode (left red arrow) resulted in the formation of a gigaseal. At this point, changes in the electrical field, produced by cell action potentials, were observed. A brief negative pressure application (right red arrow) ruptured the cell membrane under the electrode and provided a low-resistance access to the cell. This also resulted in the establishment of whole-cell configuration, allowing the recordings of synaptic currents. The measurements of the cell's membrane potential (*V_m* in mV) and action potentials were also obtained in CC at current holding (Ih) 0 pA. The motoneurone was easily identified as inspiratory on the basis of oscillations in the pipette resistance during the cell approach (B*i*), the changes in the electrical field produced by action potentials in cell-attached configuration (B*ii*), as well as the synaptic currents in VC (B*iii*) and membrane potential depolarisation followed by action potentials in CC recordings (B*iv*) during inspiration (grey boxes), simultaneously with PN activity. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Bioscience, Bristol, UK) and inwardly rectifying K^+ channels ($BaCl_2$ – 200 μM ; Sigma-Aldrich). All drugs were added to the perfusion solution. A holding potential at -60 mV was applied to evaluate the effects a high concentration of $BaCl_2$ (3 mM) on the leak currents. To evaluate the motoneurons' intrinsic excitability, we evoked repetitive spiking with a series of depolarising current pulses (2 s) of increasing amplitude (50 pA to 300 pA, in increments of 50 pA), regardless of the values of the motoneurons' resting membrane potential (RMP). Hyperpolarising currents pulses (-50 pA and -100 pA; 2 s) were applied to analyse the motoneurons' input resistance (R_i). The intrinsic electrophysiological properties and leak currents were evaluated in the presence of blockers of fast synaptic transmission in the perfusion solution (picrotoxin (30 μM), strychnine (1 μM), 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-dione (10 μM ; Sigma-Aldrich) and d-2-amino-5-phosphonovalerate (20 μM ; Sigma-Aldrich)). All signals were amplified, filtered (nerves: 300 Hz – 5 KHz; motoneurons: 2 KHz) and acquired (nerves: 5 KHz; motoneurons: 10 KHz) with an A/D converter (Digidata 1440A; Molecular Devices), using pClamp acquisition software (Molecular Devices).

The motor nerve analyses were made on rectified and integrated signals (time constant of 50 ms) using 5 min of recordings. To analyse the pattern of respiratory nerves, cycle-triggered averages were generated for AbN, SLN and HN, using the PN as the trigger or reference point (de Britto & Moraes, 2017). The PN activity allowed us to evaluate its frequency (respiratory frequency) and duration (time of inspiration). The intervals between PN bursts determined the time of expiration. The time of expiration was also split into two phases based on the SLN activity: post-inspiration (SLN activity immediately after inspiration until its silent period) and expiration phase 2 (the silent period of SLN activity until the inspiratory PN activity). The duration of pre-inspiratory activities of the SLN and HN were analysed in relation to the beginning of PN activity. The changes in the PN and HN inspiratory amplitude were expressed in μV . Active expiration was determined when AbN activity at the end of expiration phase 2 was higher than its activity during post-inspiration.

The frequency (Hz) and amplitude (pA) of sEPSCs were also averaged over 5 min of recordings and analysed during inspiration (simultaneously with the PN activity) and later in expiration (pre-inspiratory component; in relation to the beginning of PN activity). Membrane leak conductance (G_{leak}) was calculated by linear regression to the slope of the essentially linear region of the membrane current–voltage relationship (-110 mV to -80 mV) in the slow voltage ramp protocol. K^+ equilibrium potential (E_{K^+}) was calculated from the Nernst equation (HILLE, 2001) (91.59 mV; $[K^+]_{extracellular}$: 4.25 mM; $[K^+]_{intracellular}$: 140 mM). The E_{K^+} was compared

with the membrane voltage at the intersection of the current–voltage relationship to assess whether the reversal potential of the leak currents was consistent with E_{K^+} . In the experiments using high concentration of $BaCl_2$, the holding currents (-60 mV) and G_{leak} ($G = \text{current/voltage}$) were averaged per minute. We subtracted the average of the holding currents and G_{leak} recorded prior to the perfusion of the high concentration of $BaCl_2$ from those recorded 15 min after the perfusion. The motoneurone firing frequency was averaged during 5 min of recordings. The membrane potential (V_m) values at expiration were also averaged during 5 min of recording, as well as the RMP after blocking fast synaptic transmission. The R_i was calculated by linear regression applied to the linear portion of the voltage–current relationship obtained in response to different levels of negative current injections. The excitability was determined by the relationship between positive current injections and the numbers of evoked action potentials. A liquid junction potential of -15 mV was corrected offline. The data were analysed using Clampfit (Molecular Devices) and Origin (OriginLab; Northampton, MA, USA) software.

Histology and immunofluorescence

At the end of the electrophysiological recordings, the brainstems were removed and fixed in 4% formaldehyde (Sigma-Aldrich) for 24 h. Next, the brainstems were submerged in sucrose solution (30%) for 2 days. Coronal sections (50 μm thick) of the medulla were blocked and permeabilised in phosphate-buffered saline (PBS; 0.1 M), containing 10% normal horse serum (Sigma-Aldrich) and 0.1% of Triton X-100 for 1 h at room temperature. After three PBS washes, the sections were incubated in primary antibody goat anticholine acetyltransferase (Chat; 1:250; Millipore) for 24 h at 4°C. After three PBS washes, the sections were incubated in secondary antibodies Alexa 647-conjugated streptavidin (1:1000; Molecular Probes) and Alexa 488-conjugated mouse anti-goat (1:500; Molecular Probes) for 4 h at room temperature. After three PBS washes, the sections were mounted on Fluoromount (Sigma-Aldrich). The images were captured on a Leica TCS SP5 (Buffalo Grove, IL, USA) confocal microscope equipped with 488 and 633 nm lasers and tuneable emission wavelength detection.

Statistical analyses

The results are presented as means \pm SD. Distributions of data were tested using the Shapiro–Wilk normality test. The data were compared using Student's paired t test, Student's unpaired t test, the unpaired non-parametric Mann–Whitney test (when a Gaussian distribution could not be assumed) or two-way ANOVA with Bonferroni *post*

hoc test (GraphPad Prism 8, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Results

Initially, we evaluated the impact of the hypoxic paradigm on the oxygen saturation of rats ($n = 6$). By analysing the samples from the arterial blood, we observed that the applied hypoxic paradigm produced a significant reduction ($P = 0.0006$; paired Student's t test) in the SaO_2 of rats from $90.64 \pm 2\%$ (FiO_2 of 0.21) to $74.56 \pm 3.75\%$ (FiO_2 of 0.06).

CIH enhances the respiratory-related oropharyngeal motor activity

We next investigated the effects of CIH on the three-phase respiratory pattern, with emphasis on the oropharyngeal and laryngeal motor activities. Figure 2A–2B shows integrated and raw records of SLN, HN, AbN and PN activities of *in situ* preparations from control and CIH rats, respectively. The PN-triggered averages of the recorded nerves show that in control rats ($n = 6$) the beginning of the SLN and HN activities occurred a few milliseconds before the inspiratory PN activity, characterising the pre-inspiratory components (Fig. 2C). Both nerves also exhibited a burst of inspiratory activity concomitant with PN. In CIH rats ($n = 8$), the duration of SLN (0.61 ± 0.09 vs. 0.22 ± 0.13 s; $P < 0.0001$) and HN (0.66 ± 0.1 vs. 0.3 ± 0.13 s; $P = 0.0001$) pre-inspiratory activities increased, occurring together with the AbN active expiration at the end expiration phase 2 (Figs 2C–2D and 3A–3B). The HN inspiratory activity was also enhanced in CIH rats (9.81 ± 1.7 vs. $6.75 \pm 1.19 \mu\text{V}$; $P = 0.002$; unpaired Student's t test; Fig. 2A–2D). CIH did not alter the respiratory frequency (0.19 ± 0.01 vs. 0.18 ± 0.02 Hz) and PN amplitude (44.25 ± 5.15 vs. $47.03 \pm 5.62 \mu\text{V}$; unpaired Student's t test), but reduced time of inspiration (0.77 ± 0.12 vs. 1.49 ± 0.22 s; $P = 0.0007$) and increased time of expiration (4.02 ± 0.38 vs. 3.54 ± 0.42 s; $P = 0.04$; Figs 2A–2D; Figs 3C–3D). In addition, CIH reduced the duration of post-inspiration (2.69 ± 0.24 vs. 3.22 ± 0.54 s; $P = 0.02$), but increased expiration phase 2 duration (1.28 ± 0.3 vs. 0.26 ± 0.09 s; $P = 0.0007$; Figs 2A–2D and 3E–3F).

CIH enhances the respiratory-related protruder and retractor hypoglossal motoneurone activities

Whole-cell current-clamp recordings were performed in 33 inspiratory-modulated motoneurons of the HMN from another group of 15 control (16 motoneurons) and 15 CIH (17 motoneurons) rats. To be characterised as hypoglossal motoneurons, the cells should fulfil the

following requirements: (a) antidromic excitation from the ipsilateral HN stimulation (either the medial or lateral branches); and (b) the presence of Chat protein (Figs 4A–4Ciii and 5A–5Ciii). To examine whether CIH affects, to the same extent, the protruder and retractor hypoglossal motoneurons, we compared their electrophysiological properties between control and CIH rats. Consistent with previous studies (McClung & Goldberg, 1999; Dergacheva *et al.* 2020), the retractor motoneurons were located in the dorsal region of HMN, whereas protruders were located in the ventrolateral region (Figs 4A and 5Aiii). In most cases, it was also possible to observe the axons of the protruder and retractor recorded motoneurons in the roots of the HN (Figs 4A and 5Ci–5Ciii). The recorded inspiratory motoneurons from control rats showed initial depolarisation and action potentials later at expiration (pre-inspiratory component), with maximal activity during inspiration (Fig. 6Ai).

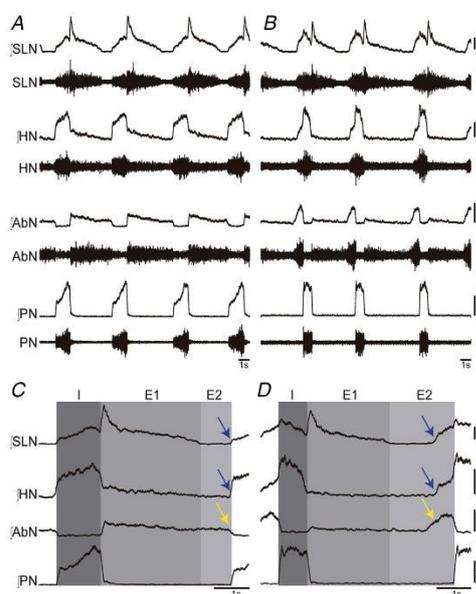


Figure 2. Effects of chronic intermittent hypoxia on the respiratory pattern of rats

Integrated (*I*) and raw records of superior laryngeal nerve (SLN), hypoglossal nerve (HN), abdominal nerve (AbN) and phrenic nerve (PN) activities of *in situ* preparations from control (A) and chronic intermittent hypoxia (CIH) (B) rats. PN-triggered averages of SLN, HN and AbN activities from control (C) and CIH (D) rats. Note the enhancement of HN inspiratory activity, the exaggerated pre-inspiratory components in SLN and HN (blue arrows) and the presence of AbN active expiration (yellow arrow) in CIH rats. I: inspiration; E1: post-inspiration; E2: expiration phase 2.

CIH produced an anticipatory onset of depolarisation and generation of action potentials (pre-inspiratory component), which resulted in increases of firing frequency (75.51 ± 10.16 vs. 51.76 ± 3.2 Hz; $P < 0.0001$; Fig. 6*Ai–6Bi*). In addition, CIH depolarised the inspiratory-modulated motoneurons during expiration (-51.54 ± 0.94 vs. -56.05 ± 0.79 mV; $P < 0.0001$; Fig. 6*Ai–6Aii*, 6*B* and 6*C*). It is worth mentioning that CIH affected similarly both the protruder (eight motoneurons from eight control, and nine motoneurons from eight

CIH rats) and retractor (eight motoneurons from eight control, and eight motoneurons from eight CIH rats) hypoglossal motoneurons regarding their firing frequency (protruder: 74.03 ± 11.23 vs. 52.22 ± 2.75 Hz, $P < 0.0001$, unpaired Student's *t* test; retractor: 77.18 ± 9.25 vs. 51.31 ± 3.73 Hz, $P < 0.0001$, unpaired Student's *t* test) and Vm at expiration (protruder: -51.64 ± 1.07 vs. -56.13 ± 1.05 mV, $P < 0.0001$, unpaired Student's *t* test; retractor: -51.44 ± 0.83 vs. -55.98 ± 0.47 mV, $P < 0.0001$, unpaired Student's *t* test).

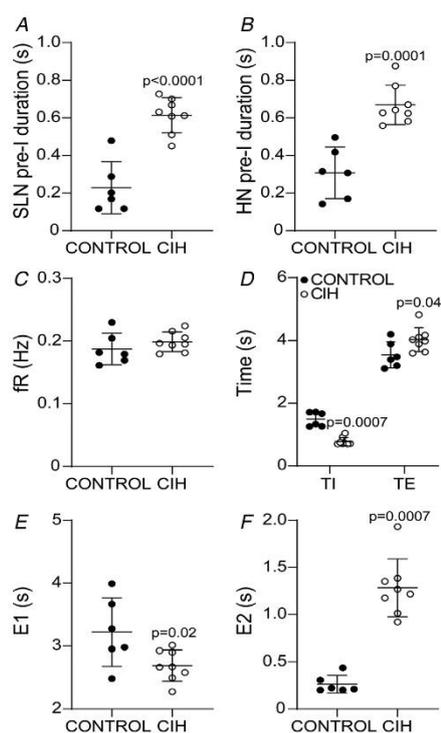


Figure 3. Grouped data of the effects of chronic intermittent hypoxia on the respiratory pattern of rats

Grouped data showing the duration of superior laryngeal nerve (SLN) (A; unpaired Student's *t* test) and hypoglossal nerve (HN) (B; unpaired Student's *t* test) pre-inspiratory (pre-I) components, respiratory frequency (fR; C; unpaired Student's *t* test), time of inspiration (TI) and time of expiration (TE; D; unpaired Mann–Whitney test and unpaired Student's *t* test, respectively), as well as the duration of post-inspiration (E1; E; unpaired Student's *t* test) and expiration phase 2 (E2; F; unpaired Mann–Whitney test) in control ($n = 6$) and chronic intermittent hypoxia (CIH) ($n = 8$) rats. Note the increase in the duration of SLN and HN pre-I components, TE and duration of E2 in CIH rats. CIH also produced a decrease in TI and duration of E1.

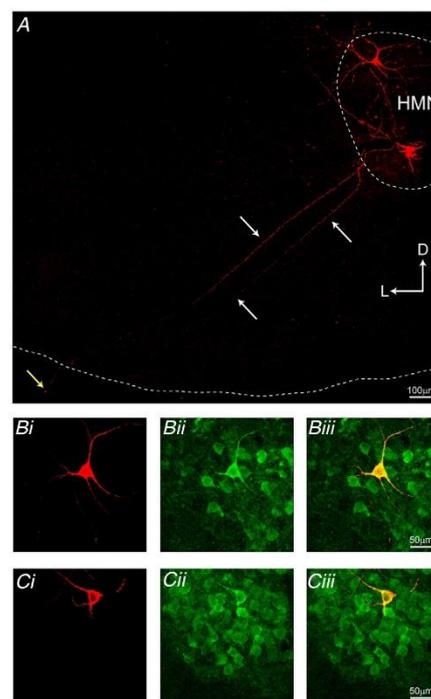


Figure 4. Location, phenotype and projection of the protruder and retractor hypoglossal motoneurons from a control rat

A, coronal section of the medulla showing biocytin-labelled protruder (below) and retractor (above) motoneurons from one control rat in the hypoglossal motor nucleus (HMN) identified on the basis of antidromic excitation from the medial and lateral branches of hypoglossal nerve (HN), respectively. Note that the axons of the motoneurons (white arrows) are projecting to the ventral medullary surface to form the HN (yellow arrow). D: dorsal; L: lateral. Magnifications of the protruder (Bi) and retractor (Ci) hypoglossal motoneurons recorded and labelled with biocytin and the respective Chat immunohistochemical staining of the HMN (Bii and Cii). Note on overlapping images that these protruder (Biii) and retractor (Ciii) hypoglossal motoneurons are positive Chat-immunoreactive cells (yellow). [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

CIH enhances the respiratory-related synaptic excitation of protruder and retractor hypoglossal motoneurons

We next tested whether the CIH-evoked enhancement of both pre-inspiratory and inspiratory activities in hypoglossal motoneurons is due to increases in the synaptic excitation. Whole-cell voltage-clamp recordings were also performed in the same 33 inspiratory-modulated motoneurons of the HMN from 30 rats as described above (15 control and 15 CIH rats). Synaptic excitation, determined by the presence of sEPSCs, was prominent in hypoglossal motoneurons from control rats at both later in expiration (pre-inspiratory component) and inspiration (Fig. 7*Ai*). CIH increased the frequency (21.01 ± 5.39 vs. 3.06 ± 1.75 Hz; $P < 0.0001$), but not the amplitude (-26.07 ± 6.91 vs. -23.06 ± 6.4 pA), of sEPSCs to hypoglossal motoneurons later in expiration (Fig. 7*Ai-7Bii*). On the other hand, the frequency (30.86 ± 7.72 vs. 31.12 ± 7.21 Hz) and amplitude (-67.78 ± 13.47 vs. -71.38 ± 13.43 pA) of sEPSCs during inspiration were not different in hypoglossal motoneurons from control and CIH rats (Fig. 7*Ai-7Aii* and 7*Ci-7Cii*). In addition,

CIH affected the frequency of sEPSCs later in expiration to both the protruder (20.18 ± 5.06 vs. 3.06 ± 1.74 Hz; $P < 0.0001$; unpaired Student's *t* test; eight motoneurons from eight control and nine motoneurons from eight CIH rats) and retractor (21.93 ± 5.94 vs. 3.05 ± 1.88 Hz; $P < 0.0001$; unpaired Student's *t* test; eight motoneurons from eight control, and eight motoneurons from eight CIH rats) hypoglossal motoneurons to the same extent. Considering these results, we decided to analyse the effects of CIH on the intrinsic electrophysiological properties of the hypoglossal motoneurons regardless of their muscle innervation (protruder and retractor).

CIH depolarises the RMP and increases the intrinsic excitability of hypoglossal motoneurons

To evaluate whether the effects of CIH on the respiratory-related oropharyngeal motor activity are dependent on changes in the intrinsic electrophysiological properties of hypoglossal motoneurons, we performed the blockade of their fast synaptic transmission in some of the rats used above in "CIH enhances the

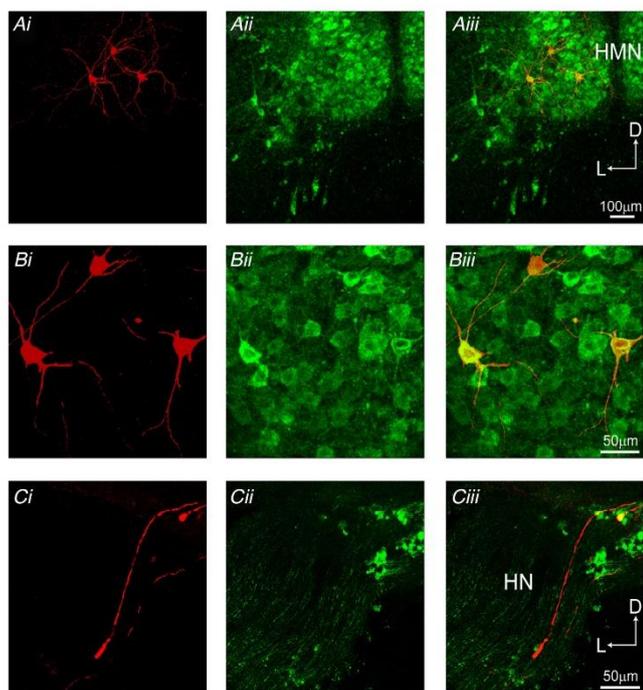


Figure 5. Location, phenotype and projection of the protruder and retractor hypoglossal motoneurons from a chronic intermittent hypoxia rat

Ai, coronal section of the medulla showing two biocytin-labelled protruders (below) and one retractor (above) motoneurons from a chronic intermittent hypoxia (CIH) rat identified on the basis of antidromic excitation from the medial and lateral branches of the hypoglossal nerve (HN), respectively. *Aii*, Chat immunohistochemical staining and the overlapping images (*Aiii*), showing the location of the recorded motoneurons in the hypoglossal motor nucleus (HMN). D: dorsal; L: lateral. *Bi*, magnification of the protruders and retractor hypoglossal motoneurons recorded and labelled with biocytin and the respective Chat immunohistochemical staining of the HMN (*Bii*). Note on overlapping images (*Biii*) that these protruders and retractor hypoglossal motoneurons are positive Chat-immunoreactive cells. *Ci*, magnification of the HN at the ventral medullary surface showing the axons of the protruders and retractor hypoglossal motoneurons recorded leaving the medulla. *Cii*, Chat immunohistochemical staining of the axons from hypoglossal motoneurons. Note on the overlapping images (*Ciii*) the Chat accumulation in the motoneuron axons forming the HN. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

respiratory-related protruder and retractor hypoglossal motoneurons activities” and “CIH enhances the respiratory-related synaptic excitation of protruder and retractor hypoglossal motoneurons” (12 motoneurons from 12 control and 13 motoneurons from 13 CIH rats). The RMP of hypoglossal motoneurons was more depolarised in CIH than control rats (-51.39 ± 2.8 vs. -57.31 ± 2.65 mV; $P < 0.0001$; unpaired Student's *t* test; Fig. 8*Ai–8Aii*), the excitability to depolarised current pulses increased (at 300 pA: 47.53 ± 4.92 vs. 26.91 ± 5.76 spikes; $P < 0.0001$; Fig. 8*Ai–8Aiii*) and the R_i was higher (207.2 ± 24.69 vs. 110.5 ± 23.26 M Ω ; $P < 0.0001$; Fig. 8*Bi–8Biii*). These findings suggest that the observed enhancement of respiratory-related oropharyngeal motor activity after CIH was mediated in part by changes in the electrophysiological properties of hypoglossal

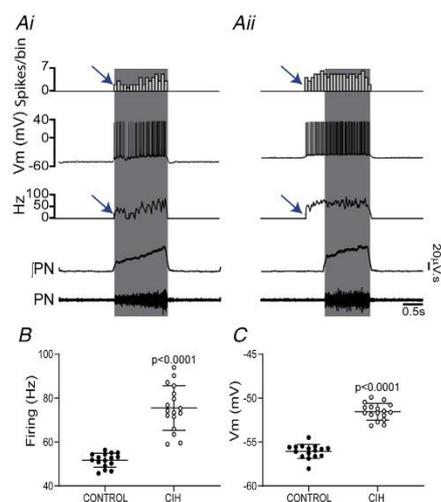


Figure 6. Effects of chronic intermittent hypoxia on the membrane potential and firing frequency of hypoglossal motoneurons

Frequency histograms (spikes/bin; bin width 80 ms), current-clamp records of membrane potential trajectories (V_m in mV) and action potentials, and representation of the mean firing frequency (Hz) of representative protruder hypoglossal motoneurons, as well as the integrated (*I*) and raw records of phrenic nerve (PN) activities of *in situ* preparations from control (*Ai*) and chronic intermittent hypoxia (CIH) (*Aii*) rats. Note the depolarised values of V_m during expiration, as well as the anticipation in the onset of depolarisation and generation of action potentials (pre-inspiratory component; blue arrows), which produced higher firing frequency, in the hypoglossal motoneurons from CIH rats. Grey boxes: inspiration. Grouped data of the firing frequency (*B*; unpaired Student's *t* test) and V_m during expiration (*C*; unpaired Student's *t* test) of hypoglossal motoneurons from control ($n = 16$) and CIH ($n = 17$) rats.

motoneurons. Because previous studies described an important role for K^+ -dominated leak current controlling motoneuron excitability and RMP in the HMN *in vitro* (Koizumi *et al.* 2008), we tested whether this current was different in motoneurons from CIH rats relative to control rats.

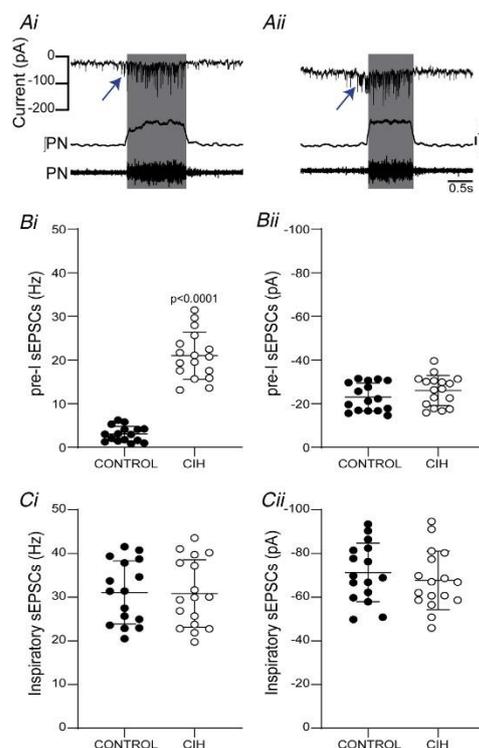


Figure 7. Effects of chronic intermittent hypoxia on the synaptic excitation to hypoglossal motoneurons

Voltage-clamp records of sEPSCs to representative protruder hypoglossal motoneurons, as well as the integrated (*I*) and raw records of phrenic nerve (PN) activities of *in situ* preparations from control (*Ai*) and chronic intermittent hypoxia (CIH) (*Aii*) rats. Note the enhancement in the frequency of sEPSCs later in expiration (pre-inspiratory component; blue arrows) in the hypoglossal motoneurons from CIH rats. Grey boxes: inspiration. Grouped data comparing the frequency (*B*; unpaired Student's *t* test) and amplitude (*Bii*; unpaired Mann–Whitney test) of sEPSCs to hypoglossal motoneurons from control ($n = 16$) and CIH ($n = 17$) rats later in expiration. Grouped data comparing the frequency (*C*; unpaired Student's *t* test) and amplitude (*Cii*; unpaired Student's *t* test) of sEPSCs to hypoglossal motoneurons from control ($n = 16$) and CIH ($n = 17$) rats during inspiration.

CIH depolarises hypoglossal motoneurons by inhibiting K^+ -dominated leak currents

We next tested the hypothesis that CIH reduces background K^+ currents to depolarise the RMP in hypoglossal motoneurons. If this is the case, the hypoglossal motoneurone leak currents measured should have a reversal potential close to the E_{K^+} . We used a voltage ramp protocol (from -130 mV to -70 mV) to construct the current–voltage relationships in 10 motoneurons from 10 control, and 10 motoneurons from 10 CIH rats used above in “CIH depolarises the RMP and increases the intrinsic excitability of hypoglossal motoneurons” (Fig. 9A). The extracellular solution was supplemented with $CdCl_2$, TEA, 4-AP and ZD7288, as well as with low concentration of $BaCl_2$, to block voltage-activated ion channels. Under these conditions, the measured G_{leak} was significantly smaller in motoneurons from CIH than control rats (2.41 ± 0.4 vs. 3.52 ± 0.55 nS; $P < 0.0001$; Fig. 9A–9B). These currents had a reversal potential (control: -85.97 ± 3.33 mV; CIH: -86.83 ± 3.2 mV) close to the calculated E_{K^+} (-91.59 mV;

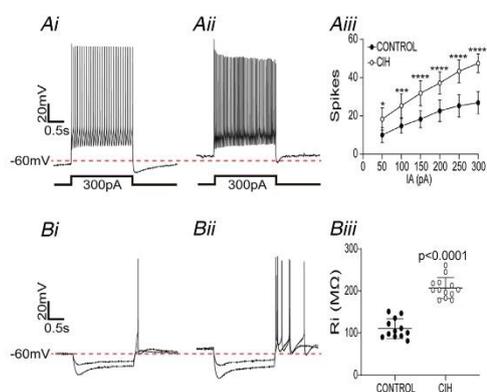


Figure 8. Effects of chronic intermittent hypoxia on the intrinsic electrophysiological properties of hypoglossal motoneurons

Evoked action potentials in response to a depolarising current pulse in the hypoglossal motoneurons from control (Ai) and chronic intermittent hypoxia (CIH) (Aii) rats, in the presence of blockers of fast synaptic transmission. Aiii, grouped data showing the number of spikes evoked by depolarised current pulses in hypoglossal motoneurons from control ($n = 12$) and CIH ($n = 13$) rats (two-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* test; * $P = 0.01$; **** $P = 0.002$; ***** $P < 0.0001$). Note that CIH depolarised the resting membrane potential (RMP) and increased the excitability of hypoglossal motoneurons. Vm responses to negative current injections in the hypoglossal motoneurons from control (Bi) and CIH (Bii) rats. Biii, grouped data showing the R_i of the hypoglossal motoneurons from control ($n = 12$) and CIH ($n = 13$) rats (unpaired Student's *t* test). Note that CIH increased the R_i of the hypoglossal motoneurons.

Fig. 9A), suggesting that CIH depolarises the RMP of hypoglossal motoneurons by inhibiting a resting membrane K^+ -dominated conductance. Because the two-pore domain K^+ (K2P) channels are involved in controlling the RMP of hypoglossal motoneurons and they are insensitive to the classic K^+ channel blockers (TEA and 4-AP) (Bayliss *et al.* 2003; Berg *et al.* 2004), we next examined the role of K2P channels in CIH-induced reductions in leak currents and G_{leak} using a high concentration of $BaCl_2$ (3 mM), in the presence of the same blockers of voltage-activated ion channels described above, using eight motoneurons from eight control, and nine motoneurons from nine CIH rats. At -60 mV, the reductions in the holding current (140.2 ± 21.85 vs. 54.56 ± 25.24 pA; $P < 0.0001$; Fig. 9C–9D) and G_{leak} (2.33 ± 0.36 vs. 0.87 ± 0.44 nS; $P = 0.0002$; unpaired Mann–Whitney test) in response to a high concentration of $BaCl_2$ were significantly higher in motoneurons from control than CIH rats, suggesting that Ba^{2+} -sensitive K2P-mediated leak currents in hypoglossal motoneurons are substantially inhibited after CIH.

Discussion

Herein we demonstrated that CIH enhances the neural control of oropharyngeal function of rats by increasing the firing frequency and the frequency, but not amplitude, of respiratory-related synaptic excitation of protractor and retractor hypoglossal motoneurons. CIH also depolarises their RMP and increases intrinsic excitability. These changes are likely to be mediated by the inhibitory effects of CIH on the K2P-mediated K^+ -dominant leak currents. Therefore, CIH induces significant changes in the neural control of the oropharyngeal function of rats by affecting the breathing-related synaptic control and intrinsic electrophysiological properties of protractor and retractor hypoglossal motoneurons.

CIH increased the duration of the pre-inspiratory component, simultaneously with AbN active expiration, and the amplitude of inspiratory-related activity of the HN of rats. Previous studies showed that acute hypoxia produced similar effects on the HN (Fuller, 2005; Lee & Fuller, 2010; Andrzejewski *et al.* 2017), as well as on the protractor and retractor muscles from anaesthetised rats (Fuller *et al.* 1998). Besides, CIH increases the amplitude of inspiratory-related activity of the genioglossus muscle (Edge *et al.* 2012, 2014) and HN (Tang *et al.* 2019) in anaesthetised rats. Considering the location of the HN recordings (before its bifurcation into medial and lateral branches), our data are supporting the idea that CIH affected both the protractor and retractor muscles of the tongue. It was demonstrated that protractor and retractor muscle co-activation, such as during acute hypoxia (Fuller *et al.* 1998), produces tongue retraction during inspiration

and improves oropharyngeal flow in rats (Eisele *et al.* 1995; Brennick *et al.* 2001). Our working hypothesis is that the enhancement of the tongue extrinsic muscle activity immediately before (simultaneously with glottal dilatation and active expiration (Moraes & Machado, 2015)) and during inspiration in rats submitted to CIH produces maximal expiratory and inspiratory flow, reducing the resistance of the oropharyngeal and laryngeal airways (Fuller *et al.* 1999; Bailey & Fregosi, 2003; Ghali, 2020). Accordingly, hypoxic episodes reduce upper airway airflow resistance in rats and humans (Shkoukani *et al.* 2002; Fuller, 2005). Therefore, the coordinated cranial and spinal motor responses observed in the present study could minimise hypoxic events by compensating the deleterious effects of CIH on the contractile function of the oropharyngeal muscles (McGuire *et al.* 2002; O'Halloran *et al.* 2002; Bradford *et al.* 2005; Liu *et al.* 2009a, 2009b; Zhang *et al.* 2010).

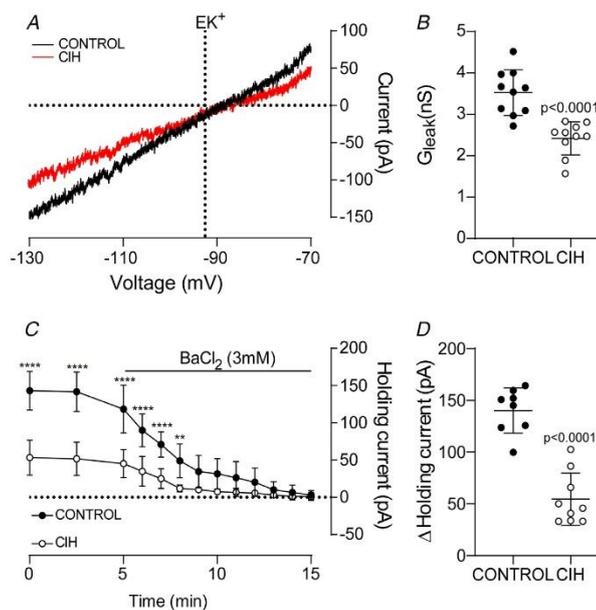
Our intracellular recordings demonstrated that protrudor, located in the HMN ventral region, and retractor, located in the HMN dorsal region, inspiratory motoneurons were affected to the same extent by CIH. It is well known that protrudor motoneurons, innervating genioglossus muscle, are located in the ventrolateral region, while retractor motoneurons, innervating hyoglossus and styloglossus muscles, are in the dorsal region of HMN of rodents (McClung &

Goldberg, 1999; Dergacheva *et al.* 2020). CIH increased the frequency of sEPSCs later in expiration, anticipated the onset of depolarisation and generation of action potentials (pre-inspiratory component), which produced higher firing frequency in protrudor and retractor hypoglossal motoneurons. Similar changes were previously described in the glottal dilator laryngeal motoneurons of the nucleus ambiguus from CIH rats (Moraes & Machado, 2015). The late-expiratory neurones located in the parafacial respiratory group (pFRG) are possible sources of pre-inspiratory synaptic excitation to protrudor and retractor hypoglossal motoneurons, as well as to glottal dilator laryngeal motoneurons. Previous studies demonstrated that CIH recruits the pFRG late-expiratory neurones (Machado *et al.* 2017), pFRG activation induces active expiration and simultaneously enhances the HN and SLN activity and glottal dilatation later in expiration (de Britto & Moraes, 2017; de Britto *et al.* 2020) and the pFRG neurones project to HMN (Pagliardini *et al.* 2011).

A recent study demonstrated that CIH produces a mismatch between the pre-BötC inspiratory bursts and the HN activity in rhythmic slice preparations from neonatal mice (Garcia *et al.* 2016). Our analyses revealed that CIH affected neither the frequency nor the amplitude of sEPSCs during inspiration to protrudor and retractor hypoglossal motoneurons from juvenile rats,

Figure 9. Effects of chronic intermittent hypoxia on the membrane leak conductance of the hypoglossal motoneurons

A, current–voltage relationship, measured by a voltage ramp protocol, of the hypoglossal motoneurons from control ($n = 10$) and chronic intermittent hypoxia (CIH) rats ($n = 10$) rats (unpaired Student's t test). Note that CIH decreased the G_{leak} of hypoglossal motoneurons. **C**, holding currents of hypoglossal motoneurons from control ($n = 8$) and CIH ($n = 9$) rats before and after the perfusion of a high concentration of BaCl_2 (two-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* test; ** $P = 0.004$; **** $P < 0.0001$). **D**, grouped data showing the changes in the holding currents in hypoglossal motoneurons from control ($n = 8$) and CIH ($n = 9$) rats after the perfusion of a high concentration of BaCl_2 (unpaired Student's t test). Note that the reductions in the holding currents in response to a high concentration of BaCl_2 were significantly lower in motoneurons from CIH rats. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]



despite their higher firing frequency, suggesting that the inspiratory excitatory synaptic drive is not enhancing the excitability of hypoglossal motoneurons. It is worth mentioning the differences in the animals' age (neonatal vs. juvenile) and applied experimental approaches (medullary slices vs. brainstem–spinal cord preparation) between the studies. Therefore, it is possible that CIH affects the well-described post-natal development of the hypoglossal motoneurons' electrophysiological properties (Funk *et al.* 1997; Revill *et al.* 2019) or even that these motoneurons are more susceptible to the deleterious effects of CIH in neonatal rats. Besides, the presence of protruder and retractor pre-motor neurones in our *in situ* experimental approach, such as in the Kölliker–Fuse, parabrachial nucleus and nucleus of the solitary tract (Dobbins & Feldman, 1995), could also contribute to the different effects of CIH on the inspiratory-related synaptic excitation to hypoglossal motoneurons observed between the studies.

The present study also provides evidence that CIH depolarised the RMP and increased the intrinsic excitability of hypoglossal motoneurons by affecting a K^+ -dominated G_{Leak} . It is well known that hypoglossal motoneurons present a K^+ -dominated G_{Leak} with properties characteristic of the TWIK-related acid-sensitive K^+ (TASK) channels (TASK-1 and TASK-3) (Bayliss *et al.* 2003), which are family members of K2P channels (Lesage & Lazdunski, 2000; Goldstein *et al.* 2001). In this regard, TASK-1 and TASK-3 protein expression were found to be expressed in the hypoglossal motoneurons (Berg *et al.* 2004). In addition to being sensitive to changes in extracellular pH (Lesage & Barhanin, 2011), these channels are indirectly inhibited by hypoxia (Enyedi & Czizják, 2010; González *et al.* 2012), as well as by neurotransmitters, such as serotonin (5-HT) and noradrenaline (NA) (Talley *et al.* 2000; Stirois *et al.* 2002; Xu *et al.* 2009). 5-HT and NA are important modulators of the oropharyngeal function of rats by increasing hypoglossal motoneurone activity (Kubin *et al.* 1992; Volgin *et al.* 2001; Fenik *et al.* 2005). It is reasonable to suggest that the intermittent hypoxic episodes over 10 days depolarise the RMP and increase the excitability of hypoglossal motoneurons by inhibiting TASK-1 and/or TASK-3 channels. These changes could also be mediated by the inhibitory effects of 5-HT and NA on TASK channels since noradrenergic and serotonergic terminal density was increased in the HMN of rats submitted to CIH (Rukhadze *et al.* 2010). On the other side, it was previously demonstrated that CIH increases TASK-1 protein expression in the HMN of rats, despite not identifying which type of hypoglossal motoneurons was affected (Li *et al.* 2019). Therefore, additional experiments are needed to evaluate the expression of TASK-1 and TASK-3 in the protruder and retractor hypoglossal motoneurons from rats submitted to CIH.

It is worth mentioning that there is no uniform standard for establishing animal models to reproduce the intermittent hypoxia experienced by OSA patients. Currently, the apnoea–hypopnoea index and oxygen saturation are the two most common clinical indicators used to measure the severity of OSA (Edwards *et al.* 2014). Accordingly, OSA can be classified as mild, moderate or severe (Dematteis *et al.* 2009; Berry *et al.* 2012; Chung *et al.* 2012; Lim *et al.* 2015). Previous studies showed that in patients with mild, moderate and severe OSA, the oxygen saturation values are 85%–90%, 80%–84%, and 75%–77%, respectively (Lim *et al.* 2015; Wali *et al.* 2020). The applied CIH model in the present study (FiO_2 of 0.06 and SaO_2 74%) generates arterial hypertension, mediated by sympathetic overactivity, in rats (Zoccal *et al.* 2008, 2009), as well as an enhancement of peripheral chemoreceptor sensitivity (Braga *et al.* 2006). These changes are also observed in patients with severe OSA (Imadojemu *et al.* 2007; Pedrosa *et al.* 2011; Trombetta *et al.* 2013; Labarca *et al.* 2020). It is also important to mention that the intermittent hypoxic cycles experienced by OSA patients are not sinusoidal, with longer desaturation time presenting a linear relationship to the degree of hypoxia, whereas resaturation time is constant and faster, independent of the degree of hypoxia (Lim *et al.* 2015). The applied intermittent hypoxic paradigm produced a slow desaturation phase (~4 min) and a more rapid resaturation phase (~15 s) during each hypoxic episode. Previous studies demonstrated that OSA patients exhibit oxidative stress (Jelic & Le Jemtel, 2008) and rodents exposed to intermittent hypoxia with short resaturation phase present higher levels of systemic markers of oxidative stress than rodents exposed to intermittent hypoxia with a long resaturation phase (Lim *et al.* 2015). Therefore, our CIH paradigm is an attempt to mimic in rats the intermittent hypoxic episodes experienced by patients with severe OSA.

A limitation of our study is related to the absence of temporal analyses of changes in the HN activity and electrophysiological properties of hypoglossal motoneurons over the 10 days of CIH. However, previous studies demonstrated in rats that the effects of CIH on the corticomotor activity of the genioglossus (Su *et al.* 2014; Nie *et al.* 2017; Zou *et al.* 2018; Meng *et al.* 2020), pharyngeal pressure and airway collapse (Meng *et al.* 2020), serotonin density and TASK-1 expression in the HMN (Li *et al.* 2019), as well as on the ultrastructure of the genioglossus muscle (Meng *et al.* 2020) were similar between the 7th and 10th day of exposure. Therefore, it is unlikely that the observed changes in the HN activity and electrophysiological properties of hypoglossal motoneurons differ at the different stages of CIH over the 10 days of exposure.

In conclusion, the present study demonstrated that CIH enhances the respiratory-related neural control

of oropharyngeal function of rats by increasing the synaptic excitation, intrinsic excitability, and reducing the K^+ -dominated G_{leak} of both protruder and retractor hypoglossal motoneurons. We propose that these network and cellular changes are important to optimise the oropharyngeal resistance in conditions related to intermittent hypoxia.

References

- Andrzejewski K, Budzińska K & Kaczyńska K (2017). Phrenic and hypoglossal nerve activity during respiratory response to hypoxia in 6-OHDA unilateral model of Parkinson's disease. *Life Sci* **180**, 143–150.
- Bailey EF & Fregosi RF (2003). Pressure-volume behaviour of the rat upper airway: effects of tongue muscle activation. *J Physiol* **548**, 563–568.
- Bailey EF, Jones CL, Reeder JC, Fuller DD & Fregosi RF (2001). Effect of pulmonary stretch receptor feedback and CO_2 on upper airway and respiratory pump muscle activity in the rat. *J Physiol* **532**, 525–534.
- Bayliss DA, Sirois JE & Talley EM (2003). The TASK family: two-pore domain background K^+ channels. *Mol Interv* **3**, 205–219.
- Berg AP, Talley EM, Manger JP & Bayliss DA (2004). Motoneurons express heteromeric TWIK-related acid-sensitive K^+ (TASK) channels containing TASK-1 (KCNK3) and TASK-3 (KCNK9) subunits. *J Neurosci* **24**, 6693–6702.
- Berry RB, Budhiraja R, Gottlieb DJ, Gozal D, Iber C, Kapur VK, Marcus CL, Mehra R, Parthasarathy S, Quan SF, Redline S, Strohl KP, Ward SLD & Tangredi MM (2012). Rules for scoring respiratory events in sleep: Update of the 2007 AASM manual for the scoring of sleep and associated events. *J Clin Sleep Med* **8**, 597–619.
- Bradford A, McGuire M & O'Halloran KD (2005). Does episodic hypoxia affect upper airway dilator muscle function? Implications for the pathophysiology of obstructive sleep apnoea. *Respir Physiol Neurobiol* **147**, 223–234.
- Braga VA, Soriano RN & Machado BH (2006). Sympathoexcitatory response to peripheral chemoreflex activation is enhanced in juvenile rats exposed to chronic intermittent hypoxia. *Exp Physiol* **91**, 1025–1031.
- Brennick MJ, Trouard TP, Gmitro AF & Fregosi RF (2001). MRI study of pharyngeal airway changes during stimulation of the hypoglossal nerve branches in rats. *J Appl Physiol* **90**, 1373–1384.
- de Britto AA, Magalhães KS, da Silva MP, Paton JFR & Moraes DJA (2020). Active expiratory oscillator regulates nasofacial and oral motor activities in rats. *Exp Physiol* **105**, 379–391.
- de Britto AA & Moraes DJA (2017). Non-chemosensitive parafacial neurons simultaneously regulate active expiration and airway patency under hypercapnia in rats. *J Physiol* **595**, 2043–2064.
- Chung F, Liao P, Elsaid H, Islam S, Shapiro CM & Sun Y (2012). Oxygen desaturation index from nocturnal oximetry: A sensitive and specific tool to detect sleep-disordered breathing in surgical patients. *Anesth Analg* **114**, 993–1000.
- Cori JM, O'Donoghue FJ & Jordan AS (2018). Sleeping tongue: current perspectives of genioglossus control in healthy individuals and patients with obstructive sleep apnea. *Nat Sci Sleep* **10**, 169–179.
- Dematteis M, Godin-Ribuot D, Arnaud C, Ribuot C, Stanke-Labesque F, Pepin J-L & Levy P (2009). Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: Contribution of animal models to understanding of the human disease. *ILAR J* **50**, 262–281.
- Dempsey JA, Veasey SC, Morgan BJ & O'Donnell CP (2010). Pathophysiology of Sleep Apnea. *Physiol Rev* **90**, 47–112.
- Dergacheva O, Fleury-Curado T, Polotsky VY, Kay M, Jain V & Mendelowitz D (2020). GABA and glycine neurons from the ventral medullary region inhibit hypoglossal motoneurons. *Sleep* **43**, zsz301.
- Dobbins EG & Feldman JL (1995). Differential innervation of protruder and retractor muscles of the tongue in rat. *J Comp Neurol* **357**, 376–394.
- Edge D, Bradford A, Jones JFX & O'Halloran KD (2012). Chronic intermittent hypoxia alters genioglossus motor unit discharge patterns in the anaesthetized rat. *Adv Exp Med Biol* **758**, 295–300.
- Edge D, McDonald FB, Jones JFX, Bradford A & O'Halloran KD (2014). Effect of chronic intermittent hypoxia on the reflex recruitment of the genioglossus during airway obstruction in the anesthetized rat. *Prog Brain Res* **209**, 147–168.
- Edwards BA, Eckert DJ, McSharry DG, Sands SA, Desai A, Kehlmann G, Bakker JP, Genta PR, Owens RL, White DP, Wellman A & Malhotra A (2014). Clinical predictors of the respiratory arousal threshold in patients with obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* **190**, 1293–1300.
- Eisele DW, Schwartz AR, Hari A, Thut DC & Smith PL (1995). The effects of selective nerve stimulation on upper airway airflow mechanics. *Arch Otolaryngol - Head Neck Surg* **121**, 1361–1364.
- Enyedi P & Czirják G (2010). Molecular Background of leak K^+ Currents: Two-pore domain potassium channels. *Physiol Rev* **90**, 559–605.
- Fenik VB, Davies RO & Kubin L (2005). REM sleep-like atonia of hypoglossal (XII) motoneurons is caused by loss of noradrenergic and serotonergic inputs. *Am J Respir Crit Care Med* **172**, 1322–1330.
- Fregosi RF (2011). Respiratory related control of hypoglossal motoneurons—Knowing what we do not know. *Respir Physiol Neurobiol* **179**, 43–47.
- Fregosi RF & Fuller DD (1997). Respiratory-related control of extrinsic tongue muscle activity. *Respir Physiol* **110**, 295–306.
- Fuller D, Mateika JH & Fregosi RF (1998). Co-activation of tongue protruder and retractor muscles during chemoreceptor stimulation in the rat. *J Physiol* **507**, 265–276.
- Fuller DD (2005). Episodic hypoxia induces long-term facilitation of neural drive to tongue protruder and retractor muscles. *J Appl Physiol* **98**, 1761–1767.
- Fuller DD, Williams JS, Janssen PL & Fregosi RF (1999). Effect of co-activation of tongue protruder and retractor muscles on tongue movements and pharyngeal airflow mechanics in the rat. *J Physiol* **519**, 601–613.

- Funk G., Parkis M., Selvaratnam S. & Walsh C (1997). Developmental modulation of glutamatergic inspiratory drive to hypoglossal motoneurons. *Respir Physiol* **110**, 125–137.
- Garcia AJ, Zanella S, Dashevskiy T, Khan SA, Khuu MA, Prabhakar NR & Ramirez J-M (2016). Chronic intermittent hypoxia alters local respiratory circuit function at the level of the preBötzinger complex. *Front Neurosci* **10**, 4.
- Ghali MGZ (2020). Control of hypoglossal pre-inspiratory discharge. *Exp Physiol* **105**, 1232–1255. EP087329.
- Goldstein SAN, Bockenhauer D, O'Kelly I & Zilberberg N (2001). Potassium leak channels and the KCNK family of two-p-domain subunits. *Nat Rev Neurosci* **2**, 175–184.
- González C, Baez-Nieto D, Valencia I, Oyarzún I, Rojas P, Naranjo D & Latorre R (2012). K⁺ Channels: Function-Structural Overview. In *Comprehensive Physiology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Grundy D (2015). Principles and standards for reporting animal experiments in The Journal of Physiology and experimental physiology. *J Physiol* **593**, 2547–2549.
- Harding R, Johnson P & McClelland ME (1980). Respiratory function of the larynx in developing sheep and the influence of sleep state. *Respir Physiol* **40**, 165–179.
- Hille B (2001). Ion channels of excitable membranes. *Sinauer*, Sunderland, MA.
- Imadojemu VA, Mawji Z, Kunselman A, Gray KS, Hogeman CS & Leuenberger UA (2007). Sympathetic chemoreflex responses in obstructive sleep apnea and effects of continuous positive airway pressure therapy. *Chest* **131**, 1406–1413.
- Jelic S & LeJemtel TH (2008). Inflammation, oxidative stress, and the vascular endothelium in obstructive sleep apnea. *Trends Cardiovasc Med* **18**, 253–260.
- Katz ES & White DP (2003). Genioglossus activity in children with obstructive sleep apnea during wakefulness and sleep onset. *Am J Respir Crit Care Med* **168**, 664–670.
- Koizumi H, Wilson CG, Wong S, Yamanishi T, Koshiya N & Smith JC (2008). Functional imaging, spatial reconstruction, and biophysical analysis of a respiratory motor circuit isolated in vitro. *J Neurosci* **28**, 2353–2365.
- Kubin L, Tojima H, Davies RO & Pack AI (1992). Serotonergic excitatory drive to hypoglossal motoneurons in the decerebrate cat. *Neurosci Lett* **139**, 243–248.
- Labarca G, Gower J, Lamperti L, Dreyse J & Jorquera J (2020). Chronic intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea: a narrative review from pathophysiological pathways to a precision clinical approach. *Sleep Breath* **24**, 751–760.
- Lee K-Z & Fuller DD (2010). Preinspiratory and inspiratory hypoglossal motor output during hypoxia-induced plasticity in the rat. *J Appl Physiol* **108**, 1187–1198.
- Lesage F & Barhanin J (2011). Molecular physiology of pH-sensitive background K₂P channels. *Physiology* **26**, 424–437.
- Lesage F & Lazdunski M (2000). Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Physiol* **279**, F793–F801.
- Li W, Wang A, Jin H, Zou Y, Wang Z, Wang W & Kang J (2019). Transient upregulation of TASK-1 expression in the hypoglossal nucleus during chronic intermittent hypoxia is reduced by serotonin 2A receptor antagonist. *J Cell Physiol* **234**, 17886–17895.
- Lim DC, Brady DC, Po P, Chuang LP, Marcondes L, Kim EY, Keenan BT, Guo X, Maislin G, Galante RJ & Pack AI (2015). Simulating obstructive sleep apnea patients' oxygenation characteristics into a mouse model of cyclical intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* **118**, 544–557.
- Liu Y-H, Huang Y & Shao X (2009a). Effects of estrogen on genioglossal muscle contractile properties and fiber-type distribution in chronic intermittent hypoxia rats. *Eur J Oral Sci* **117**, 685–690.
- Liu Y-H, Li W & Song W-H (2009b). Effects of oestrogen on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase activity and gene expression in genioglossus in chronic intermittent hypoxia rat. *Arch Oral Biol* **54**, 322–328.
- Machado BH, Zoccal DB & Moraes DJA (2017). Neurogenic hypertension and the secrets of respiration. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* **312**, R864–R872.
- Malhotra A & White DP (2002). Obstructive sleep apnea. *Lancet* **360**, 237–245.
- McClung JR & Goldberg SJ (1999). Organization of motoneurons in the dorsal hypoglossal nucleus that innervate the retrusor muscles of the tongue in the rat. *Anat Rec* **254**, 222–230.
- McClung JR & Goldberg SJ (2000). Functional anatomy of the hypoglossal innervated muscles of the rat tongue: A model for elongation and protrusion of the mammalian tongue. *Anat Rec* **260**, 378–386.
- McGuire M, MacDermott M & Bradford A (2002). The effects of chronic episodic hypercapnic hypoxia on rat upper airway muscle contractile properties and fiber-type distribution. *Chest* **122**, 1400–1406.
- Meng Y, Li W, Zou Y, Yao Y, Huang H, Sun J, Li X, Guo S, Zhang X & Wang W (2020). How does chronic intermittent hypoxia influence upper airway stability in rats? *Nat Sci Sleep* **12**, 749–758.
- Mezzanotte WS, Tangel DJ & White DP (1992). Waking genioglossal electromyogram in sleep apnea patients versus normal controls (a neuromuscular compensatory mechanism). *J Clin Invest* **89**, 1571–1579.
- Moraes DJA & Machado BH (2015). Electrophysiological properties of laryngeal motoneurons in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *J Physiol* **593**, 619–634.
- Moraes DJA, da Silva MP, Bonagamba LGH, Mecawi AS, Zoccal DB, Antunes-Rodrigues J, Varanda WA & Machado BH (2013). Electrophysiological properties of rostral ventrolateral medulla presympathetic neurons modulated by the respiratory network in rats. *J Neurosci* **33**, 19223–19237.
- Del Negro CA, Funk GD & Feldman JL (2018). Breathing matters. *Nat Rev Neurosci* **19**, 351–367.
- Nie X, Zhou L, Wang A, Jin H, Qin Z, Pang J, Wang W & Kang J (2017). Noradrenergic activation of hypoglossal nucleus modulates the central regulation of genioglossus in chronic intermittent hypoxic rats. *Front Neurol* **8**, 171.

- O'Halloran KD, McGuire M, O'Hare T & Bradford A (2002). Chronic intermittent asphyxia impairs rat upper airway muscle responses to acute hypoxia and asphyxia. *Chest* **122**, 269–275.
- Pagliardini S, Janczewski WA, Tan W, Dickson CT, Deisseroth K & Feldman JL (2011). Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult anesthetized rats. *J Neurosci* **31**, 2895–2905.
- Paton JFR (1996). A working heart-brainstem preparation of the mouse. *J Neurosci Methods* **65**, 63–68.
- Paton JFR & Dutschmann M (2002). Central control of upper airway resistance regulating respiratory airflow in mammals. *J Anat* **201**, 319–323.
- Pedrosa RP, Drager LF, Gonzaga CC, Sousa MG, de Paula LKG, Amaro ACS, Amodeo C, Bortolotto LA, Krieger EM, Bradley TD & Lorenzi-Filho G (2011). Obstructive sleep apnea: the most common secondary cause of hypertension associated with resistant hypertension. *Hypertension* **58**, 811–817.
- Peever J, Shen L & Duffin J (2002). Respiratory pre-motor control of hypoglossal motoneurons in the rat. *Neuroscience* **110**, 711–722.
- Peever JH, Mateika JH & Duffin J (2001). Respiratory control of hypoglossal motoneurons in the rat. *Pflügers Arch* **442**, 78–86.
- Powell GL, Rice A, Bennett-Cross SJ & Fregosi RF (2014). Respiration-related discharge of hypoglossal muscle motor units in the rat. *J Neurophysiol* **111**, 361–368.
- Ramchandren S, Gruis KL, Chervin RD, Lisabeth LD, Concannon M, Wolfe J, Albers JW & Brown DL (2010). Hypoglossal nerve conduction findings in obstructive sleep apnea. *Muscle Nerve* **42**, 257–261.
- Revill AL, Chu NY, Ma L, LeBlancq MJ, Dickson CT & Funk GD (2019). Postnatal development of persistent inward currents in rat XII motoneurons and their modulation by serotonin, muscarine and noradrenaline. *J Physiol* **597**, 3183–3201.
- Revill AL, Vann NC, Akins VT, Kottick A, Gray PA, Del Negro CA & Funk GD (2015). Dbx1 precursor cells are a source of inspiratory XII premotoneurons. *Elife* **4**, e12301.
- Richter DW (1982). Generation and maintenance of the respiratory rhythm. *J Exp Biol* **100**, 93–107.
- Rukhadze I, Fenik VB, Benincasa KE, Price A & Kubin L (2010). Chronic intermittent hypoxia alters density of aminergic terminals and receptors in the hypoglossal motor nucleus. *Am J Respir Crit Care Med* **182**, 1321–1329.
- Saboisky JP, Butler JE, McKenzie DK, Gorman RB, Trinder JA, White DP & Gandevia SC (2007). Neural drive to human genioglossus in obstructive sleep apnoea. *J Physiol* **585**, 135–146.
- Saboisky JP, Jordan AS, Eckert DJ, White DP, Trinder JA, Nicholas CL, Gautam S & Malhotra A (2010). Recruitment and rate-coding strategies of the human genioglossus muscle. *J Appl Physiol* **109**, 1939–1949.
- Samson N, Lafond JR, Moreau-Bussière F, Reix P & Praud J-P (2007). Cricothyroid muscle electrical activity during respiration and apneas in lambs. *Respir Physiol Neurobiol* **155**, 147–155.
- Sawczuk A & Mosier KM (2001). Neural control of tongue movement with respect to respiration and swallowing. *Crit Rev Oral Biol Med* **12**, 18–37.
- Sériès F, Côté C, Simoneau JA, Gélinas Y, St Pierre S, Leclerc J, Ferland R & Marc I (1995). Physiologic, metabolic, and muscle fiber type characteristics of musculus uvulae in sleep apnea hypopnea syndrome and in snorers. *J Clin Invest* **95**, 20–25.
- Shiba K, Satoh I, Kobayashi N & Hayashi F (1999). Multifunctional laryngeal motoneurons: An intracellular study in the cat. *J Neurosci* **19**, 2717–2727.
- Shkoukani M, Babcock MA & Badr MS (2002). Effect of episodic hypoxia on upper airway mechanics in humans during NREM sleep. *J Appl Physiol* **92**, 2565–2570.
- Sirois JE, Lynch C & Bayliss DA (2002). Convergent and reciprocal modulation of a leak K⁺ current and I_h by an inhalational anaesthetic and neurotransmitters in rat brainstem motoneurons. *J Physiol* **541**, 717–729.
- Smith JC, Abdala APL, Borgmann A, Rybak IA & Paton JFR (2013). Brainstem respiratory networks: building blocks and microcircuits. *Trends Neurosci* **36**, 152–162.
- Stål PS & Johansson B (2012). Abnormal Mitochondria organization and oxidative activity in the palate muscles of long-term snorers with obstructive sleep apnea. *Respiration* **83**, 407–417.
- Stettner GM, Fenik VB & Kubin L (2012). Effect of chronic intermittent hypoxia on noradrenergic activation of hypoglossal motoneurons. *J Appl Physiol* **112**, 305–312.
- Su J, Wang W, Sun L, Li T, Kong D & Kang J (2014). Raphe serotonergic neurons modulate genioglossus corticomotor activity in intermittent hypoxic rats. *Respir Res* **15**, 76.
- Suratt PM, Mctier RF & Wilhoit SC (1988). Upper airway muscle activation is augmented in patients with obstructive sleep apnea compared with that in normal subjects. *Am Rev Respir Dis* **137**, 889–894.
- Talley EM, Lei Q, Sirois JE & Bayliss DA (2000). TASK-1, a two-pore domain K⁺ channel, is modulated by multiple neurotransmitters in motoneurons. *Neuron* **25**, 399–410.
- Tang S, Zhou X, Hu K, Liu P, Xiong M & Li H (2019). The role of gonadal hormones in the hypoglossal discharge activity of rats exposed to chronic intermittent hypoxia. *Brain Res Bull* **149**, 175–183.
- Trombetta IC, Maki-Nunes C, Toschi-Dias E, Alves M-JNN, Rondon MUPB, Cepeda FX, Drager LF, Braga AMFW, Lorenzi-Filho G & Negrao CE (2013). Obstructive sleep apnea is associated with increased chemoreflex sensitivity in patients with metabolic syndrome. *Sleep* **36**, 41–49.
- Veasey SC, Zhan G, Fenik P & Pratico D (2004). Long-term intermittent hypoxia: Reduced excitatory hypoglossal nerve output. *Am J Respir Crit Care Med* **170**, 665–672.
- Vicente E, Marin JM, Carrizo SJ, Osuna CS, González R, Marin-Oto M, Forner M, Vicente P, Cubero P, Gil AV & Soler X (2016). Upper airway and systemic inflammation in obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* **48**, 1108–1117.
- Volgin D V, Mackiewicz M & Kubin L (2001). α 1B receptors are the main postsynaptic mediators of adrenergic excitation in brainstem motoneurons, a single-cell RT-PCR study. *J Chem Neuroanat* **22**, 157–166.

- Wali S, Abaalkhail B, AlQassas I, Alhejailli F, Spence D & Pandi-Perumal S (2020). The correlation between oxygen saturation indices and the standard obstructive sleep apnea severity. *Ann Thorac Med* **15**, 70.
- Wang W, Di C, Mona S, Wang L & Hans M (2018). Tongue function: An underrecognized component in the treatment of obstructive sleep apnea with mandibular repositioning appliance. *Can Respir J* **2018**, 1–7.
- Xu X-F, Tsai H-J, Li L, Chen Y-F, Zhang C & Wang G-F (2009). Modulation of leak K(+) channel in hypoglossal motoneurons of rats by serotonin and/or variation of pH value. *Sheng Li Xue Bao* **61**, 305–316.
- Zhang X, Wang Y, Li Q, Zhang X, Shen J, Li C & Liu H (2010). Changes in genioglossus and their association with serum adiponectin levels in rats subjected to chronic intermittent hypoxia. *Chin Med J* **123**, 2249–2253.
- Zoccal DB, Bonagamba LGH, Paton JFR & Machado BH (2009). Sympathetic-mediated hypertension of awake juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia is not linked to baroreflex dysfunction. *Exp Physiol* **94**, 972–983.
- Zoccal DB, Simms AE, Bonagamba LGH, Braga VA, Pickering AE, Paton JFR & Machado BH (2008). Increased sympathetic outflow in juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia correlates with enhanced expiratory activity. *J Physiol* **586**, 3253–3265.
- Zou Y, Wang W, Nie X & Kang J (2018). Chronic intermittent hypoxia induces the long-term facilitation of genioglossus corticomotor activity. *Can Respir J* **2018**, 1–8.

Additional Information

Data availability statement

The data of this manuscript are available from the corresponding author upon reasonable request.

Competing interests

None declared.

Author contributions

M.P.d S., K.S.M., D.P.d S. and D.J.A.M. contributed to experiments, data analyses and interpretation of the findings. M.P.d S. and D.J.A.M. contributed to the conception and experimental design. M.P.d S., K.S.M. and D.J.A.M. prepared the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

Funding

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2018/15957-2; 2018/07027-5; 2019/24060-9; 2019/11863-6) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (437375/2018-8).

Acknowledgements

We gratefully acknowledge Professor Benedito H. Machado for his important support in the chronic intermittent hypoxia model and *in situ* experiments.

Keywords

chronic intermittent hypoxia, intrinsic electrophysiological properties, synaptic transmission and leak conductance, tongue protruder motoneurons, tongue retractor motoneurons

Supporting information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

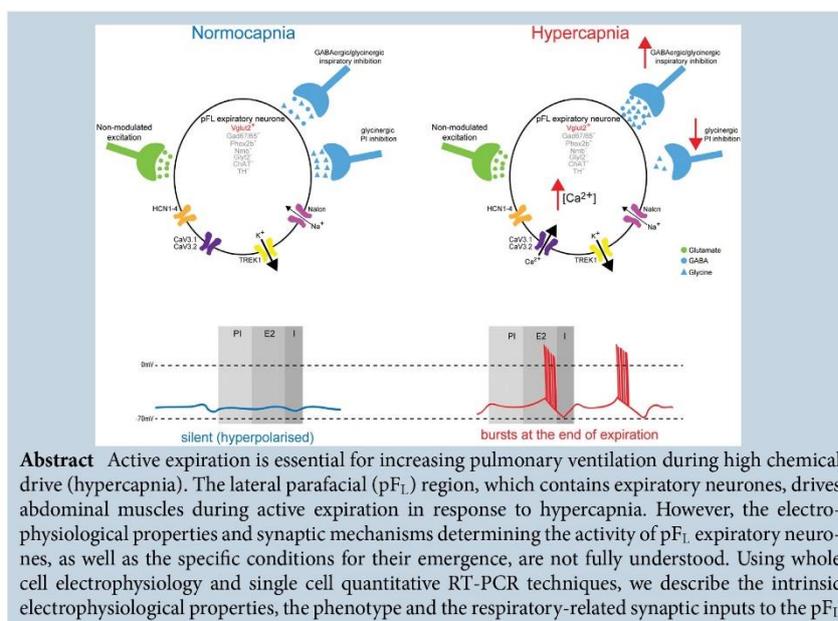
Statistical Summary Document

8.4. Artigo publicado na revista *The Journal of Physiology* (2021)*J. Physiol.* 599.21 (2021) pp 4925–4948

4925

Intrinsic and synaptic mechanisms controlling the expiratory activity of excitatory lateral parafacial neurones of ratsKarolyne S. Magalhães¹ , Melina P. da Silva¹ , André S. Mecawi² , Julian F. R. Paton³ , Benedito H. Machado¹ and Davi J. A. Moraes¹ ¹Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil²Department of Biophysics, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil³Department of Physiology, Faculty of Medical & Health Sciences, University of Auckland, Park Road, Grafton, Auckland, New Zealand

Edited by: Harold Schultz & Gregory Funk

The peer review history is available in the Supporting Information section of this article (<https://doi.org/10.1113/JP281545#support-information-section>).

Karolyne S. Magalhães is a PhD Student in Physiology at the School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil. She holds her MSc degree in Physiology at the same institution (2019). She is studying the central generation of the respiratory pattern and the sensory control of breathing in mammals. **Davi J. A. Moraes** is an Assistant Professor at the Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Brazil, exploring the central generation of the respiratory motor function in mammals using cellular electrophysiology, molecular biology and integrative physiology.



expiratory neurones, as well as the mechanisms for the expression of their expiratory activity under conditions of hypercapnia-induced active expiration, using *in situ* preparations of juvenile rats. We also evaluated whether these neurones possess intrinsic $\text{CO}_2/[\text{H}^+]$ sensitivity and burst generating properties. GABAergic and glycinergic inhibition during inspiration and expiration suppressed the activity of glutamatergic pF_L expiratory neurones in normocapnia. In hypercapnia, these neurones escape glycinergic inhibition and generate burst discharges at the end of expiration. Evidence for the contribution of post-inhibitory rebound, Ca_v3.2 isoform of T-type Ca²⁺ channels and intracellular [Ca²⁺] is presented. Neither intrinsic bursting properties, mediated by persistent Na⁺ current, nor $\text{CO}_2/[\text{H}^+]$ sensitivity or expression of $\text{CO}_2/[\text{H}^+]$ sensitive ion channels/receptors (TASK or GPR4) were observed. On the other hand, hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated and twik-related K⁺ leak channels were recorded. Post-synaptic disinhibition and the intrinsic electrophysiological properties of glutamatergic neurones play important roles in the generation of the expiratory oscillations in the pF_L region during hypercapnia in rats.

(Received 21 July 2021; accepted after revision 7 September 2021; first published online 12 September 2021)

Corresponding author D. J. A. Moraes: Department of Physiology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil. Email: davimoraes@fmrp.usp.br

Abstract figure legend Schematic diagram depicting proposed intrinsic and synaptic mechanisms determining the expiratory activity of lateral parafacial (pF_L) neurones. Representation (top) of a pF_L glutamatergic (Vglut2⁺) expiratory neurone that does not express Gad67, Gad65, Glyt2, choline acetyltransferase (ChAT), tyrosine hydroxylase (TH) or the markers of $\text{CO}_2/[\text{H}^+]$ sensitive parafacial neurones (Phox2b or neuromedin B - Nmb). The expiratory neurone also expresses hyperpolarisation-activated and cyclic nucleotide-gated cation channel (HCN) 1–4 and low voltage-activated (LVA) T-type Ca_v3.1/3.2 channels isoforms, as well as Na⁺ (Nalcn) and K⁺ (TREK1) leak channels. The inspiratory (GABAergic and glycinergic) and post-inspiratory (glycinergic) post-synaptic inhibition suppress the activity and determine the respiratory-related membrane potential oscillations of pF_L expiratory neurone in normocapnia (top and bottom left). Hypercapnia (top and bottom right) hyperpolarised the expiratory neurone to -70 mV during inspiration by increasing GABAergic and glycinergic inhibition. The mechanisms for the bursting behaviour during hypercapnia involve post-inspiratory glycinergic disinhibition and not an increase in glutamatergic excitation. Activation of LVA T-type Ca²⁺ channels and increases in intracellular [Ca²⁺] contribute to bursting generation at expiratory phase 2 (E2) by boosting the transformation of post-synaptic disinhibition to depolarisation towards the threshold for action potential generation. I, inspiration; PI, post-inspiration.

Key points

- Hypercapnia induces active expiration in rats and the recruitment of a specific population of expiratory neurones in the lateral parafacial (pF_L) region.
- Post-synaptic GABAergic and glycinergic inhibition both suppress the activity of glutamatergic pF_L neurones during inspiratory and expiratory phases in normocapnia.
- Hypercapnia reduces glycinergic inhibition during expiration leading to burst generation by pF_L neurones; evidence for a contribution of post-inhibitory rebound, voltage-gated Ca²⁺ channels and intracellular [Ca²⁺] is presented.
- pF_L glutamatergic expiratory neurones are neither intrinsic burster neurones, nor $\text{CO}_2/[\text{H}^+]$ sensors, and do not express $\text{CO}_2/[\text{H}^+]$ sensitive ion channels or receptors.
- Post-synaptic disinhibition and the intrinsic electrophysiological properties of glutamatergic neurones both play important roles in the generation of the expiratory oscillations in the pF_L region during hypercapnia in rats.

Introduction

The respiratory pattern is generated by a neuronal network located in the brainstem (Richter & Smith, 2014; Del Negro *et al.* 2018). The preBötzinger complex

(preBötC), located in the medullary ventral respiratory column, is considered as the primary source of rhythmic inspiratory activity (Smith *et al.* 1991). A distinct site of respiratory oscillations in the ventral medulla is

located in the parafacial region, close to the facial motor nucleus, which was initially identified in brainstem–spinal cord preparations of neonatal rats as the parafacial Respiratory Group (pFRG) (Onimaru & Homma, 2003). Several hypotheses concerning the physiological role of these oscillations have been debated and include: (i) an inspiratory oscillator in prenatal (embryonic parafacial; epF) and neonatal animals (Onimaru & Homma, 2003; Onimaru *et al.* 2006; Thoby-Brisson *et al.* 2009) and (ii) an independent expiratory rhythm generator that is coupled to an inspiratory rhythm generator located in the preBötC of neonatal animals (Janczewski & Feldman, 2006).

The firing pattern of the epF and pFRG neurones recorded *in vitro* is pre- and post-inspiratory, bursting before and after inspiration (Onimaru *et al.* 1995; Onimaru *et al.* 2006; Onimaru *et al.* 2008; Thoby-Brisson *et al.* 2009). These rhythmically active respiratory neurones are intrinsic $\text{CO}_2/[\text{H}^+]$ sensors, express the transcriptional factor Phox2b, which is also found in ventral medullary respiratory chemoreceptors (Onimaru *et al.* 2008), and have intrinsic bursting properties dependent on both persistent sodium current (I_{NaP}) and hyperpolarisation-activated and cyclic nucleotide-gated cation channel (HCN)-mediated currents (I_h) (Thoby-Brisson *et al.* 2009). It has been postulated that the epF/pFRG develops into juvenile/adult retrotrapezoid nucleus (RTN), which contains a cluster of Phox2b positive $\text{CO}_2/[\text{H}^+]$ sensitive neurones presenting either a tonic or respiratory-modulated firing pattern (Guyenet *et al.* 2019). The neurones of pFRG and RTN express vesicular glutamate transporter 2 (Vglut2), neurokinin-1 receptors and the neuropeptide neuro-medin B (Nmb), but not markers for catecholaminergic, cholinergic, GABAergic and glycinergic neurones (Onimaru *et al.* 2008; Guyenet & Bayliss, 2015; Shi *et al.* 2017; Guyenet *et al.* 2019). A fraction of these neurones also presents a distinct expression profile of $\text{CO}_2/[\text{H}^+]$ sensory proteins, including twik-related acid-sensitive K^+ channel (TASK) and H^+ -activated G protein-coupled receptor (GPR4) (Gestreau *et al.* 2010; Onimaru *et al.* 2014; Kumar *et al.* 2015). Finally, activation of pFRG Phox2b or RTN Phox2b/Nmb neurones robustly increased respiratory rhythm generation and breathing (Abbott *et al.* 2009; Ikeda *et al.* 2019) by triggering active inspiration and expiration (Souza *et al.* 2020).

Several studies have demonstrated that the lateral aspect of the parafacial (pFL) region drives expiratory abdominal muscles during active expiration to cause forced exhalation in juvenile and adult rats (Pisanski & Pagliardini, 2018; Takakura *et al.* 2021). Activation or disinhibition of this region evokes active expiration, without affecting the inspiratory frequency or with subtle effects on it (Pagliardini *et al.* 2011; Huckstepp *et al.* 2016; de Britto & Moraes, 2017; de Britto *et al.* 2020), suggesting a possible functional difference between

the neurones of RTN and pFL region. Despite the presence of distinct glutamatergic, GABAergic and glycinergic neurones in the pFL region (Biancardi *et al.* 2020), their electrophysiological properties and brainstem projections remain poorly described. Previous studies have demonstrated that the pFL region contains a population of neurones that do not express Phox2b protein (de Britto & Moraes, 2017) and are quiescent during normocapnia, but become rhythmic firing at the end of expiration (expiratory neurones) and simultaneously with abdominal motor outflow during hypercapnia, hypoxia or local disinhibition (Abdala *et al.* 2009; Pagliardini *et al.* 2011; Moraes *et al.* 2012; de Britto & Moraes, 2017). Inhibition of the pFL region eliminated both expiratory neurone firing (de Britto & Moraes, 2017) and active expiration during hypercapnia (Abdala *et al.* 2009; Huckstepp *et al.* 2015), suggesting that these neurones play an important role in the generation of active expiration. It now becomes important to assess the phenotype, connectivity and specific cellular mechanisms underpinning the emergence of expiratory bursting in pFL neurones and to determine whether they possess intrinsic bursting properties and have $\text{CO}_2/[\text{H}^+]$ sensitivity. Such data would lead to a substantial advance in our understanding of the neuronal mechanisms of pFL neurones that are necessary for generating active expiration. This was the aim of the present study.

Methods

Animals and ethical approval

All experimental procedures complied with the principles and regulations of *The Journal of Physiology* with respect to reporting animal experiments (Grundy, 2015). Seventy-one male Wistar rats (aged 4 weeks) from the Animal Care Facility of the University of São Paulo, Campus of Ribeirão Preto, Brazil, were used. The animals were maintained under a 12:12 h dark/light photocycle at $23 \pm 2^\circ\text{C}$, with water and chow available *ad libitum*. Protocols were approved by the Ethical Committee for Animal Experimentation of the School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (numbers: 1/2016-1 and 3/2019).

Retrograde labelling of abdominal premotor neurones

The axonal projection of pFL expiratory neurones to abdominal premotor neurones was evaluated. To label abdominal premotor neurones in the caudal ventral respiratory group (cVRG), three rats were microinjected with the retrograde tracer cholera toxin subunit B (CTB) Alexa Fluor 647-conjugated (Molecular Probes,

Eugene, OR, USA) in the lower thoracic spinal cord (T10–T12) where the abdominal motoneurons are located (Miller, 1987; da Silva *et al.* 2019). These micro-injections were performed in 3-week-old rats, 1 week before making recordings of pF_L expiratory neurones. The rats were deeply anaesthetised with ketamine (75 mg kg⁻¹ i.p.)/xylazine (5 mg kg⁻¹ i.p.) (Agener União, São Paulo, SP, Brazil) as assessed by an absence of a withdrawal reflex to pinching of the tail and a paw. Using aseptic techniques, the rats were fixed in a stereotaxic apparatus (David Kopf, Tujunga, CA, USA) and a laminectomy was made between T10–T12 to expose the spinal cord. CTB was microinjected (Picospritzer II; Parker Instruments, Hollis, NH, USA) unilaterally (50 nL), 450 μm lateral to the midline and 1000–1100 μm ventral to the dorsal surface. At the end of this surgical procedure, rats were treated with analgesic and antipyretic flunixin (1 mg kg⁻¹; Banamine; Schering-Plow, São Paulo, SP, Brazil) and 0.1 mL of veterinary antibiotic (1.2 million IU; Pentabiotic Veterinarian; Fort Dodge, Campinas, Brazil) via i.m. injections.

In situ brainstem preparation

Surgical procedures. Procedures were based on the original description of the working heart–brainstem preparation (Paton, 1996). Rats were deeply anaesthetised with isoflurane (5%; Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, São Paulo, Brazil). The depth of anaesthesia was verified by absence of a withdrawal reflex response to pinching of the tail and a paw. At this time, rats were sectioned caudal to the diaphragm and the upper body submerged in a cooled (4°C) Ringer solution (in mM: 125 NaCl, 24 NaHCO₃, 3 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.25 MgSO₄, 1.25 KH₂PO₄ and 10 glucose). Rats were decerebrated at the pre-collicular level immediately to render them insentient. The skin was removed and the ventral medullary surface of the brainstem was exposed for blind whole cell recording of neurones in the pF_L region and RTN. The carotid bodies were removed bilaterally to permit sole activation of central chemoreceptors using hypercapnia (see below), as described previously (de Britto & Moraes, 2017). Potassium cyanide (0.05%, 50 μL i.a.; Merck, Darmstadt, Germany) was used to test the completeness of peripheral chemoreceptor ablation (e.g. no inspiratory activation). All preparations were perfused (peristaltic pump; Watson-Marlow, Falmouth, UK) with the Ringer solution, which was gassed continuously with 5% CO₂ and 95% O₂. Hypercapnia was performed by raising CO₂ to 10% with 90% O₂, whereas hypocapnia was performed by reducing CO₂ to 1% with 99% O₂ using a gas mixer (Pegas 4000; Columbus Instruments, Columbus, OH, USA) and a Ringer (HCO₃-buffered) perfusion solution. Hepes-based buffered perfusion solution (in mM: 140 NaCl, 3 KCl, 2 MgCl₂, 2.5 CaCl₂,

10 Hepes and 10 glucose) was used to induce acidosis (pH 7.1) and alkalosis (pH 8.1), by addition of HCl or NaOH, respectively, which was also gassed continuously. All the perfusion solutions contained an oncotic agent [poly(ethylene glycol), 1.25%; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA] and a neuromuscular blocker (vecuronium bromide 3–4 μg mL⁻¹; Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda), and were warmed to 31°C, filtered and re-circulated.

Electrophysiological data acquisition. The central end of the cut left phrenic nerve (PN) was recorded (1700 amplifier; A-M Systems, Sequim, WA, USA) using a bipolar glass suction electrode mounted on 3D micromanipulator (YOU-1; Narishige, Setagaya, Japan); its activity was used as an index of inspiration. Whole-cell, patch clamp recordings were made to analyse the membrane potential (*V_m*) trajectory, electrophysiological properties, as well as the frequency and amplitude of spontaneous excitatory (sEPSCs) and inhibitory (sIPSCs) post-synaptic currents bombarding the pF_L expiratory neurones. Whole-cell recordings of RTN neurones were also made to analyse their resting membrane potential (RMP) and firing frequency. Electrodes (5.5–6.5 MΩ) were filled with four different solutions (in mM): (i) 135 potassium gluconate, 10 KCl, 1 MgCl₂, 0.3 CaCl₂, 10 Hepes, 1 EGTA, 2 Na-ATP and 0.25 Na-GTP for recording excitatory synaptic events, *V_m* and action potentials, as well as leak and hyperpolarisation-activated currents; (ii) 145 KCl, 1 MgCl₂, 0.3 CaCl₂, 10 Hepes, 1 EGTA, 2 Na-ATP and 0.25 Na-GTP for recording inhibitory synaptic events; (iii) 110 CsCl₂, 30 TEA, 2 CaCl₂, 5 EGTA, 1 MgCl₂, 2 Na-ATP, 0.25 Na-GTP, 0.25 and 10 Hepes for recording Ca²⁺ currents; and (iv) 30 K₄-BAPTA, 20 potassium gluconate, 10 NaCl, 10 Hepes, 2 MgCl₂, 50 sucrose, 2 Na-ATP, and 0.25 Na-GTP for recording *V_m* and action potentials when buffering the intracellular [Ca²⁺]. The tips of pipettes were filled with intracellular solutions and backfilled with the same solutions containing 0.2% of biocytin (Molecular Probes) to identify the location of the soma from the recorded pF_L and RTN neurones. No more than one neurone in each *in situ* preparation was recorded/labelled per experiment. In the experiments involving the identification of the axonal projections of pF_L neurones, a period of 3 h was allowed for intracellular transport of biocytin to their terminals before fixation (see below). Electrodes were positioned into the ventral medullary surface using a micromanipulator (PatchStar; Scientifica, Uckfield, UK) under visual control (microscope; Seiler, St Louis, MO, USA) using surface landmarks (trapezoid body, basilar artery and roots of the hypoglossal nerve). pF_L expiratory neurones were identified 0.3–0.5 mm caudal to the trapezoid body, 2.2–2.7 mm lateral to the midline and 25–600 μm beneath the ventral surface, whereas the RTN neurones were identified

0.4–0.5 mm caudal to the trapezoid body, 1.6–1.8 mm lateral to the midline and 10–400 μm beneath the ventral surface, as described previously (de Britto & Moraes, 2017).

Voltage (–70 mV) and current clamp experiments were performed (Axopatch-200B; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Glutamatergic sEPSCs were isolated by locally applying GABA_A and the glycinergic receptor antagonists picrotoxin (30 μM ; Sigma-Aldrich) and strychnine (1 μM ; Sigma-Aldrich), respectively. GABAergic sIPSCs were isolated by locally applying a solution containing strychnine, 6-cyano-7-nitroquinoline-2,3-dione (CNQX, 10 μM ; Sigma-Aldrich) and D-2-amino-5-phosphonovalerate (AP5, 20 μM ; Sigma-Aldrich). Glycinergic IPSCs were isolated by locally applying a solution containing picrotoxin, CNQX and AP5. The drugs were locally applied using a perforated pressure ring placed on the brainstem surface where the pial membrane was removed (Richter *et al.* 1996).

HCN channels were activated using a series of hyperpolarising voltage pulses (from –70 mV to –120 mV, in increments of 10 mV), whereas low voltage-activated (LVA) T-type Ca²⁺ channels were activated using a series of depolarising voltage pulses (from –80 mV to 30 mV, in increments of 10 mV) in the presence of TTX (0.5 μM ; Tocris Bioscience, Abingdon, UK), to block voltage-gated Na⁺ channels, which was added to the perfusion solution. Leak currents were evaluated using slow voltage ramps (30 mV s^{–1}; –120 mV to –10 mV) and isolated pharmacologically using blockers of voltage-gated Ca²⁺ (CdCl₂: 200 μM ; Sigma-Aldrich) and K⁺ channels [(tetraethyl ammonium chloride: 10 mM; Sigma-Aldrich) (4-aminopyridine: 5 mM; Sigma-Aldrich)], as well as HCN (ZD7288: 40 μM ; Tocris Bioscience) and inwardly rectifying K⁺ channels (BaCl₂: 200 μM ; Sigma-Aldrich). These drugs were added to the perfusion solution. The intrinsic electrophysiological properties (see below) and sensitivity to CO₂/[H⁺], as well as the HCN, LVA T-type and leak channels, were also evaluated in the presence of blockers of fast synaptic transmission in the perfusion solution (picrotoxin, strychnine, CNQX and AP5). Riluzole (20 μM ; Tocris Bioscience) was used as an inhibitor of I_{NaP}, whereas NiCl₂ (50 μM ; Sigma-Aldrich) was used as a blocker of LVA T-type Ca²⁺ channels added to the perfusion solution. All signals were amplified, filtered [(PN: band-pass filter – 300 Hz to 5 kHz) (neurone: low pass filter – 2 kHz)] and acquired (sample frequency – PN: 5 kHz; neurone: 10 kHz) with an A/D converter (Digidata 1440A; Molecular Devices), using pClamp acquisition software (Molecular Devices).

Data analysis. The data were analysed using Clampfit (Molecular Devices), Mini Analysis (Synaptosoft Inc., Fort

Lee, NJ, USA) and Origin (OriginLab; Northampton, MA, USA). PN burst activity was considered as the inspiratory phase. The time interval between consecutive PN bursts was considered as the expiration phase, which was divided into two equally segments: first, post-inspiration, and second, expiratory phase 2. The sEPSCs and sIPSCs at these three phases of the respiratory cycle were analysed to measure their frequency (Hz) and amplitude (pA). The V_m was analysed at these three phases of the respiratory cycle. The current–voltage (I – V) relationship of the I_h was determined from the steady-state current measured at the end of the hyperpolarising voltage steps, whereas the Ca²⁺ current was determined from the peak current after the capacitive transient. The voltage dependence of I_h activation was obtained from normalised currents and fitted with an equation of the form: $I/I_{\text{max}} = 1/(1 + \exp[(V_m - V_{0.5})/k])$, where $V_{0.5}$ is the voltage at half-maximal conductance and k is the slope factor (Moraes *et al.* 2013). The voltage dependence of activation of Ca²⁺ currents was estimated by fitting the following Boltzmann function to the I – V relationship: $I = G_{\text{max}} + (G_{\text{min}} - G_{\text{max}}) / (1 + \exp[(V_m - V_{0.5})/k]) (V - V_r)$, where I denotes the peak current obtained in response to each voltage pulse, G_{max} is the maximal conductance, G_{min} is the minimal conductance, V_m is the clamped voltage, V_r is the estimated reversal potential, $V_{0.5}$ the voltage giving half of the response on the I – V relationship and k is a slope factor related to the voltage dependence of the system (Costa & Varanda, 2007). Leak conductance (g_{Leak}) was calculated by linear regression to the slope of the linear region of the membrane I – V relationship (–100 mV to –70 mV). K⁺ equilibrium potential (E_{K^+}) was obtained from the Nernst equation (Hille, 2011): $E_{K^+} = -RT/zF \cdot \ln([K^+]^o/[K^+]^i)$, which yielded values of $E_{K^+} = -92.51$ mV, for the K⁺ concentrations in the intracellular and extracellular recording solutions ($[K^+]^i = 145$ mM; $[K^+]^o = 4.25$ mM). The intrinsic electrophysiological properties measured were: (i) firing frequency; (ii) RMP; (iii) input resistance (R_i); (iv) amplitude of the after-hyperpolarisation potential (AHP); (v) action potential (AP) half-width, threshold and amplitude; and (vi) numbers of spikes in response to depolarising current injection (2 s). RMP was assessed using a cumulative histogram (bin width 0.5 s) from 30 s of V_m recordings (Pires da Silva *et al.* 2016). The R_i was calculated by linear regression applied to the linear portion of the voltage–current relationship obtained in response to different levels of hyperpolarising currents (2 s). AP amplitude was measured as peak amplitude of AP from the AP threshold, whereas AP half-width was measured as the AP width at the half-maximal voltage. The AHP was measured by subtracting the peak amplitude of the hyperpolarising deflection after the AP from the RMP. The AP threshold was obtained by the phase plane plot (Pires da Silva *et al.* 2016).

Single-cell qRT-PCR. The pipette solution containing the cytoplasmic material of the recorded neurone was collected from the patch pipette. The solution was placed into a microtube containing High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit reagents (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for reverse transcription in a thermocycler (ProFlex PCR System; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). cDNA preamplification was performed using the TaqMan PreAmp Master Mix Kit (Life Technologies) and the probes: Rn00584780_m1 (Vglut2), Rn00690300_m1 (glutamic acid decarboxylase 67; Gad67), Rn00561244_m1 (glutamic acid decarboxylase 65; Gad65), Rn01475607_m1 (glycine transporter 2; Glyt2), Rn00562500_m1 (tyrosine hydroxylase; TH), Rn01453446_m1 (choline acetyltransferase; ChAT), Rn01413076_mH (Phox2b), Rn01478123_m1 (Nmb), Rn00670384_m1 (HCN1), Rn01408572_mH (HCN2), Rn00586666_m1 (HCN3), Rn00572232_m1 (HCN4), Rn01505208_m1 (voltage-gated Ca²⁺ channel T-type alpha subunit 3.1; Cav3.1), Rn01460348_m1 (voltage-gated Ca²⁺ channel T-type alpha subunit 3.2; Cav3.2), Rn01299126_m1 (voltage-gated Ca²⁺ channel T-type alpha subunit 3.3; Cav3.3), Rn04223042_m1 (TASK1), Rn01755927_m1 (TASK2), Rn00755967_m1 (TASK3), Rn00597042_m1 (twik-related K⁺ channel 1; TREK1), Rn00596555_m1 (Na⁺ leak channel; Nalcn), Rn02585915_s1 (GPR4) and NM_031144.2 (β -actin; housekeeping gene), as described previously (Pires da Silva *et al.* 2016). The single-cell qRT-PCR was performed in singleplex (only one gene was amplified in each well) and triplicate (StepOnePlus System; Applied Biosystems) using the same probes and a TaqMan Universal PCR Master Mix kit (Life Technologies). The cytoplasmic material from each neurone was used to evaluate the amplification of different probes (up to five) and only a given combination of probes was tested in each neurone. Therefore, different combinations of probes to evaluate the neuronal phenotype and expression of ion channels or receptor were applied in different neurones. Four combinations of probes were used to evaluate the neuronal phenotype (β -actin + Vglut2 + Gad67; β -actin + Vglut2 + Glyt2; β -actin + Phox2b + Gad65 + Vglut2; β -actin + TH + ChAT + Nmb) and the expression of ion channels or receptor (β -actin + HCN1 + HCN2 + HCN3 + HCN4; β -actin + Cav3.1 + Cav3.2 + Cav3.3; β -actin + TASK1 + TASK3 + TREK1; β -actin + TASK2 + Nalcn + GPR4) in pFL expiratory neurones. A combination of probes was used to evaluate the neuronal phenotype and the expression of ion channel or receptor (β -actin + Phox2b + Nmb + TASK2 + GPR4) in RTN neurones. The relative quantitation of ion channel or receptor expression was determined by the threshold cycle (Ct) in each neurone and normalised to the housekeeping gene Ct (Δ Ct = Ct ion channel or receptor – Ct β -actin).

Histology

At the end of the electrophysiological recordings, the preparations were perfused with PBS (0.1 M) and then 4% of paraformaldehyde in PBS at 4°C. The brainstem and spinal cord were removed and fixed in paraformaldehyde overnight at 4°C. Transverse sections (40 μ m thickness) were cut using a cryostat (CM1800; Leica, Buffalo Grove, IL, USA) through the parafacial region for the identification of the location of pFL and RTN neurones (biocytin-positive). In labelled neurones for which abdominal premotor neurones were retrogradely labelled, we mapped the projections to cVRG (CTB-positive), as well as evaluated the location of CTB microinjections in the lower thoracic spinal cord segments. The sections were collected in a cryoprotectant solution (0.1 M PBS, 0.3% ethylene glycol and 0.2% glycerol) and stored at 20°C before further processing. Sections containing the recorded RTN neurones were blocked and permeabilised in PBS containing 10% normal horse serum and 0.5% Triton X-100 for 1 h at room temperature and then incubated in primary antibody rabbit anti-Phox2b (dilution 1:800; gift from J.-F. Brunet, Ecole Normale Supérieure, Paris, France) for 24 h at 4°C. The brainstem sections were incubated in secondary antibodies Alexa 488-conjugated streptavidin (pFL and RTN neurones; dilution 1:1000; Molecular Probes) and Alexa 647-conjugated goat anti-rabbit (only RTN neurones; dilution 1:500; Molecular Probes) for 1 h at room temperature. All sections were mounted in Fluoromount (Sigma-Aldrich). Images were collected on a TCS SP5 confocal microscope (Leica) equipped with 488 and 633 lasers lines and tunable emission wavelengths detections.

Statistical analysis

The results are presented as the mean \pm SD. Distributions of data were tested using a Shapiro–Wilk normality test before being compared using a paired parametric Student's *t* test, a paired non-parametric Wilcoxon test (when a Gaussian distribution could not be assumed) or one-way ANOVA with repeated measures and a Bonferroni *post hoc* test in accordance with the experimental protocol (Prism 8; GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). *P* < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Location, phenotype and projections of pFL expiratory neurones

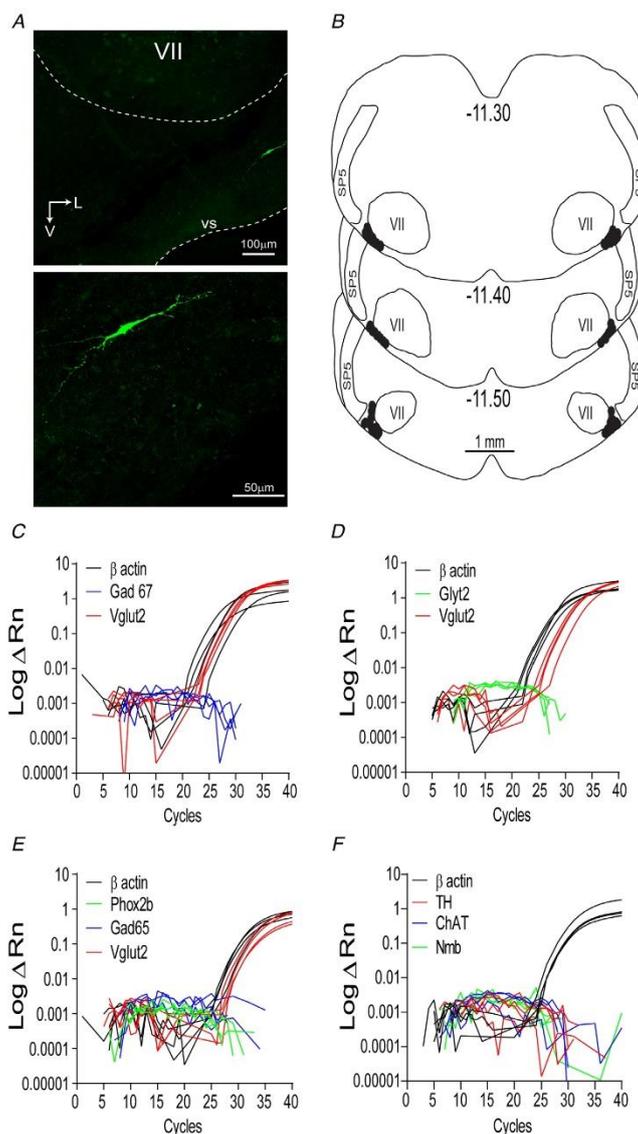
We used intracellular labelling in combination with single cell qRT-PCR to determine the location and neurotransmitter phenotype, respectively, of the recorded

expiratory neurones. All recorded expiratory neurones (65 neurones from 65 animals) were located within the parafacial region and ventral to the lateral aspect of the facial motor nucleus (Fig. 1A). All neurones were located rostral to the caudal end of the facial

motor nucleus (from 11.30 to 11.50 mm caudal to bregma), 25–600 μm beneath the ventral surface and 2.2–2.7 mm lateral to the midline (Fig. 1B), which is consistent with the location of pF_L region in juvenile rats (Moraes *et al.* 2012; Moraes *et al.* 2014a, 2014b; de Britto

Figure 1. Location and phenotype of pF_L expiratory neurones

A, coronal section of the medulla showing a representative expiratory neurone located within the pF_L region labelled with biocytin (–11.50 mm from bregma; 100 μm rostral to the caudal pole of facial motor nucleus – VII) at 20 \times (upper) and 63 \times (lower) magnifications. vs, ventral medullary surface; V, ventral; L, lateral. B, schematic drawings of coronal sections of the brainstem showing the location of labelled pF_L expiratory neurones (–11.30 mm and –11.50 mm from Bregma; 300–100 μm rostral to the caudal pole of VII) following published co-ordinates (Paxinos & Watson, 2006). SP5, spinal trigeminal tract. C, average of the qRT-PCR amplification plots of β -actin, Gad67 and Vglut2 of 4 pF_L expiratory neurones from four animals. The fluorescence emission (ΔRn) is plotted against the number of cycles. Note that these neurones express Vglut2, but not Gad67. D, average of the qRT-PCR amplification plots of β -actin, Glyt2 and Vglut2 of another four expiratory neurones from four animals expressing Vglut2, but not Glyt2. E, average of the qRT-PCR amplification plots of β -actin, Phox2b, Gad65 and Vglut2 of another four expiratory neurones from four animals expressing Vglut2, but not Phox2b or Gad65. F, average of the qRT-PCR amplification plots of β -actin, TH, ChAT and Nmb of another four expiratory neurones from four animals indicating an absence of expression of TH, ChAT or Nmb in these neurones. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]



& Moraes, 2017). We collected the patch pipette solution containing the cytoplasmic material of 16 pF_L expiratory neurones to analyse their phenotype by mRNA expression. These neurones contained Vglut2 mRNA (12 neurones from 12 animals), but not Gad67 (four neurones from four animals), Glyt2 (four neurones from four animals), Phox2b (four neurones from four animals), Gad65 (four neurones from four animals), TH (four neurones from four animals), ChAT (four neurones from four animals) or Nmb (four neurones from four animals), indicating that they are excitatory, non-cholinergic, non-adrenergic (Fig. 1C–F) and different from the RTN Phox2b and Nmb positive neurones described by others (Guyenet & Bayliss, 2015; Shi *et al.* 2017). Three hours were allowed for intracellular transport of biocytin to axonal terminals in 10 pF_L expiratory neurones from 10 animals. We found projections to the ipsilateral cVRG region in all neurones analysed (Fig. 2A). We also identified the bulbospinal neurones of cVRG, defined by the retrograded labelling from the lower thoracic spinal cord (Fig. 2B–D), in three of these 10 animals. Close appositions were observed between

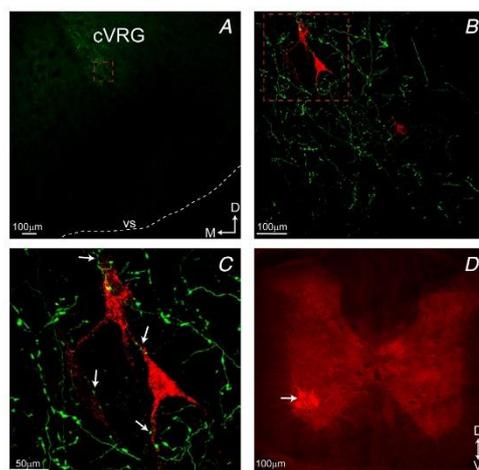


Figure 2. Projections of pF_L expiratory neurones

A, coronal section (–14.10 mm from bregma) of the medulla showing the projections of a pF_L expiratory neurone (green – biocytin) to the cVRG. vs, ventral medullary surface; D, dorsal; M, medial. B, magnification of the red square from (A) showing the putative abdominal premotor neurones retrogradely labelled with CTB (red) in the cVRG. C, magnification of the red square from (B) showing close appositions (arrows) between the fibres from the pF_L expiratory neurone and putative abdominal premotor neurones. D, spinal cord (T12) coronal section showing the location of CTB microinjection (arrow) in the ventral horn to label the premotor neurones in the cVRG. V, ventral. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

the pF_L expiratory neurones axonal boutons and cVRG presumptive abdominal neurones (Fig. 2C). The 10 neurones described in the histological analyses above were subjected to the following functional and molecular tests: (i) seven neurones were used to analyse the effects of CO₂ on their V_m and firing frequency before and after synaptic isolation and the mRNA expression for Vglut2 (n = 7), Gad67 (n = 4) and Glyt2 (n = 3) and (iii) three neurones were used to analyse the effects of CO₂ before and [H⁺] after synaptic isolation on their V_m, RMP and firing frequency and the mRNA expression for TH, ChAT and Nmb.

Membrane potential trajectories and synaptic inputs to pF_L expiratory neurones

As shown in Fig. 3Aa, the expiratory neurones (23 neurones from 23 animals) displayed a rapid onset of depolarisation (-51.2 ± 3.9 mV) that occurred immediately after the end of inspiration (post-inspiration) and a depolarising envelope (-46.3 ± 3.4 mV) at expiratory phase 2 during normocapnia. These neurones also displayed a decremting hyperpolarisation during inspiration (-58.3 ± 2.4 mV). Effects of hypercapnia on the V_m trajectories of these 23 neurones were examined (Fig. 3) and produced a significant hyperpolarisation of the V_m throughout inspiration (-72.5 ± 2.6 mV; $P < 0.0001$). The V_m at both the post-inspiration (-45 ± 2.8 mV; $P < 0.0001$) and expiratory phase 2 (-39.5 ± 3.1 mV; $P < 0.0001$) shifted to more positive values. The later was followed by several action potentials (27.4 ± 7.4 Hz) with a declining pattern of firing (adaptation) at the end of expiratory phase 2 (Fig. 3Aa and Ab), consistent with a role in active expiration.

We next determined the synaptic mechanisms operating during normocapnia and hypercapnia in pF_L expiratory neurones (16 neurones from 16 animals). GABAergic sIPSCs (six neurones from six animals) were observed only during inspiration (Fig. 4Aa and Ab). During this phase, the frequency of GABAergic sIPSCs was increased in the presence of hypercapnia (44.2 ± 8.7 vs. 21.2 ± 5.5 Hz; $P = 0.0009$), although their amplitude was not altered (-32.2 ± 5.9 vs. -29.2 ± 4.4 pA; $P = 0.46$) (Fig. 4Aa–Bb). By contrast, glycinergic sIPSCs (five neurones from five animals) were observed during both inspiration and post-inspiration (Fig. 4Ca–Cc). The frequency of these sIPSCs was increased in the presence of hypercapnia during inspiration (32.7 ± 8.8 vs. 17.7 ± 5.2 Hz; $P = 0.01$), whereas they were reduced during post-inspiration (23 ± 7.1 vs. 39.4 ± 12.6 Hz; $P = 0.01$) (Fig. 4Ca–Db). The amplitude of glycinergic sIPSCs during both inspiration (-32.9 ± 7.7 vs. -28.9 ± 7.1 pA; $P = 0.42$) and post-inspiration (-33 ± 7.8 vs. -30.9 ± 5.4 pA; $P = 0.61$) was not affected by

hypercapnia (Fig. 4Ca–Cf, Dc and Dd). Glutamatergic sEPSCs (five neurones from five animals) were observed during the different phases of the respiratory cycle but neither their frequency (13.6 ± 6.7 vs. 12.4 ± 2.9 Hz; $P = 0.75$), nor amplitude (-29.8 ± 7.2 vs. -26.9 ± 3.5 pA; $P = 0.56$) (Fig. 4Ea–Fb) were altered by hypercapnia.

Intrinsic electrophysiological properties of pFL expiratory neurones

pFL expiratory neurones had a capacitance of 32.9 ± 4.7 pF (65 neurones from 65 animals). The intrinsic electrical properties of 17 neurones from 17 animals were analysed further. After synaptic isolation from fast excitatory and inhibitory transmission (see Methods), neurones fired spontaneously action potentials (8.5 ± 2.4 Hz); bursting behaviour was never seen (Fig. 5A). After synaptic isolation, neurones had a RMP of -51.2 ± 4.2 mV, AHP amplitude of 4.6 ± 1.1 mV, and AP half-width, threshold and amplitude of 1.2 ± 0.4 ms, -31.6 ± 4.1 mV and 60.7 ± 9.6 mV, respectively (Fig. 5B). When tested with depolarising current injection (2s, 100 pA), neurones exhibited 73.7 ± 23 spikes (Fig. 5C), with a pattern of spike frequency adaptation (Fig. 5D). The time constant (ms) derived from single exponential fits to the instantaneous frequency and interspike interval were 667.5 ± 100.3 and 658 ± 111.3 , respectively (Fig. 5D). When tested with

hyperpolarising current injections, these neurones presented a R_i of 0.36 ± 0.1 G Ω (Fig. 5E). High-frequency burst of action potentials (post-inhibitory rebound; PIR), with a pattern of spike frequency adaptation, was observed after release from a hyperpolarising current (bias current to -70 mV) using both fast (Δ : 42.3 ± 9.9 Hz) or slow (Δ : 41.3 ± 15.8 Hz) depolarisation rate (Fig. 5Fa and Fb). The addition of NiCl_2 ($50 \mu\text{M}$; four neurones from four animals) to block LVA T-type Ca^{2+} channels abolished the PIR and reduced the number of action potentials at the end of the hyperpolarising current (10 ± 1 vs. 44.3 ± 6.8 Hz; $P = 0.001$; paired Student's t test) (Fig. 5Fa and G). With larger amplitudes of hyperpolarising current, expiratory neurones presented a depolarising sag (at 100 mV: 11.1 ± 2.5 mV) (Fig. 5G). The addition of ZD7288 ($40 \mu\text{M}$; four neurones from four animals) to block HCN channels reduced the depolarising sag in the expiratory neurones (1.4 ± 0.5 vs. 12 ± 2.4 mV; $P = 0.003$; paired Student's t test) (Fig. 5G and H).

Subthreshold membrane properties of pFL expiratory neurones

Hyperpolarising voltage steps were used to activate HCN channels in five neurones from five animals, which revealed slowly activating inward currents (I_h ; at 120 mV: -130.8 ± 40.2 pA; $V_{0.5}$: -106.1 ± 6.4 mV; k : -17.1 ± 3.5)

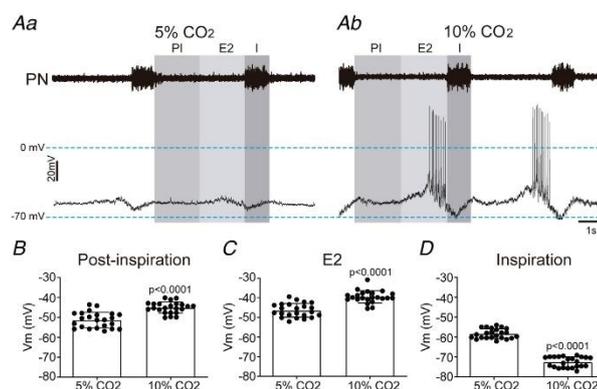


Figure 3. Membrane potential trajectory of pFL expiratory neurones during normocapnia and hypercapnia

Raw records of PN activity and current clamp records of membrane potential (V_m) trajectory and action potentials of a pFL expiratory neurone during normocapnia (5% CO_2) (Aa) and hypercapnia (10% CO_2) (Ab). Note a hyperpolarisation at inspiration (I) and depolarisation at post-inspiration (PI), as well as action potentials at the end of expiratory phase 2 (E2) during hypercapnia. Grouped data of the V_m during post-inspiration (B) (paired Student's t test), expiratory phase 2 (C) (paired Student's t test) and inspiration (D) (paired Wilcoxon test) of expiratory neurones during normocapnia and hypercapnia (23 neurones from 23 animals). Note that hypercapnia depolarised the V_m of pFL expiratory neurones during both post-inspiration and expiratory phase 2, but hyperpolarised it during inspiration. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

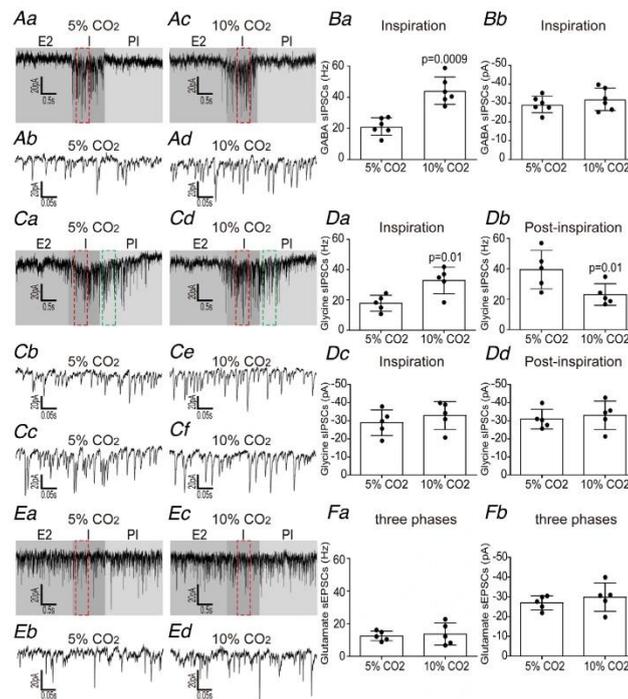


Figure 4. Respiratory cycle related inhibitory and excitatory synaptic inputs to pF₁ expiratory neurones during normocapnia and hypercapnia

Aa, voltage clamp records of GABAergic sIPSCs during normocapnia (5% CO₂). Ab, magnification of GABAergic sIPSCs at inspiration (I) during normocapnia (red box in Aa). Ac, voltage clamp records of GABAergic sIPSCs during hypercapnia (10% CO₂). Ad, magnification of GABAergic sIPSCs at inspiration during hypercapnia (red box in Ac). Grouped data of inspiratory GABAergic sIPSCs frequency (Ba; paired Student's *t* test) and amplitude (Bb; paired Student's *t* test) during normocapnia and hypercapnia (six neurones from six animals). Note that hypercapnia increased the inspiratory GABAergic sIPSCs frequency but did not affect their amplitude. Ca, voltage clamp records of glycinergic sIPSCs during normocapnia. Cb, magnification of glycinergic sIPSCs at inspiration during normocapnia (red box in Ca). Cc, magnification of glycinergic sIPSCs at post-inspiration (PI) during normocapnia (green box in Ca). Cd, voltage clamp records of glycinergic sIPSCs during hypercapnia. Ce, magnification of glycinergic sIPSCs at inspiration during hypercapnia (red box in Cd). Cf, magnification of glycinergic sIPSCs at post-inspiration during hypercapnia (green box in Cd). Grouped data of glycinergic sIPSCs frequency (Da and Db; paired Student's *t* test) and amplitude (Dc and Dd; paired Student's *t* test) at inspiration and post-inspiration, respectively, during normocapnia and hypercapnia (five neurones from five animals). Note that hypercapnia increased the inspiratory glycinergic sIPSCs frequency but reduced it at post-inspiration. Glycinergic sIPSCs amplitude was not affected by hypercapnia. Ea, voltage clamp records of glutamatergic sEPSCs during normocapnia and its (Eb) magnification (red box in Ea). Voltage clamp records of glutamatergic sEPSCs during hypercapnia (Ec) and its (Ed) magnification (red box in Ec). Grouped data of glutamatergic sEPSCs frequency (Fa; paired Student's *t* test) and amplitude (Fb; paired Student's *t* test) during normocapnia and hypercapnia (five neurones from five animals). Glutamatergic sEPSCs were not affected by hypercapnia. E2, expiratory phase 2. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

(Fig. 6A and B). The cytoplasm of these neurones was collected and the mRNA expression of HCN 1–4 channel isoforms was evaluated. Large variability in the expression of mRNA of the channel isoforms was seen, even though HCN 2 was the most expressed isoform in expiratory

neurones from the pF₁ region (Table 1). In another group of six neurones from six animals, LVA T-type Ca²⁺ channels were activated using depolarising pulses (Fig. 6C). On average, the peak activation of LVA T-type Ca²⁺ channels in the expiratory neurones was at –20 mV

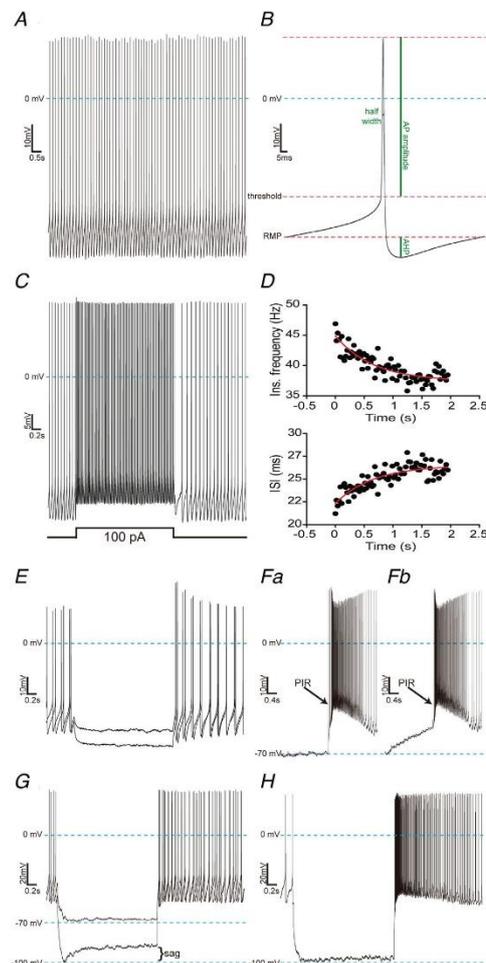


Figure 5. Intrinsic electrophysiological properties of pFL expiratory neurones

A, spontaneous action potentials from a pFL expiratory neurone after fast synaptic transmission isolation. B, an average waveform of the action potentials from (A) depicting the AHP, RMP, AP amplitude, half-width and threshold. C, evoked action potentials in response to depolarising current (excitability) after blockade of fast synaptic transmission in the same neurone from (A). Note that regular firing is elicited when the neurone is depolarised from its RMP. D, plots of the instantaneous firing frequency vs. time (upper) and interspike interval (ISI) vs. time (lower), from the neurone in (C), in response to depolarising current. The decay (upper) and rise (lower) time constants were derived from single exponential curves fitting (red lines). E, membrane potential (V_m) responses to hyperpolarising currents (-20 and -40 pA), in the same neurone from (C), used to

calculate the R_i . High-frequency burst of action potentials (post-inhibitory rebound; PIR), with a pattern of spike frequency adaptation, was observed after a hyperpolarising current (bias current to -70 mV) using both fast (Fa) or slow (Fb) depolarisation rate after fast synaptic transmission isolation, suggesting the presence of LVA T-type Ca^{2+} channels. G, V_m responses to hyperpolarising currents (bias currents to -70 mV and -100 mV), in the same neurone from (F), after perfusion of NiCl_2 ($50 \mu\text{M}$), which eliminated the PIR. Note that, upon larger hyperpolarising current (bias current to -100 mV), the V_m of the expiratory neurone presented a shift toward more positive values (sag), as a time-dependent conductance (HCN channels) was slowly turned on. H, V_m response to hyperpolarising current (bias currents to -100 mV), in another expiratory neurone, after fast synaptic transmission isolation and perfusion of ZD7288 ($40 \mu\text{M}$), which significantly reduced the depolarising sag but did not affect the PIR. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

(-51 ± 10 pA) and the values of $V_{0.5}$ and k were -32.3 ± 1.5 mV and -7.7 ± 0.6 , respectively (Fig. 6D). The single cell analyses of mRNA expression revealed that all expiratory neurones evaluated expressed the $\text{Ca}_v3.1$ and 3.2 , but not 3.3 , isoforms of LVA T-type Ca^{2+} channels (Table 2).

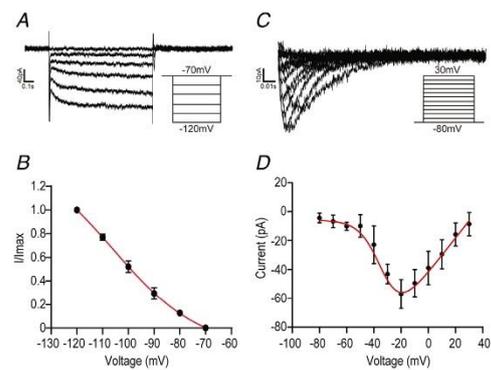


Figure 6. HCN and LVA T-type Ca^{2+} channels in pFL expiratory neurones

A, hyperpolarising voltage steps (-10 mV increments) from a holding potential of -70 mV evoked a time-dependent inward I_h in a pFL expiratory neurone after fast synaptic transmission isolation. B, $I-V$ relationship of the normalised steady-state portion of the averaged I_h (five neurones from five animals). The red continuous line corresponds to fit with an equation of the form showing the voltage dependence of I_h . C, Ca^{2+} currents, mediated by LVA T-type channels, obtained from another expiratory neurone using a series of depolarising command pulses (10 mV increments) from a hyperpolarising conditioning pulse of -80 mV after fast synaptic transmission isolation. D, average peak amplitudes of the evoked currents as a function of the command potential (six neurones from six animals). The red continuous line corresponds to fit of a Boltzmann function showing the voltage dependence of the Ca^{2+} currents. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Table 1. The proportion of HCN channels expression in single pFL expiratory neurones

| | pFL neurones | | | | |
|------|--------------|------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| HCN1 | | | 3.48 | 3.5 | |
| HCN2 | 2.8 | | 5.37 | 6.36 | 8.12 |
| HCN3 | | 7.79 | 3.6 | | 6.25 |
| HCN4 | | | 5.71 | | |

Five neurones from five animals were analysed. The numbers represent the Ct of the ion channels, described on the left for each neurone, which is normalised to the housekeeping gene Ct ($\Delta Ct = Ct \text{ ion channel} - Ct \beta\text{-actin}$). The empty squares indicate below detection threshold

Table 2. The proportion of LVA T-type Ca^{2+} channels expression in single pFL expiratory neurones

| | pFL neurones | | | | | |
|--------|--------------|------|------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Cav3.1 | 5.75 | 5.7 | 5.55 | 5.57 | 5.76 | 5.93 |
| Cav3.2 | 7.73 | 7.58 | 7.7 | 7.74 | 9.73 | 9.73 |
| Cav3.3 | | | | | | |

Six neurones from six animals were analysed. The numbers represent the Ct of the ion channels, described on the left side for each neurone, which is normalised to the housekeeping gene Ct ($\Delta Ct = Ct \text{ ion channel} - Ct \beta\text{-actin}$). The empty squares indicate below detection threshold.

We also evaluated the subthreshold membrane properties of 10 pFL expiratory neurones from 10 animals using slow voltage ramps (30 mV s^{-1}) (Fig. 7A). $I-V$ relationships for expiratory neurones were evaluated in the presence of blockers of voltage-gated Ca^{2+} and K^+ channels, as well as non-selective cationic HCN channels. The $I-V$ relationship was linear at hyperpolarised voltages and exhibited outward rectification at depolarised voltages (Fig. 7A). g_{Leak} ($0.7 \pm 0.2 \text{ nS}$) was determined by linear regression to the slope of the passive region (-110 to -70 mV) of the $I-V$ relationship (Fig. 7A). The total leak current in all neurones examined had a reversal potential ($E_{\text{Leak}} - 0$ current intercept) of $-82 \pm 2.5 \text{ mV}$ (from -78.9 to -86.9 mV), which was slightly more depolarised than that calculated for E_{K^+} (-92.5 mV), indicating that g_{Leak} was K^+ -dominated (Fig. 7A). The single cell analyses of mRNA expression revealed that the pFL expiratory neurones expressed TREK1 (four neurones from four animals) and Nalcn (six neurones from six animals) channels, but not TASK1 (four neurones from four animals), TASK2 (six neurones from six

Table 3. The proportion of K^+ leak channels expression in single pFL expiratory neurones

| | pFL neurones | | | |
|-------|--------------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| TASK1 | | | | |
| TASK3 | | | | |
| TREK1 | 4.35 | 4.45 | 8.67 | 8.47 |

Four neurones from four animals were analysed. The numbers represent the Ct of the ion channel, described on the left side for each neurone, which is normalised to the housekeeping gene Ct ($\Delta Ct = Ct \text{ ion channel} - Ct \beta\text{-actin}$). The empty squares indicate below detection threshold.

Table 4. The proportion of Na^+ and K^+ leak channels, as well as H^+ -activated G protein-coupled receptor expression in single pFL expiratory neurones

| | pFL neurones | | | | | |
|-------|--------------|------|------|------|------|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| TASK2 | | | | | | |
| Nalcn | 2.93 | 2.73 | 2.67 | 3.22 | 3.44 | 3.8 |
| GPR4 | | | | | | |

Six neurones from six animals were analysed. The numbers represent the Ct of the ion channel, described on the left side for each neurone, which is normalised to the housekeeping gene Ct ($\Delta Ct = Ct \text{ ion channel} - Ct \beta\text{-actin}$). The empty squares indicate below detection threshold.

animals) or TASK3 (four neurones from four animals) (Tables 3 and 4).

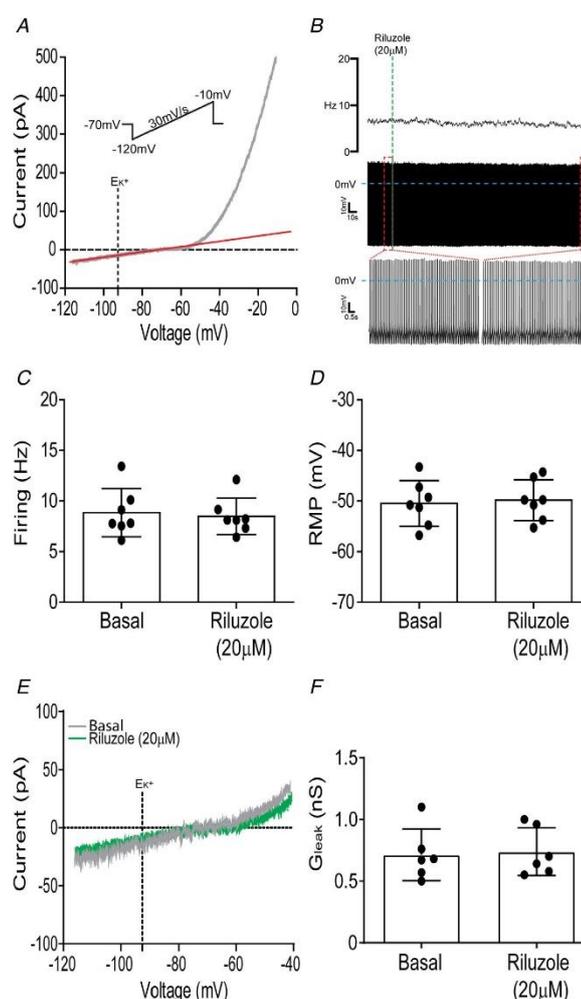
Previous studies proposed that voltage-gated TTX-sensitive Na^+ channels, mediating the I_{NaP} , were implicated in the intrinsic rhythmic bursting properties of expiratory neurones in the pFL region of juvenile rats (Wittmeier *et al.* 2008; Molkov *et al.* 2010). However, negative slope region (inward current) between -60 mV and -40 mV was not observed in the $I-V$ relationships from expiratory neurones, suggesting an absence of the I_{NaP} (Fig. 7A and E). We then evaluated the effects of riluzole ($20 \mu\text{M}$), which completely inhibited I_{NaP} in ventral medullary neurones (Del Negro *et al.* 2005; Koizumi & Smith, 2008; Moraes *et al.* 2013), on the tonic firing frequency of seven expiratory neurones from seven animals after synaptic isolation (Fig. 7B). Riluzole affected neither the firing frequency (8.4 ± 1.8 vs. $8.8 \pm 2.3 \text{ Hz}$; $P = 0.4$), nor the RMP (-49.8 ± 4 vs. $-50.4 \pm 4.5 \text{ mV}$; $P = 0.76$) of expiratory neurones (Fig. 7C and D), which confirmed the absence of I_{NaP} . In addition, this concentration of riluzole did not affect the K^+ -dominated g_{Leak} (0.7 ± 0.1 vs. $0.7 \pm 0.2 \text{ nS}$; $P = 0.66$; six neurones from six animals) (Fig. 7E and F).

Intracellular $[Ca^{2+}]$ and generation of expiratory activity in pFL neurones

Considering the expression of LVA T-type Ca^{2+} channels and the presence of PIR in the pFL expiratory neurones, we evaluated the role of intracellular $[Ca^{2+}]$, using a high concentration of intracellular BAPTA (30 mM), in the generation of their expiratory activity in response to hypercapnia (Fig. 8Aa–Ac). After rupturing the membrane and establishing whole cell dialysis for

~20 min (six neurones from six animals), BAPTA significantly hyperpolarised the V_m of the expiratory neurones at the expiratory phase 2 (-53.3 ± 2.3 vs. -39.3 ± 2.8 mV; $P = 0.0001$), which eliminated the action potentials, without affecting the V_m during both inspiration (-71.7 ± 2.7 vs. -72.3 ± 2.1 mV; $P = 0.31$) and post-inspiration (-45.3 ± 2.6 vs. -46.6 ± 3.3 mV; $P = 0.28$) in response to hypercapnia (Fig. 8B–E). These results demonstrated that intracellular $[Ca^{2+}]$ determines

Figure 7. K^+ -dominated leak currents and absence of I_{NaP} in pFL expiratory neurones
A, I - V relationship from a representative pFL expiratory neurone in response to a slow voltage ramp protocol in the presence of blockers of fast synaptic transmission, voltage-gated Ca^{2+} and K^+ channels, as well as non-selective cationic HCN channels. g_{Leak} was calculated by linear regression (red line) to the slope of the linear region of the membrane I - V relationship (-100 mV to -70 mV). The calculated E_{K^+} (-92.51 mV) for the recording conditions is indicated. Note the absence of the negative slope region (inward current) between -60 mV and -40 mV, suggesting an absence of the I_{NaP} . **B**, current clamp records and the instantaneous firing frequency (Hz), after fast synaptic transmission isolation, of a representative pFL expiratory neurone during normocapnia before and after riluzole ($20 \mu\text{M}$) perfusion. Magnifications from 10 s of membrane potential and firing frequency records at the end of each experimental condition (before and after riluzole – red boxes) are shown. Grouped data of the firing frequency (**C**) (paired Student's t test) and RMP (**D**) (paired Student's t test) of expiratory neurones during normocapnia before and after riluzole (seven neurones from seven animals). Note that riluzole affected neither the firing frequency nor the RMP of expiratory neurones. **E**, I - V relationship from another representative pFL expiratory neurone in response to a slow voltage ramp protocol, in the presence of the same blockers used in (**A**), before and after riluzole. **F**, grouped data of the g_{Leak} of expiratory neurones before and after riluzole (paired Student's t test; six neurones from six animals). Note that riluzole did not affect the g_{Leak} of expiratory neurones. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]



the expiratory activity of the neurones in the pFL region during hypercapnia

Absence of CO₂/[H⁺] intrinsic sensitivity in pFL expiratory neurones

To test whether pFL expiratory neurones are intrinsic sensors of CO₂/[H⁺], we exposed them to hypercapnia/acidosis and hypocapnia/alkalosis by altering CO₂ (seven neurones from seven animals) or the pH (six neurones from six animals) using both HCO₃⁻-buffered and HEPES-buffered perfusion solutions in the presence of blockers of fast synaptic transmission to eliminate the influence of the brainstem respiratory network. An example of an expiratory neurone is shown in Fig. 9A. This neurone fired at ~8 Hz in a standard perfusion solution that was bubbled with 5% CO₂ (normocapnia) and buffered using 24 mM HCO₃⁻. Both the firing frequency and RMP were unchanged when CO₂ was either increased to 10% [hypercapnia; (firing frequency: 8.4 ± 3.4 vs. 8.5 ± 3.3 Hz; *P* > 0.99) (RMP: -51.7 ± 4.1 vs. -52.6 ± 4.5 mV; *P* > 0.99)] or decreased to 1% [hypo-

capnia; (firing frequency: 8.2 ± 3.3 vs. 8.5 ± 3.3 Hz; *P* = 0.54) (RMP: -50.8 ± 4.1 vs. -52.6 ± 4.5 mV; *P* = 0.79)], indicating that pFL expiratory neurones do not possess intrinsic CO₂ sensitivity (Fig. 9).

Another example of an expiratory neurone is shown in Fig. 10A. This neurone fired at ~7 Hz in a HEPES-buffered perfusion solution with pH adjusted to 7.4. Both the firing frequency and RMP were unchanged when pH was either decreased to 7.1 [acidosis; (firing frequency: 7.1 ± 1.6 vs. 6.8 ± 1.5 Hz; *P* > 0.99) (RMP: -50.6 ± 1.7 vs. -51.2 ± 1.7 mV; *P* > 0.99)] or increased to 8.1 [alkalosis; (firing frequency: 7.2 ± 1.7 vs. 6.8 ± 1.5 Hz; *P* = 0.85) (RMP: -51 ± 2.2 vs. -51.2 ± 1.7 mV; *P* > 0.99)], indicating that pFL expiratory neurones do not possess intrinsic pH sensitivity (Fig. 10). In addition, the single cell analyses of mRNA expression revealed that the pFL expiratory neurones did not express GPR4 (six neurones from six animals) (Table 4), which has been associated with 'chemosensitivity' in neighbouring regions (Kumar *et al.* 2015).

We corded six neurones from six animals in the RTN. All recorded neurones were located within the parafacial region, being ventral to the medial aspect of the facial

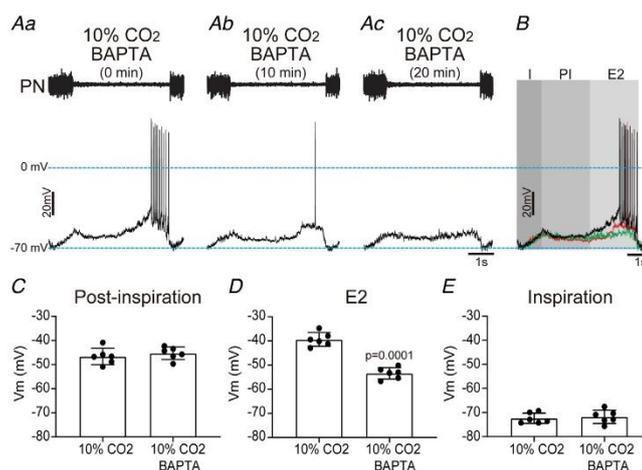


Figure 8. Intracellular [Ca²⁺] is important for the expiratory activity of pFL expiratory neurones

Raw records of PN activity and current clamp records of membrane potential (*V_m*) trajectory and action potentials of a pFL expiratory neurone during hypercapnia (10% CO₂) before (Aa), 10 min (Ab) and 20 min (Ac) after intracellular dialysis of a high concentration of BAPTA (30 mM). B, superposition of the *V_m* trajectory and action potentials of the same expiratory neurone from (A) before (black), 10 min (red) and 20 min (green) after BAPTA dialysis. Note that, once BAPTA was introduced into the neurone cytosol via patch rupture (0 min), a progressive hyperpolarisation of the neurone *V_m* at the expiratory phase 2 (E2) was observed, which eliminated action potentials. Grouped data of the *V_m* during post-inspiration (C) (paired Student's *t* test), expiratory phase 2 (D) (paired Student's *t* test) and inspiration (E) (paired Student's *t* test) of expiratory neurones immediately after patch rupture and 20 min after intracellular dialysis of BAPTA during hypercapnia (six neurones from six animals). Note that BAPTA dialysis hyperpolarised the *V_m* of the expiratory neurones during expiratory phase 2, without affecting it during both inspiration (I) and post-inspiration (PI). [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

motor nucleus and rostral to the caudal end of the facial motor nucleus (from 11.40 to 11.50 mm caudal to bregma), 10–400 μm beneath the ventral surface and 1.6–1.8 mm lateral to the midline (Fig. 11A). These six neurones expressed both Phox2b protein and mRNA, as well as mRNA for Nmb (Fig. 11B and C). Hypercapnia

produced a significant increase in their firing frequency (11.7 ± 1.4 vs. 2.8 ± 0.5 Hz; $P < 0.0001$; paired Student's *t* test); bursting behaviour was never seen in any phase of respiratory cycle (Fig. 11Da and Db). We next tested whether these six RTN neurones are intrinsic sensors of CO_2 by exposing them to hypercapnia (10% CO_2)

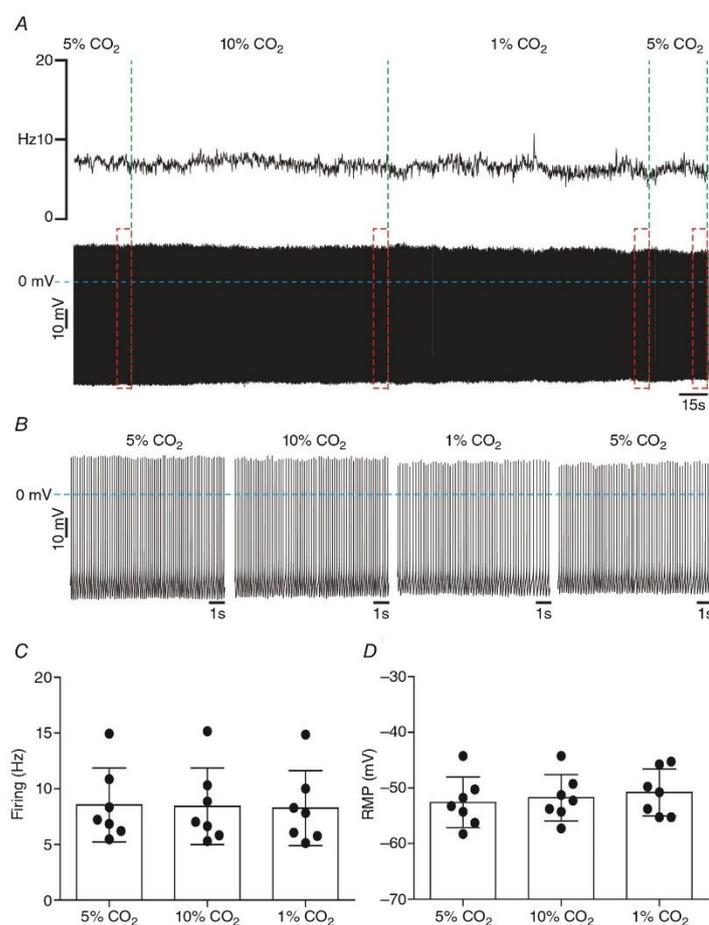


Figure 9. Lack of intrinsic CO_2 sensitivity in the pFL expiratory neurones

A, current clamp records and instantaneous firing frequency (Hz) of a representative pFL expiratory neurone during normocapnia (5% CO_2), hypercapnia (10% CO_2) and hypocapnia (1% CO_2) after blockade of fast synaptic transmission. B, magnifications from 10 s of membrane potential and action potential records at the end of each experimental condition (red boxes in A). Grouped data of the firing frequency (C) (one-way ANOVA with repeated measures and Bonferroni *post hoc* test) and RMP (D) (one-way ANOVA with repeated measures and Bonferroni *post hoc* test) of expiratory neurones during normocapnia, hypercapnia and hypocapnia (seven neurones from seven animals). Note that neither hypercapnia, nor hypocapnia affected the firing frequency or RMP of expiratory neurones. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

using HCO_3^- -buffered perfusion solution in the presence of blockers of fast synaptic transmission. An example of a RTN neurone is shown in Fig. 12A. This neurone fired at ~ 4 Hz in HCO_3^- -buffered solution bubbled with 5% CO_2 (normocapnia). Hypercapnia increased their firing frequency (13.2 ± 2.2 vs. 3.9 ± 1.1 Hz; $P < 0.0001$)

and depolarised RMP (-49.6 ± 2.1 vs. -57.8 ± 1.9 mV; $P = 0.0009$), indicating that the recorded RTN neurones possess intrinsic CO_2 sensitivity (Fig. 12). Their firing frequency (4.4 ± 1 vs. 3.9 ± 1.1 Hz; $P > 0.99$) and RMP (-56.7 ± 3.5 vs. -57.8 ± 1.9 mV; $P > 0.99$) were normalised by re-exposing them to normocapnia

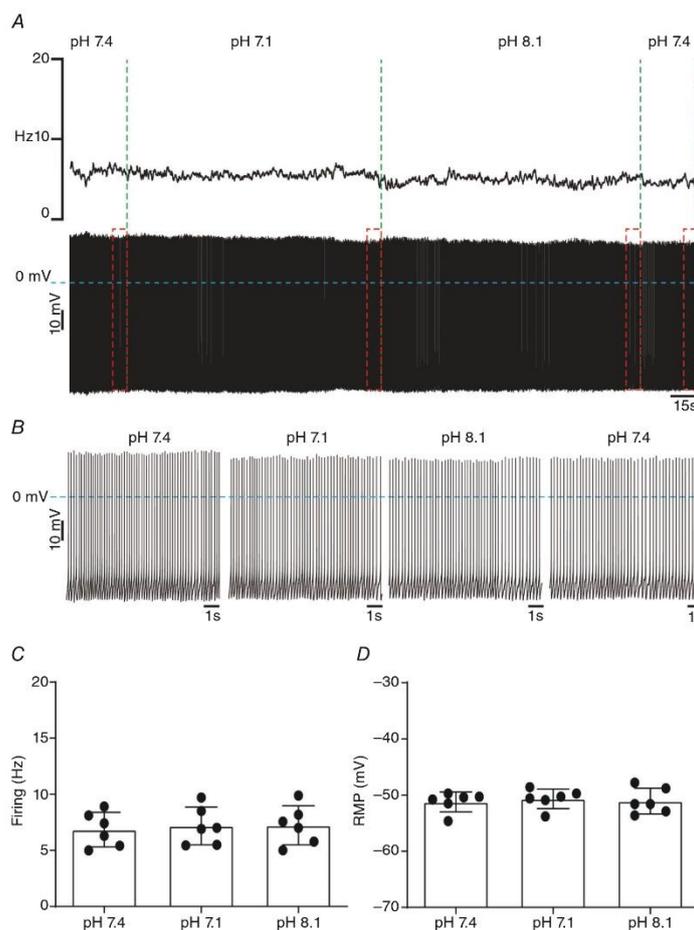


Figure 10. Lack of intrinsic $[\text{H}^+]$ sensitivity in the pFL expiratory neurones

A, current clamp records and the instantaneous firing frequency (Hz) of a representative pFL expiratory neurone in a HEPES-buffered perfusion solution with pH adjusted to 7.4, 7.1 (acidosis) and 8.1 (alkalosis) after blockade of fast synaptic transmission. B, magnifications from 10 s of membrane potential and action potentials records at the end of each experimental condition (red boxes in A). Grouped data of the firing frequency (C) (one-way ANOVA with repeated measures and Bonferroni *post hoc* test) and RMP (D) (one-way ANOVA with repeated measures and Bonferroni *post hoc* test) of expiratory neurones during pH of 7.4, 7.1 and 8.1 (six neurones from six animals). Note that neither acidosis, nor alkalosis affected the firing frequency or RMP of expiratory neurones. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

(Fig. 12). In addition, the single cell analyses of mRNA expression revealed that these RTN neurones express TASK2 and GPR4 (six neurones from six animals) (Table 5).

Discussion

We have demonstrated that pF_L expiratory neurones are glutamatergic, but do not express TH, ChAT or

the markers of neurones from epF, pFRG and RTN (Phox2b, Nmb, TASK or GPR4), and that phasic respiratory-related post-synaptic inhibition (glycinergic and GABAergic) suppresses their activity in normocapnia. The mechanisms for their bursting behaviour at the end of expiratory phase 2 during hypercapnia involve post-synaptic disinhibition and not direct synaptic excitation. T-type LVA Ca²⁺ channels, intracellular [Ca²⁺] and PIR were found to shape their firing pattern. In addition, neither intrinsic bursting activity, nor intrinsic

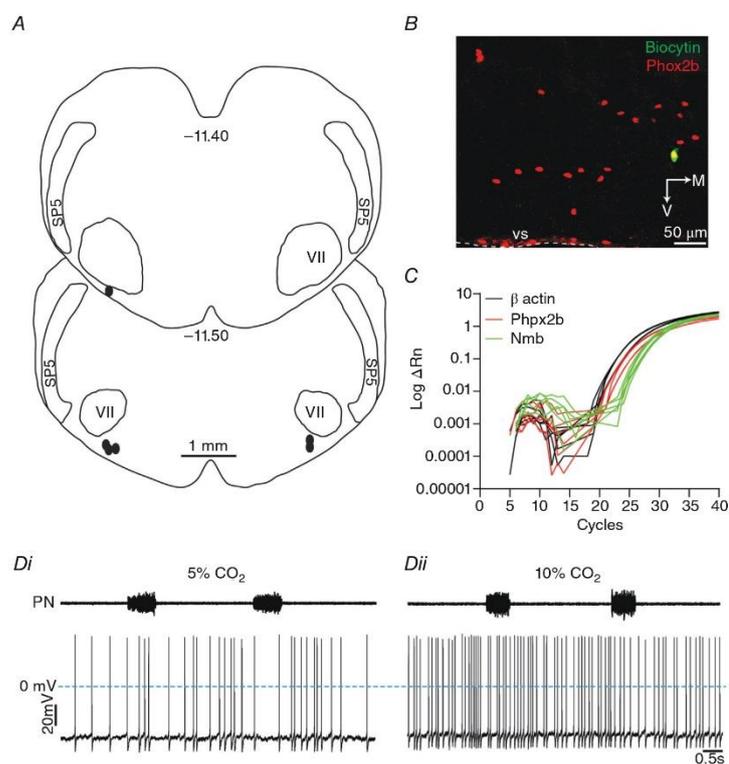


Figure 11. Location and phenotype of RTN neurones and the effects of hypercapnia on their firing frequency

A, schematic drawings of coronal sections of the brainstem showing the location of labelled RTN neurones (–11.40 mm and –11.50 mm from Bregma; 200–100 μ m rostral to the caudal pole of facial motor nucleus – VII) following published co-ordinates (Paxinos & Watson, 2006). SP5, spinal trigeminal tract. B, coronal section of the medulla (–11.50 mm from Bregma; 100 μ m rostral to the caudal pole of VII) showing a representative RTN neurone labelled with biocytin (green) and the Phox2b immunofluorescence (red). Note the Phox2b immunostaining in the nucleus of the labelled RTN neurone (yellow). vs, ventral medullary surface; V, ventral; M, medial. C, average of the qRT-PCR amplification plots of β -actin, Phox2b and Nmb of six RTN neurones from six animals. The fluorescence emission (Δ Rn) is plotted against the number of cycles. Note that these neurones express Phox2b and Nmb. Raw records of PN activity and current clamp records of membrane potential and action potentials of a RTN neurone during normocapnia (5% CO₂; Da) and hypercapnia (10% CO₂; Db). Note the increase in the firing frequency during hypercapnia, indicating the CO₂ sensitivity. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

$\text{CO}_2/[\text{H}^+]$ sensitivity was observed after isolation from fast synaptic transmission.

pF_{L} expiratory neurones were held silent (hyperpolarised) during normocapnia as a result of post-synaptic inhibition. This is consistent with previous studies showing that bilateral disinhibition of pF_{L} evoked phasic expiratory neuronal activity locally (Pagliardini *et al.* 2011;

de Britto & Moraes, 2017). Voltage clamp experiments revealed the presence of GABAergic synaptic inhibition during inspiration and glycinergic inhibition occurring at both inspiration and post-inspiration. These synaptic drives determined the respiratory-related V_{m} oscillations of pF_{L} expiratory neurones during normocapnia. A possible origin for these synaptic drives during inspiration

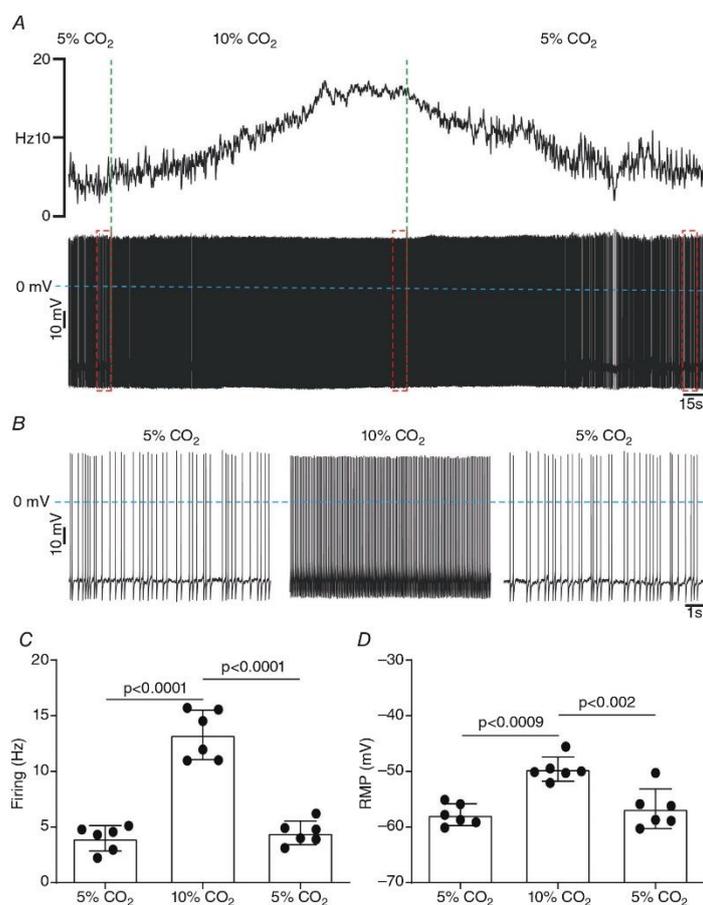


Figure 12. Intrinsic CO_2 sensitivity in the RTN neurones

A, current clamp records and instantaneous firing frequency (Hz) of a representative RTN neurone during normocapnia (5% CO_2) and hypercapnia (10% CO_2) after blockade of fast synaptic transmission. B, magnifications from 10 s of membrane potential and action potentials records at the end of each experimental condition (red boxes in A). Grouped data of the firing frequency (C) (one-way ANOVA with repeated measures and Bonferroni *post hoc* test) and RMP (D) (one-way ANOVA with repeated measures and Bonferroni *post hoc* test) of RTN neurones during normocapnia and hypercapnia (six neurones from six animals). Note that hypercapnia increased the firing frequency and depolarised the RMP of RTN neurones, indicating their intrinsic CO_2 sensitivity. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Table 5. The proportion of K⁺ leak channel and H⁺-activated G protein-coupled receptor expression in single RTN neurones

| | RTN neurones | | | | | |
|-------|--------------|------|------|------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| TASK2 | 2.95 | 2.65 | 2.59 | 2.61 | 2.37 | 2.3 |
| GPR4 | 3.32 | 3.2 | 3.02 | 3.13 | 2.96 | 2.83 |

Six neurones from six animals were analysed. The numbers represent the Ct of the ion channel or the receptor, described on the left side for each neurone, which is normalised to the housekeeping gene Ct ($\Delta\text{Ct} = \text{Ct ion channel or receptor} - \text{Ct } \beta\text{-actin}$)

is the preBötC because it contains GABAergic and glycinergic neurones that project to the pFL region (Koizumi *et al.* 2013; Yang & Feldman, 2018; Biancardi *et al.* 2020). Hypercapnia increases the firing frequency of inspiratory preBötC neurones both directly and indirectly via central chemoreceptor activation (Solomon *et al.* 2000; Abbott *et al.* 2009; Koizumi *et al.* 2010; Guyenet, 2014). Therefore, the enhancement of synaptic inhibition to pFL expiratory neurones during inspiration in response to hypercapnia is probably related to activation of both GABAergic and glycinergic inspiratory neurones in the preBötC.

The Bötzing complex (i.e. BötC) contains post-inspiratory neurones that are implicated in the control of the expiratory phase duration (Richter & Smith, 2014; Del Negro *et al.* 2018). These neurones are predominantly glycinergic in rats (Ezure *et al.* 2003). Thus, we propose that the inhibitory glycinergic post-inspiratory neurones from BötC provide phasic inhibition to pFL expiratory neurones during post-inspiration. This is consistent with recent data showing that activation of BötC eliminated active expiration (Flor *et al.* 2020) and that BötC glycinergic neurones project to pFL region (Biancardi *et al.* 2020). Based on our electrophysiological data, we hypothesise that these inhibitory connections prevent the bursting in the pFL expiratory neurones until the end of expiratory phase 2 during hypercapnia and ensures their quiescence during normocapnia. During hypercapnia, these expiratory neurones escape glycinergic inhibition during post-inspiration, generating burst activities at the end of expiration phase 2. We propose that the BötC glycinergic post-inspiratory neurones are directly hyperpolarised by hypercapnia (Kawai *et al.* 1996), thus reducing the synaptic inhibition of pFL expiratory neurones during this phase of the respiratory cycle, as well as the post-inspiratory phase duration (Abdala *et al.* 2009; de Britto & Moraes, 2017). It is worth noting that the pFL region contains GABAergic and glycinergic interneurones (Biancardi *et al.* 2020) and a local inhibitory network

may also contribute to the silencing of the expiratory neurones during normocapnia, although their firing pattern (tonic or respiratory-modulated) has not been described.

The present study demonstrates that the bursting and underlying depolarising envelope of pFL neurones at the end of expiratory phase 2 is not dependent on the presence synaptic excitation because an enhancement of the sEPSCs was never observed in any phase of the respiratory cycle during hypercapnia. Besides, it is improbable that these recorded sEPSCs are driving the expiratory bursting during hypercapnia as a result of increases in R_i , as a consequence of inhibitory drive relaxation, otherwise firing frequency should also occur during post-inspiration, when the frequency of glycinergic sIPSCs was reduced. Although we cannot rule out the presence of sEPSCs on distal dendrites, we are confident that synaptic excitation is not important for the expiratory bursting in the pFL neurones because an antagonist of ionotropic glutamatergic receptors did not affect their firing (de Britto & Moraes, 2017). On the other hand, a recent study identified strong projections from the RTN glutamatergic Phox2b positive neurones to the pFL region (Biancardi *et al.* 2020) and these projections have been proposed as direct anatomical evidence for the excitatory drive from central chemoreceptors for mediating active expiration (Huckstepp *et al.* 2015; Zoccal *et al.* 2018; Takakura *et al.* 2021). Based on our electrophysiological data, the RTN Phox2b neurones probably mediate active expiration via connections with other neurones of the pFL region, rather than expiratory neurones, or even by direct connections to bulbospinal premotor neurones in the cVRG, as demonstrated recently (Souza *et al.* 2020).

Recent *in silico* studies have proposed an I_{NaP} -dependent mechanism for the putative intrinsic bursting behaviour of pFL expiratory neurones in juvenile rats (Wittmeier *et al.* 2008; Abdala *et al.* 2009; Molkov *et al.* 2010). Our experiments show an absence of both intrinsic rhythmogenic bursting properties and I_{NaP} in pFL neurones of juvenile rats. In addition, riluzole at 20 μM , which inhibits I_{NaP} (Del Negro *et al.* 2005; Koizumi & Smith, 2008; Moraes *et al.* 2013) and activates TREK2 channels (Kim *et al.* 2011) in other neurones, did not affect the tonic firing of pFL expiratory neurones after synaptic isolation or g_{Leak} . Therefore, the emergence of the phasic activity of pFL expiratory neurones induced by hypercapnia does not rely on the intrinsic neuronal oscillations, which is distinct to the mechanisms demonstrated for inspiratory preBötC oscillatory neurones *in vitro* (Smith *et al.* 1991; Koizumi & Smith, 2008) and those generating gasping *in situ* (Paton *et al.* 2006; St-John *et al.* 2009). This is consistent with recent data showing that the pFL region does not induce phasic expiratory activity (active expiration) in the absence of the preBötC

activity (Huckstepp *et al.* 2016). Despite similar values of capacitance, glutamatergic pFL expiratory neurones are more depolarised and have higher R_i than the glutamatergic preBötC inspiratory neurones (Koizumi *et al.* 2013). These differences might be explained by the higher values of K^+ -dominated g_{Leak} described in the glutamatergic preBötC neurones (Koizumi *et al.* 2013). Therefore, the cellular data demonstrate that these two neuronal populations have distinct electrophysiological properties that determine their burst generation whether this be intrinsic (preBötC) or conditional (pFL).

pFL expiratory neurones express TREK1 mRNA and exhibit a classic leak current, which is essentially linear over a subthreshold voltage range, after blocking several voltage-gated channels. The present data suggest that there is a relatively small contribution of cationic inward current that opposes the outward K^+ current in establishing E_{Leak} . This may arise from a non-selective cation conductance mediated by Nalcn, which is expressed by RTN and preBötC neurones (Shi *et al.* 2016; Yeh *et al.* 2017), and revealed in pFL expiratory neurones in the present study. K^+ -dominated leak currents play important roles in the control of RMP, AP properties, neuronal excitability and are targets for actions of neuromodulators (Talley *et al.* 2000; Talley & Bayliss, 2002; Lesage, 2003). Leak K^+ -currents are often formed by the K2P channel subunits (Patel & Honore, 2001). Among them, the TASK channels are widely expressed in the brainstem and mediate a major component of g_{Leak} , as well as the $CO_2/[H^+]$ sensitivity, of the respiratory neurones and motoneurones (Bayliss *et al.* 2001; Washburn *et al.* 2002; Lesage, 2003; Washburn *et al.* 2003; Berg *et al.* 2004; Koizumi *et al.* 2010; Wang *et al.* 2013; Bayliss *et al.* 2015). However, expression of TASK1, TASK2 and TASK3 mRNA was not observed in pFL expiratory neurones, supporting our conclusion that they are not chemo-sensitive.

We recorded I_h and described the presence of depolarising sag in pFL expiratory neurones. This current might be involved in the integration of excitatory synaptic inputs, as well as in preventing prolonged or excessive hyperpolarisation in response to inhibitory synaptic events in pFL expiratory neurones, as demonstrated in other neurones (Maccaferri *et al.* 1993; Magee, 1999). We also described the presence of the four (HCN 1–4) channel isoforms, which differ in the activation and deactivation properties, and sensitivity to voltage and cAMP (Combe & Gasparini, 2021), suggesting that the HCN channels could form heteromers in the pFL expiratory neurones. The HCN channels are also targets for actions of neuromodulators of the central generation of active expiration. Muscarinic receptor activation in the pFL region recruited the expiratory neurones and induced long lasting rhythmic active expiration in rats (Boutin *et al.* 2017). These receptors, mediated by activation

of phospholipase C, directly enhance the opening of HCN1 and HCN2 channels (Pian *et al.* 2007). Therefore, the possible functional implication of HCN channels modulation by acetylcholine in the pFL region bears some similarity to the effects of reducing post-synaptic inhibition to the expiratory neurones in response to hypercapnia (increases in neuronal excitability), which may give an indication of the mechanisms involved.

A depolarisation followed by bursts of action potentials (PIR), as well as Ca^{2+} currents mediated by LVA channels and T-type $Ca_v3.1/3.2$ isoforms, was also observed in pFL expiratory neurones. PIR plays an important role for the rhythmic breathing pattern by contributing to burst initiation following phasic neuronal inhibition (Richter *et al.* 1993; Sun *et al.* 2008; Moraes & Machado, 2015). Previous studies have demonstrated that activation of LVA T-type Ca^{2+} channels mediates PIR (Matsushima *et al.* 1993; Tegner *et al.* 1997), whereas knockout of the $Ca_v3.1$ isoform abolished this phenomenon (Kim *et al.* 2001). Our experiments revealed that Cav3.2 isoform is mediating PIR and shaping the firing pattern of pFL expiratory neurones because it is the only isoform of LVA T-type Ca^{2+} channels sensitive to $50 \mu M$ $NiCl_2$ (Kang *et al.* 2006). LVA T-type Ca^{2+} channels are usually activated between -70 mV and -50 mV (Perez-Reyes, 2003) with the activation and inactivation curves producing a window current (range of voltages that these channels can open, but do not inactivate completely) peaking at -37 mV (Perez-Reyes, 2003; Costa & Varanda, 2007). This indicates that a fraction of channels is ready to open at this voltage, which is close to that recorded during expiratory phase 2 (-39 mV), just before the expiratory neurones bursts during hypercapnia. It is possible that activation of LVA T-type Ca^{2+} channels, followed by post-synaptic disinhibition, induces PIR at stage 2 of expiration in pFL expiratory neurones, shifting the V_m towards the threshold for action potentials generation. We analysed the role of $[Ca^{2+}]$ in burst generation of expiratory neurones during hypercapnia using high concentration of intracellular BAPTA. This abolished bursting, without affecting the V_m during inspiration and post-inspiration. These data demonstrated that intracellular $[Ca^{2+}]$ predominantly contributes to bursting generation at expiratory phase 2 by boosting the transformation of post-synaptic disinhibition to membrane depolarisation. We cannot rule out the contribution of Ca^{2+} -activated non-specific cation current (I_{CAN}), which underlies the inspiratory drive potentials in preBötC neurones (Pace *et al.* 2007) and is directly activated by voltage-gated Ca^{2+} channels (Rekling & Feldman, 1997); an issue that requires further exploration. The presence of Ca^{2+} currents in expiratory neurones might also activate large-conductance Ca^{2+} activated K^+ channels, which control the neuronal firing frequency by generating spike

frequency adaptation (Lin *et al.* 2014; Moraes *et al.* 2014b), which we found in pF_L neurones.

pFRG and RTN contain neurones sensitive to CO₂/[H⁺] (Mulkey *et al.* 2004; Onimaru *et al.* 2008). These neurones express Phox2b and Nmb and are glutamatergic, projecting to the brainstem respiratory pattern generator (Stornetta *et al.* 2006; Onimaru *et al.* 2008; Shi *et al.* 2017). Activation of Phox2b and Nmb neurones potentiates the overall respiratory activity in adult rats and in *in vitro* preparations of neonatal rats (Abbott *et al.* 2009; Ikeda *et al.* 2019; Souza *et al.* 2020). This is consistent with the proposed role of central CO₂/[H⁺] sensors that function to provide tonic excitatory drive to the brainstem respiratory pattern generator (Guyenet, 2014). We observed that pF_L expiratory neurones are glutamatergic and do not possess intrinsic sensitivity to CO₂/[H⁺] in juvenile rats. They are located more lateral than the CO₂/[H⁺] sensitive Phox2b/Nmb neurones and do not contain Phox2b (de Britto & Moraes, 2017) or Nmb. In addition, the expression of CO₂/[H⁺] sensitive ion channels and receptors (TASK and GPR4) was never observed in the expiratory neurones. Considering that activation Phox2b/Nmb RTN neurones increases breathing by also evoking active expiration in rats (Souza *et al.* 2020), it is possible that a subset of the recorded pF_L CO₂/[H⁺] insensitive expiratory neurones express very low levels of Phox2b and Nmb mRNA, which were not detected in our single cell qRT-PCR analyses, although the Phox2b protein was never observed in these neurones (de Britto & Moraes, 2017). However, the vast majority of the transfected Nmb neurones reported in the study by Souza *et al.* (2020) were located more medial and caudal than the recorded pF_L expiratory neurones in the present study. Therefore, the described functional (chemosensitivity) and molecular (phenotype) differences between the pF_L expiratory and RTN neurones in the present study further strengthen the conclusions that these regions play distinct roles in control of breathing (Pisanski & Pagliardini, 2018; Takakura *et al.* 2021). Previous studies have demonstrated that the integrity of the pF_L region is important for the expression of active expiration in rats (Abdala *et al.* 2009; Huckstepp *et al.* 2015; de Britto & Moraes, 2017; Huckstepp *et al.* 2018). However, to date, no study has demonstrated the projections of pF_L expiratory neurones. We found that these neurones possess ipsilateral projections to cVRG with close appositions with presumptive abdominal premotor neurones; the latter is consistent with their role in active expiration. New studies are now required to investigate whether the cVRG targets of the RTN Phox2b/Nmb and the pF_L expiratory neurones are different, as well as the functional consequences of this.

In summary, the present study describes, for the first time, that pF_L expiratory neurones are glutamatergic but not chemosensitive (i.e. absence of intrinsic

CO₂/[H⁺] sensitivity) and that phasic respiratory-related post-synaptic disinhibition (glycinergic) determines their bursting behaviour at the end of expiration phase 2 during hypercapnia. Ca_v3.2 isoform of LVA T-type Ca²⁺ channels and intracellular [Ca²⁺] shape their phasic firing pattern, although intrinsic bursting activity was not observed. Therefore, the post-synaptic disinhibition of expiratory neurones and their intrinsic electrophysiological properties play essential roles in the generation of the expiratory oscillations in the pF_L region of rats in response to hypercapnia.

References

- Abbott SB, Stornetta RL, Fortuna MG, Depuy SD, West GH, Harris TE & Guyenet PG (2009). Photostimulation of retrotrapezoid nucleus phox2b-expressing neurons in vivo produces long-lasting activation of breathing in rats. *J Neurosci* **29**, 5806–5819.
- Abdala AP, Rybak IA, Smith JC & Paton JF (2009). Abdominal expiratory activity in the rat brainstem-spinal cord in situ: patterns, origins and implications for respiratory rhythm generation. *J Physiol* **587**, 3539–3559.
- Bayliss DA, Barhanin J, Gestreau C & Guyenet PG (2015). The role of pH-sensitive TASK channels in central respiratory chemoreception. *Pflugers Arch* **467**, 917–929.
- Bayliss DA, Talley EM, Sirois JE & Lei Q (2001). TASK-1 is a highly modulated pH-sensitive 'leak' K(+) channel expressed in brainstem respiratory neurons. *Respir Physiol* **129**, 159–174.
- Berg AP, Talley EM, Manger JP & Bayliss DA (2004). Motoneurons express heteromeric TWIK-related acid-sensitive K⁺ (TASK) channels containing TASK-1 (KCNK3) and TASK-3 (KCNK9) subunits. *J Neurosci* **24**, 6693–6702.
- Biancardi V, Saini J, Pageni A, Prashaad MH, Funk GD & Pagliardini S (2020). Mapping of the excitatory, inhibitory, and modulatory afferent projections to the anatomically defined active expiratory oscillator in adult male rats. *J Comp Neurol* **529**, 853–884.
- Boutin RC, Alshafiq Z & Pagliardini S (2017). Cholinergic modulation of the parafacial respiratory group. *J Physiol* **595**, 1377–1392.
- Combe CL & Gasparini S. (2021). Ih from synapses to networks: HCN channel functions and modulation in neurons. *Prog Biophys Mol Biol*.
- Costa RR & Varanda WA (2007). Intracellular calcium changes in mice Leydig cells are dependent on calcium entry through T-type calcium channels. *J Physiol* **585**, 339–349.
- da Silva MP, Moraes DJA, Bonagamba LGH, Mecawi AS, Varanda WA & Machado BH (2019). Hyperexcitability and plasticity induced by sustained hypoxia on rectus abdominis motoneurons. *J Physiol* **597**, 1935–1956.
- de Britto AA, Magalhaes KS, da Silva MP, Paton JFR & Moraes DJA (2020). Active expiratory oscillator regulates nasofacial and oral motor activities in rats. *Exp Physiol* **105**, 379–392.
- de Britto AA & Moraes DJ (2017). Non-chemosensitive parafacial neurons simultaneously regulate active expiration

- and airway patency under hypercapnia in rats. *J Physiol* **595**, 2043–2064.
- Del Negro CA, Funk GD & Feldman JL (2018). Breathing matters. *Nat Rev Neurosci* **19**, 351–367.
- Del Negro CA, Morgado-Valle C, Hayes JA, Mackay DD, Pace RW, Crowder EA & Feldman JL (2005). Sodium and calcium current-mediated pacemaker neurons and respiratory rhythm generation. *J Neurosci* **25**, 446–453.
- Ezure K, Tanaka I & Kondo M. (2003). Glycine is used as a transmitter by decrementing expiratory neurons of the ventrolateral medulla in the rat. *J Neurosci* **23**, 8941–8948.
- Flor KC, Barnett WH, Karlen-Amarante M, Molkov YI & Zoccal DB (2020). Inhibitory control of active expiration by the Botzinger complex in rats. *J Physiol* **598**, 4969–4994.
- Gestreau C, Heitzmann D, Thomas J, Dubreuil V, Bandulik S, Reichold M, Bendahhou S, Pierson P, Sterner C, Peyronnet-Roux J, Benfriha C, Tegmeier I, Ehnes H, Georgieff M, Lesage F, Brunet JF, Goridis C, Warth R & Barhanin J (2010). Task2 potassium channels set central respiratory CO₂ and O₂ sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 2325–2330.
- Grundy D (2015). Principles and standards for reporting animal experiments in The Journal of Physiology and Experimental Physiology. *J Physiol* **593**, 2547–2549.
- Guyenet PG (2014). Regulation of breathing and autonomic outflows by chemoreceptors. *Compr Physiol* **4**, 1511–1562.
- Guyenet PG & Bayliss DA (2015). Neural Control of Breathing and CO₂ Homeostasis. *Neuron* **87**, 946–961.
- Guyenet PG, Stornetta RL, Souza G, Abbott SBG, Shi Y & Bayliss DA (2019). The retrotrapezoid nucleus: central chemoreceptor and regulator of breathing automaticity. *Trends Neurosci* **42**, 807–824.
- Hille B (2011). *Ionic Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Huckstepp RT, Cardoza KP, Henderson LE & Feldman JL (2015). Role of parafacial nuclei in control of breathing in adult rats. *J Neurosci* **35**, 1052–1067.
- Huckstepp RT, Henderson LE, Cardoza KP & Feldman JL (2016). Interactions between respiratory oscillators in adult rats. *Elife* **5**.
- Huckstepp RTR, Cardoza KP, Henderson LE & Feldman JL (2018). Distinct parafacial regions in control of breathing in adult rats. *PLoS One* **13**, e0201485.
- Ikeda K, Igarashi H, Yawo H, Kobayashi K, Arata S, Kawakami K, Izumizaki M & Onimaru H (2019). Optogenetic analysis of respiratory neuronal networks in the ventral medulla of neonatal rats producing channelrhodopsin in Phox2b-positive cells. *Pflugers Arch* **471**, 1419–1439.
- Janczewski WA & Feldman JL (2006). Distinct rhythm generators for inspiration and expiration in the juvenile rat. *J Physiol* **570**, 407–420.
- Kang HW, Park JY, Jeong SW, Kim JA, Moon HJ, Perez-Reyes E & Lee JH (2006). A molecular determinant of nickel inhibition in Cav3.2 T-type calcium channels. *J Biol Chem* **281**, 4823–4830.
- Kawai A, Ballantyne D, Muckenhoff K & Scheid P (1996). Chemosensitive medullary neurons in the brainstem–spinal cord preparation of the neonatal rat. *J Physiol* **492**(Pt 1), 277–292.
- Kim D, Song I, Keum S, Lee T, Jeong MJ, Kim SS, McEnery MW & Shin HS (2001). Lack of the burst firing of thalamocortical relay neurons and resistance to absence seizures in mice lacking alpha(1G) T-type Ca(2+) channels. *Neuron* **31**, 35–45.
- Kim EJ, Kang D & Han J (2011). Baicalein and wogonin are activators of rat TREK-2 two-pore domain K⁺ channel. *Acta Physiol* **202**, 185–192.
- Koizumi H, Koshiya N, Chia JX, Cao F, Nugent J, Zhang R & Smith JC (2013). Structural-functional properties of identified excitatory and inhibitory interneurons within pre-Botzinger complex respiratory microcircuits. *J Neurosci* **33**, 2994–3009.
- Koizumi H, Smerin SE, Yamanishi T, Moorjani BR, Zhang R & Smith JC (2010). TASK channels contribute to the K⁺-dominated leak current regulating respiratory rhythm generation in vitro. *J Neurosci* **30**, 4273–4284.
- Koizumi H & Smith JC (2008). Persistent Na⁺ and K⁺-dominated leak currents contribute to respiratory rhythm generation in the pre-Botzinger complex in vitro. *J Neurosci* **28**, 1773–1785.
- Kumar NN, Velic A, Soliz J, Shi Y, Li K, Wang S, Weaver JL, Sen J, Abbott SB, Lazarenko RM, Ludwig MG, Perez-Reyes E, Mohebbi N, Bettoni C, Gassmann M, Suply T, Seuwen K, Guyenet PG, Wagner CA & Bayliss DA (2015). PHYSIOLOGY. Regulation of breathing by CO₂ requires the proton-activated receptor GPR4 in retrotrapezoid nucleus neurons. *Science* **348**, 1255–1260.
- Lesage F (2003). Pharmacology of neuronal background potassium channels. *Neuropharmacology* **44**, 1–7.
- Lin M, Hatcher JT, Würster RD, Chen QH & Cheng ZJ (2014). Characteristics of single large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels and their regulation of action potentials and excitability in parasympathetic cardiac motoneurons in the nucleus ambiguus. *Am J Physiol Cell Physiol* **306**, C152–C166.
- Maccaferri G, Mangoni M, Lazzari A & DiFrancesco D (1993). Properties of the hyperpolarization-activated current in rat hippocampal CA1 pyramidal cells. *J Neurophysiol* **69**, 2129–2136.
- Magee JC (1999). Dendritic Ih normalizes temporal summation in hippocampal CA1 neurons. *Nat Neurosci* **2**, 508–514.
- Matsushima T, Tegner J, Hill RH & Grillner S (1993). GABAB receptor activation causes a depression of low- and high-voltage-activated Ca²⁺ currents, postinhibitory rebound, and postspike afterhyperpolarization in lamprey neurons. *J Neurophysiol* **70**, 2606–2619.
- Miller AD (1987). Localization of motoneurons innervating individual abdominal muscles of the cat. *J Comp Neurol* **256**, 600–606.
- Molkov YI, Abdala AP, Bacak BJ, Smith JC, Paton JF & Rybak IA (2010). Late-expiratory activity: emergence and interactions with the respiratory CpG. *J Neurophysiol* **104**, 2713–2729.

- Moraes DJ, Bonagamba LG, Costa KM, Costa-Silva JH, Zoccal DB & Machado BH (2014a). Short-term sustained hypoxia induces changes in the coupling of sympathetic and respiratory activities in rats. *J Physiol* **592**, 2013–2033.
- Moraes DJ, da Silva MP, Bonagamba LG, Mecawi AS, Zoccal DB, Antunes-Rodrigues J, Varanda WA & Machado BH (2013). Electrophysiological properties of rostral ventrolateral medulla presympathetic neurons modulated by the respiratory network in rats. *J Neurosci* **33**, 19223–19237.
- Moraes DJ, Dias MB, Cavalcanti-Kwiatkoski R, Machado BH & Zoccal DB (2012). 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.
- Moraes DJ & Machado BH (2015). Electrophysiological properties of laryngeal motoneurons in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *J Physiol* **593**, 619–634.
- Moraes DJ, Machado BH & Paton JF (2014b). Specific respiratory neuron types have increased excitability that drive presympathetic neurones in neurogenic hypertension. *Hypertension* **63**, 1309–1318.
- Mulkey DK, Stornetta RL, Weston MC, Simmons JR, Parker A, Bayliss DA & Guyenet PG (2004). Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. *Nat Neurosci* **7**, 1360–1369.
- Onimaru H, Arata A & Homma I (1995). Intrinsic burst generation of preinspiratory neurons in the medulla of brainstem-spinal cord preparations isolated from newborn rats. *Exp Brain Res* **106**, 57–68.
- Onimaru H & Homma I (2003). A novel functional neuron group for respiratory rhythm generation in the ventral medulla. *J Neurosci* **23**, 1478–1486.
- Onimaru H, Ikeda K & Kawakami K (2008). CO₂-sensitive preinspiratory neurons of the parafacial respiratory group express Phox2b in the neonatal rat. *J Neurosci* **28**, 12845–12850.
- Onimaru H, Ikeda K, Mariho T & Kawakami K (2014). Cytoarchitecture and CO₂ sensitivity of Phox2b-positive parafacial neurons in the newborn rat medulla. *Prog Brain Res* **209**, 57–71.
- Onimaru H, Kumagawa Y & Homma I (2006). Respiration-related rhythmic activity in the rostral medulla of newborn rats. *J Neurophysiol* **96**, 55–61.
- Pace RW, Mackay DD, Feldman JL & Del Negro CA (2007). Inspiratory bursts in the preBotzinger complex depend on a calcium-activated non-specific cation current linked to glutamate receptors in neonatal mice. *J Physiol* **582**, 113–125.
- Pagliardini S, Janczewski WA, Tan W, Dickson CT, Deisseroth K & Feldman JL (2011). Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult anesthetized rats. *J Neurosci* **31**, 2895–2905.
- Patel AJ & Honore E (2001). Properties and modulation of mammalian 2P domain K⁺ channels. *Trends Neurosci* **24**, 339–346.
- Paton JF (1996). A working heart-brainstem preparation of the mouse. *J Neurosci Methods* **65**, 63–68.
- Paton JF, Abdala AP, Koizumi H, Smith JC & St-John WM (2006). Respiratory rhythm generation during gasping depends on persistent sodium current. *Nat Neurosci* **9**, 311–313.
- Paxinos G & Watson C (2006). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Cambridge, Massachusetts, EUA: Academic Press.
- Perez-Reyes E (2003). Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev* **83**, 117–161.
- Pian P, Bucchi A, Decostanzo A, Robinson RB & Siegelbaum SA (2007). Modulation of cyclic nucleotide-regulated HCN channels by PIP(2) and receptors coupled to phospholipase C. *Pflugers Arch* **455**, 125–145.
- Pires da Silva M, de Almeida Moraes DJ, Mecawi AS, Rodrigues JA & Varanda WA (2016). Nitric oxide modulates HCN channels in magnocellular neurons of the supraoptic nucleus of rats by an S-nitrosylation-dependent mechanism. *J Neurosci* **36**, 11320–11330.
- Pisanski A & Pagliardini S (2018). The parafacial respiratory group and the control of active expiration. *Respir Physiol Neurobiol*.
- Rekling JC & Feldman JL (1997). Calcium-dependent plateau potentials in rostral ambiguous neurons in the newborn mouse brain stem in vitro. *J Neurophysiol* **78**, 2483–2492.
- Richter DW, Champagnat J, Jacquin T & Benacka R (1993). Calcium currents and calcium-dependent potassium currents in mammalian medullary respiratory neurones. *J Physiol* **470**, 23–33.
- Richter DW, Pierrefiche O, Lalley PM & Polder HR (1996). Voltage-clamp analysis of neurons within deep layers of the brain. *J Neurosci Methods* **67**, 121–131.
- Richter DW & Smith JC (2014). Respiratory rhythm generation in vivo. *Physiology* **29**, 58–71.
- Shi Y, Abe C, Holloway BB, Shu S, Kumar NN, Weaver JL, Sen J, Perez-Reyes E, Stornetta RL, Guyenet PG & Bayliss DA (2016). Nalc1 is a “Leak” sodium channel that regulates excitability of brainstem chemosensory neurons and breathing. *J Neurosci* **36**, 8174–8187.
- Shi Y, Stornetta RL, Stornetta DS, Onengut-Gumuscus S, Farber EA, Turner SD, Guyenet PG & Bayliss DA (2017). Neuromedin B expression defines the mouse retrotrapezoid nucleus. *J Neurosci* **37**, 11744–11757.
- Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW & Feldman JL (1991). Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* **254**, 726–729.
- Solomon IC, Edelman NH & O’Neal MH, 3rd (2000). CO₂(2)/H(+) chemoreception in the cat pre-Botzinger complex in vivo. *J Appl Physiol* **88**, 1996–2007.
- Souza G, Stornetta RL, Stornetta DS, Abbott SGB & Guyenet PG (2020). Differential contribution of the retrotrapezoid nucleus and C1 neurons to active expiration and arousal in rats. *J Neurosci* **40**, 8683–8697.
- St-John WM, Stornetta RL, Guyenet PG & Paton JF (2009). Location and properties of respiratory neurones with putative intrinsic bursting properties in the rat in situ. *J Physiol* **587**, 3175–3188.

- Stornetta RL, Moreira TS, Takakura AC, Kang BJ, Chang DA, West GH, Brunet JF, Mulkey DK, Bayliss DA & Guyenet PG (2006). Expression of Phox2b by brainstem neurons involved in chemosensory integration in the adult rat. *J Neurosci* **26**, 10305–10314.
- Sun QJ, Berkowitz RG & Pilowsky PM (2008). GABA A mediated inhibition and post-inspiratory pattern of laryngeal constrictor motoneurons in rat. *Respir Physiol Neurobiol* **162**, 41–47.
- Takakura AC, Malheiros-Lima MR & Moreira TS (2021). Excitatory and inhibitory modulation of parafacial respiratory neurons in the control of active expiration. *Respir Physiol Neurobiol* **289**, 103657.
- Talley EM & Bayliss DA (2002). Modulation of TASK-1 (Kcnk3) and TASK-3 (Kcnk9) potassium channels: volatile anesthetics and neurotransmitters share a molecular site of action. *J Biol Chem* **277**, 17733–17742.
- Talley EM, Lei Q, Sirois JE & Bayliss DA (2000). TASK-1, a two-pore domain K⁺ channel, is modulated by multiple neurotransmitters in motoneurons. *Neuron* **25**, 399–410.
- Tegner J, Høglund-Kotaleski J, Lansner A & Grillner S (1997). Low-voltage-activated calcium channels in the lamprey locomotor network: simulation and experiment. *J Neurophysiol* **77**, 1795–1812.
- Thoby-Brisson M, Karlen M, Wu N, Charnay P, Champagnat J & Fortin G (2009). Genetic identification of an embryonic parafacial oscillator coupling to the preBotzinger complex. *Nat Neurosci* **12**, 1028–1035.
- Wang S, Benamer N, Zanella S, Kumar NN, Shi Y, Bevington M, Penton D, Guyenet PG, Lesage F, Gestreau C, Barhanin J & Bayliss DA (2013). TASK-2 channels contribute to pH sensitivity of retrotrapezoid nucleus chemoreceptor neurons. *J Neurosci* **33**, 16033–16044.
- Washburn CP, Bayliss DA & Guyenet PG (2003). Cardio-respiratory neurons of the rat ventrolateral medulla contain TASK-1 and TASK-3 channel mRNA. *Respir Physiol Neurobiol* **138**, 19–35.
- Washburn CP, Sirois JE, Talley EM, Guyenet PG & Bayliss DA (2002). Serotonergic raphe neurons express TASK channel transcripts and a TASK-like pH- and halothane-sensitive K⁺ conductance. *J Neurosci* **22**, 1256–1265.
- Wittmeier S, Song G, Duffin J & Poon CS (2008). Pacemakers handshake synchronization mechanism of mammalian respiratory rhythmogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 18000–18005.
- Yang CF & Feldman JL (2018). Efferent projections of excitatory and inhibitory preBotzinger Complex neurons. *J Comp Neurol* **526**, 1389–1402.
- Yeh SY, Huang WH, Wang W, Ward CS, Chao ES, Wu Z, Tang B, Tang J, Sun JJ, Esther van der Heijden M, Gray PA, Xue M, Ray RS, Ren D & Zoghbi HY (2017). Respiratory network stability and modulatory response to substance P require Nalcn. *Neuron* **94**, 294–303. e294.
- Zoccal DB, Silva JN, Barnett WH, Lemes EV, Falquetto B, Colombari E, Molkov YI, Moreira TS & Takakura AC (2018). Interaction between the retrotrapezoid nucleus and the parafacial respiratory group to regulate active expiration and sympathetic activity in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **315**, L891–L909.

Additional information

Data availability statement

The data of this manuscript are available from the corresponding author upon reasonable request.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author contributions

KSM, MPS, ASM and DJAM performed the experiments. KSM, MPS, BHM, JFRP and DJAM 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 submitted for publication.

Funding

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo to DJAM (2019/11863-6), KSM (2019/24060-9), MPS (2018/07027-5) and BHM (2018/15957-2) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico to DJAM (437375/2018-8 and 313719/2020-9). JFRP is supported by the Health Research Council of New Zealand, the Marsden Fund Council from Government funding, managed by Royal Society Te Apārangiand, and the Sidney Taylor Trust.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge J. F. Brunet (Departement de Biologie, Ecole Normale Supérieure, Paris, France) for providing the Phox2b antibody.

Keywords

intrinsic electrophysiological properties, lateral parafacial region, subthreshold conductances and hypercapnia/acidosis, synaptic inhibition

Supporting information

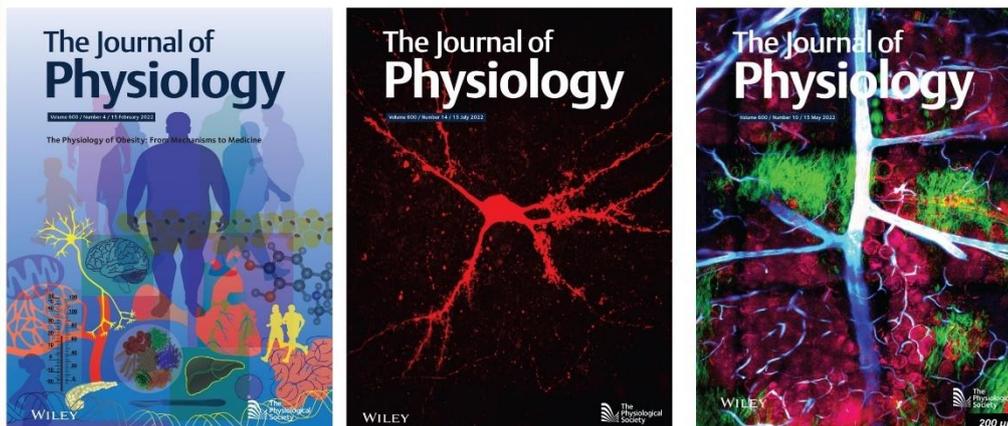
Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of the HTML view of the article. Supporting information files available:

Peer Review History Statistical Summary Document

8.5. Prêmio *Early Investigator Prize 2021* pela publicação na revista *The Journal of Physiology*

Early Investigator Prize 2021

Winner for Respiratory



presented to

Karolyne Silva Magalhães

University of São Paulo, São Paulo, Brazil

for

Intrinsic and synaptic mechanisms controlling the expiratory activity
of excitatory lateral parafacial neurones of rats

J Physiol Nov 1, 2021 599 (21) 4925-4948

Awarded by:

The Journal of
Physiology

Peter Kohl
Editor-in-Chief
The Journal of Physiology

The
Physiological
Society

9. ANEXO

9.1. Certificado de aprovação do protocolo pela Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Contribuição do Grupo Respiratório Parafacial nas respostas inspiratórias, expiratórias e cardiovasculares de ratos à estimulação das fibras aferentes musculares*”, registrado com o número **003/2019**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Davi José de Almeida Moraes**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 29 de abril de 2019.

Este Protocolo prevê a utilização de 24 ratos Wistar-OLD machos pesando 50g e 36 ratos Wistar-OLD machos pesando 100g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 29/04/2019 a 18/03/2022.

We certify that the Protocol *nº 003/2019*, entitled “*Contribution of the Parafacial Respiratory Group in inspiratory, expiratory and cardiovascular responses of rats to the stimulation of the muscular afferent fibers*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in *04/29/2019*. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 24 male Wistar-Old rats weighing 50g and 36 male Wistar-Old rats weighing 100g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 03/18/2022.

Ribeirão Preto, 29 de abril de 2019

Prof. Dra. Katiuchia Uzun Sales
Coordenadora da CEUA-FMRP – USP