

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o
texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir de
25/07/2027



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Isabela de Paula Leirão

Expiração ativa: caracterização funcional e mecanismos neurais

Araraquara

2025



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Isabela de Paula Leirão

Expiração ativa: caracterização funcional e mecanismos neurais

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Doutora em Ciências pelo Programa Interinstitucional de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas UNESP, na Área de Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Daniel B. Zoccal

Araraquara

2025

L531e	Leirão, Isabela de Paula Expiração ativa: caracterização funcional e mecanismos neurais / Isabela de Paula Leirão. -- Araraquara, 2025 144 p. : il., tabs. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araraquara Orientador: Daniel Breseghello Zoccal 1. Ventilação pulmonar. 2. Expiração. 3. Neurofisiologia. 4. Hipóxia. 5. Hipercapnia. I. Título.
-------	---

Isabela de Paula Leirão

Expiração ativa: caracterização funcional e mecanismos neurais

Comissão julgadora

Defesa para obtenção do grau de doutora em Ciências Fisiológicas

Presidente e orientador: Prof. Dr. Daniel Breseghello Zoccal

2º Examinador: Prof. Dr. Glauber dos Santos Ferreira da Silva

3º Examinador: Prof. Dr. Mateus Ramos Amorim

4º Examinador: Profa. Dra. Mirela Barros Dias

5º Examinador: Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani

Araraquara, 25 de julho de 2025

DADOS CURRICULARES

Isabela de Paula Leirão

NASCIMENTO: 14 de fevereiro de 1994 – Araraquara – São Paulo

FILIAÇÃO: Carlos Eduardo Leirão
Hulda Saraia de Paula Leirão

2014 – 2017: Graduação em Ciências Biológicas pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (UNESP/FCAV).

2018 – 2020: Mestrado em Fisiologia pelo Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF) da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr/UNESP), sob financiamento da FAPESP (Processo 2018/04439-0).

2020 – 2025: Doutorado em Fisiologia pelo Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF) da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr/UNESP), sob financiamento da FAPESP (Processo 2020/05045-6).

2023 – 2024: Doutorado sanduíche realizado na University of Alberta (Edmonton, Canadá), sob financiamento da FAPESP (Processo 2022/12416-6).

Dedico este trabalho aos meus pais, pelo amor incondicional, apoio constante, pelos valores que me ensinaram e por serem meu alicerce. Tudo o que sou e conquistei tem raízes no que aprendi com vocês. Com todo amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por tudo.

Aos meus pais que são a minha base, pelo incentivo, apoio, carinho e amor incondicional.

A minha melhor amiga, minha gêmea, Isadora.

Agradeço ao meu noivo Giovanni, por estar ao meu lado em todos os momentos, pelo carinho, amor e companheirismo.

Aos demais familiares que fazem parte da minha vida, meu sincero agradecimento por tudo.

Ao meu orientador, Prof. Daniel B. Zoccal pela confiança, oportunidades, ensinamentos, compreensão e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os meus colegas que fazem parte do Zoccal Lab: Letícia, Beatriz, Giovana e Sarah.

Ao meu amigo Pedro Katayama pela parceria, discussões e conselhos.

Agradeço também a todos os professores, técnicos e colegas do laboratório de Fisiologia da FOAR UNESP.

A todos os meus queridos amigos, que mesmo com a correria da vida, estiveram presentes com momentos de diversão, apoio, carinho e incentivo. Obrigada por tudo.

À Profa. Silvia Pagliardini, por me receber em seu laboratório na Universidade de Alberta - Canadá, bem como o Prof. Gregory Funk. Também aos membros do laboratório: Vivian Biancardi, Neeharika, Tara, Silvia Cardani, Ismail, Ana Sofia e Karolyne. Foi um período de muito crescimento profissional e pessoal na minha vida, sou muito grata!

Aos membros da banca examinadora - Prof. Dr. Glauber S. F da Silva, Prof. Dr. Mateus Amorim, Profa. Dra. Mirela Barros Dias e Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani - por gentilmente aceitarem o meu convite e dedicarem seu tempo para contribuir com este trabalho.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2020/05045-6 e BEPE 2022/12416-6) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

Agradeço também ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 para a realização desse trabalho.

Aos animais de laboratório: “O uso de animais em pesquisa é um privilégio. Estes animais que estão nos ajudando a desvendar os mistérios da ciência merecem nosso respeito e o melhor cuidado possível. Um animal bem tratado irá proporcionar resultados científicos mais confiáveis, o que deve ser o objetivo de todos os pesquisadores.” (Princípios Éticos e Práticos do Uso de Animais em Experimentação).

“A beleza da ciência está em fazer perguntas cuja resposta levanta ainda mais perguntas.”
Isaac Asimov*

* Asimov I. The roving mind. Buffalo, NY: Prometheus Books; 1983.

Leirão IP. Expiração ativa: caracterização funcional e mecanismos neurais [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2025.

RESUMO

Distúrbios gasosos sanguíneos, como a hipóxia (baixa concentração de O_2) ou a hipercapnia (altos níveis de CO_2), desencadeiam um aumento compensatório na ventilação pulmonar ($\dot{V}_E$). Nessas condições, o oscilador inspiratório pré-Bötzinger (pré-BötC) é ativado para aumentar o ritmo respiratório e também há o recrutamento do músculo abdominal (ABD), caracterizando a expiração ativa (EA). A EA pode intensificar o fluxo expiratório ou modificar a duração da fase expiratória e resulta da ativação de um oscilador expiratório condicional, o grupo respiratório parafacial lateral (pFL). Sugere-se que o pré-BötC e o complexo de Bötzinger (BötC) atuem como fontes de inibição para o pFL, modulando o surgimento da EA. Entretanto, a contribuição funcional dos neurônios do pré-BötC ainda não está totalmente esclarecida, e o fenótipo dos neurônios do BötC que fornecem *drive* inibitório ao pFL permanece desconhecido. Apesar dos avanços no estudo da EA, ainda há lacunas sobre seus aspectos funcionais e os mecanismos envolvidos no seu recrutamento. Realizamos três abordagens experimentais: (1) caracterizamos funcionalmente a EA em ratos com livre movimentação para avaliar seu impacto sobre parâmetros ventilatórios, metabólicos e sua correlação com a atividade motora inspiratória durante hipóxia e hipercapnia; (2) investigamos o papel dos neurônios do pré-BötC no padrão expiratório ativo em preparações *in situ*; e (3) analisamos o papel de neurônios parvalbuminérgicos inibitórios do BötC no controle da EA em camundongos transgênicos. Foram utilizados: (1) ratos Sprague-Dawley Holtzman instrumentados para registros da $\dot{V}_E$, temperatura corporal, atividades diafragmática e abdominal e consumo de O_2 durante diferentes níveis de hipóxia (12–8% O_2) e hipercapnia (3–7% CO_2); (2) preparações *in situ* de ratos para estimulação (glutamato 10 mM e substância P 10 μ M) e inibição (isoguvacina 10 mM) farmacológica de neurônios do pré-BötC, com registros dos nervos frênico, vago e abdominal; e (3) camundongos PV-Cre;Ai9 para inibição optogenética seletiva dos neurônios parvalbuminérgicos, com registro eletromiográfico do genioglosso, intercostal externo e abdominal. Verificamos que a hipóxia ou hipercapnia evocaram EA, com o recrutamento ABD. A presença de EA foi associada a aumentos adicionais no volume corrente, sem alterações na amplitude diafragmática. Análises de fluxo de ar sugeriram que, durante hipóxia, a EA recrutou o volume de reserva expiratória na expiração tardia, enquanto na hipercapnia acelerou o esvaziamento pulmonar e aumentou o pico de fluxo expiratório durante a pós-inspiração. A EA aumentou o consumo de O_2 sem melhorar o equivalente ventilatório, sugerindo possível influência também em outros aspectos mecânicos que melhoram a ventilação alveolar e as trocas gasosas. A estimulação do pré-BötC aumentou a frequência do frênico e suprimiu a atividade late-E abdominal, enquanto sua inibição reduziu a atividade dos nervos frênico e vago, e aumentou a amplitude abdominal durante basal e prolongou sua duração na hipercapnia. A inibição seletiva dos neurônios parvalbuminérgicos do BötC elevou a amplitude ABD e a frequência respiratória. Portanto, nossos dados destacam o papel funcional da EA e indicam que o pré-BötC exerce forte efeito inibitório sobre sua atividade. Ademais, neurônios parvalbuminérgicos do BötC podem contribuir para a coordenação dos neurônios inspiratórios e expiratórios durante o surgimento da EA.

Palavras-chave: Ventilação pulmonar. Expiração. Neurofisiologia. Bulbo. Hipóxia. Hipercapnia.

Leirão IP. Active expiration: functional characterization and neural mechanisms [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2025.

ABSTRACT

Blood gas disturbances, such as hypoxia (low O₂ concentration) or hypercapnia (high CO₂ levels), trigger a compensatory increase in pulmonary ventilation ($\dot{V}_E$). Under these conditions, the inspiratory oscillator pre-Bötzinger complex (pre-BötC) is activated to increase respiratory frequency, and abdominal muscle (ABD) recruitment also occurs, characterizing active expiration (AE). AE can enhance expiratory airflow or alter the expiratory phase duration and results from the activation of a conditional expiratory oscillator, the lateral parafacial respiratory group (pFL). It is suggested that the pre-BötC and the Bötzinger complex (BötC) act as inhibitory sources for the pFL, modulating the onset of AE. However, the functional contribution of pre-BötC neurons remains unclear, and the phenotype of BötC neurons that provide inhibitory drive to the pFL is still unknown. Despite advances in AE research, important gaps remain regarding its functional aspects and the mechanisms involved in its recruitment. We conducted three experimental approaches: (1) functionally characterized AE in freely moving rats to assess its impact on ventilatory and metabolic parameters and its correlation with inspiratory motor activity during hypoxia and hypercapnia; (2) investigated the role of pre-BötC neurons in the active expiratory pattern using *in situ* rat preparations; and (3) analyzed the role of inhibitory parvalbuminergic neurons from the BötC in AE control using transgenic mice. For this, we used: (1) Sprague-Dawley Holtzman rats instrumented for simultaneous recordings of $\dot{V}_E$, body temperature, diaphragmatic and abdominal activities, and O₂ consumption during different levels of hypoxia (12–8% O₂) and hypercapnia (3–7% CO₂); (2) *in situ* preparations for pharmacological stimulation (glutamate 10 mM and substance P 10 μ M) and inhibition (isoguvacine 10 mM) of pre-BötC neurons, with recordings from the phrenic, vagus, and abdominal nerves; and (3) PV-Cre;Ai9 transgenic mice for selective optogenetic inhibition of parvalbuminergic neurons, with recordings of genioglossal, external intercostal, and abdominal muscle activities. We found that hypoxia or hypercapnia evoked AE, which was associated with further increases in tidal volume, without changes in diaphragmatic amplitude. Airflow pattern analysis suggested that during hypoxia, AE recruited the expiratory reserve volume in late expiration, while during hypercapnia it accelerated lung emptying and increased peak expiratory flow during post-inspiration. AE increased O₂ consumption without improving the air convection requirement, suggesting a possible influence on other mechanical aspects that enhance alveolar ventilation and gas exchange. Stimulation of the pre-BötC increased phrenic burst frequency and suppressed abdominal late-E activity, while its inhibition reduced phrenic and vagal activities and increased abdominal amplitude at baseline and prolonged its duration during hypercapnia. Selective inhibition of parvalbuminergic BötC neurons increased the ABD amplitude and respiratory frequency. In conclusion, our data highlight the functional role of AE and indicate that the pre-BötC exerts a strong inhibitory effect on its activity. Additionally, parvalbuminergic neurons of the BötC may contribute to coordinating inspiratory and expiratory neurons during the emergence of AE.

Keywords: Pulmonary ventilation. Exhalation. Neurophysiology. Medulla oblongata. Hypoxia. Hypercapnia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama esquemático do tronco cerebral (plano sagital), ilustrando a distribuição anatômica dos principais grupamentos neuronais.....	27
Figura 2 - Desenho esquemático ilustrando as três fases sequenciais da respiração.....	28
Figura 3 - Esquema resumido de possíveis conexões neuronais entre os principais grupamentos respiratórios do tronco cerebral.....	34
Figura 4 - Exemplo de um animal durante a exposição à hipóxia (10% O ₂).	41
Figura 5 - Desenho esquemático do protocolo experimental em animais com livre movimentação.....	42
Figura 6 - Ventilação pulmonar e registros de eletromiograma em ratos não anestesiados e com livre movimentação.....	44
Figura 7 - Ilustração esquemática da preparação <i>in situ</i> coração-tronco cerebral isolados.....	49
Figura 8 - Desenho esquemático do protocolo experimental detalhado, utilizando camundongos PV-cre; Ai9.....	54
Figura 9 - Ocorrência e incidência de expiração ativa durante diferentes níveis de hipóxia.....	57
Figura 10 - Caracterização funcional da expiração ativa durante diferentes níveis de hipóxia.....	59
Figura 11 - Correlação entre expiração ativa e medidas metabólicas durante diferentes níveis de hipóxia.....	61
Figura 12 - Correlação entre expiração ativa e suspiros durante hipóxia.....	63
Figura 13 - Ocorrência e incidência de expiração ativa durante diferentes níveis de hipercapnia.....	64
Figura 14 - Caracterização funcional da expiração ativa durante diferentes níveis de hipercapnia.....	66
Figura 15 - Correlação entre expiração ativa e medidas metabólicas durante diferentes níveis de hipercapnia.....	69
Figura 16 - Correlação entre expiração ativa e suspiros durante hipercapnia.....	70

Figura 17 - Expiração ativa e dinâmica inspiratória/expiratória durante hipóxia e hiperapnia.....	72
Figura 18 - Duração das fases respiratórias e expiração ativa durante hipóxia e hiperapnia.....	73
Figura 19 - Padrão motor da preparação <i>in situ</i> durante condição basal e em exposição a hiperapnia (10% CO ₂).....	75
Figura 20 - Efeitos da estimulação dos neurônios do pré-Bötzinger com glutamato.....	77
Figura 21 - Efeitos da estimulação dos neurônios do pré-Bötzinger com substância P.....	79
Figura 22 - Efeitos da inibição parcial dos neurônios do pré-Bötzinger com isoguvacina.....	82
Figura 23 - Influência de diferentes anestésicos em preparações intactas e vagotomizadas de camundongos PV-cre.....	86
Figura 24 - Cortes coronais de imunofluorescência de um camundongo PV-cre;Ai9 representativo.....	88
Figura 25 - Efeitos da inibição usando uma sequência de pulsos de luz de curta duração.....	90
Figura 26 - Efeitos da inibição utilizando pulsos únicos de luz.....	91
Figura 27 - Combinação de efeitos evocados por sequência de pulsos de luz de curta duração e de pulsos únicos de luz.....	92
Figura 28 - Efeitos da fotoinibição na região do pFL.....	93
Figura 29 - Efeitos de pulsos únicos de luz em camundongos submetidos à injeção de vetor viral controle.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores médios dos parâmetros ventilatórios e motores durante basal e em diferentes níveis de hipóxia.....	60
Tabela 2 - Valores médios dos parâmetros metabólicos durante condição basal e em diferentes níveis de hipóxia.....	62
Tabela 3 - Valores médios dos parâmetros ventilatórios e motores durante basal e em diferentes níveis de hipercapnia.....	67
Tabela 4 - Valores médios dos parâmetros metabólicos durante condição basal e em diferentes níveis de hipercapnia.....	70
Tabela 5 - Valores médios dos parâmetros respiratórios durante estimulação do pré-Bötzinger com glutamato e substância P <i>in situ</i>	80
Tabela 6 - Valores médios dos parâmetros respiratórios durante inibição parcial do pré-Bötzinger com isoguvacina <i>in situ</i>	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – Graus Celsius

∫ ABD_{EMG} – Atividade eletromiográfica integrada do abdominal

∫ DIA_{EMG} – Atividade eletromiográfica integrada do diafragma

ABD – Músculo abdominal

ABD_{EMG} – Atividade eletromiográfica do abdominal

AbN – Nervo abdominal

Arch – Arqueroopsina

ARRIVE – “*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*”

aug-E – *augmenting-expiratory*,

AVV – Vírus adeno-associado

BötC – complexo de Bötzinger

bpm – *bursts* por minuto

Ca²⁺ – cálcio

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

ChAT – Colina acetiltransferase

CO₂ – Dióxido de carbono

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CPTP – Condições padrão de temperatura, pressão e ar seco

CRV – Coluna respiratória ventral

cVN – Nervo vago cervical

cVRG – grupo respiratório ventral caudal

cVRG – Grupo respiratório ventral caudal

DIA – Músculo diafragma

DIA_{EMG} – Atividade eletromiográfica do diafragma

DP – Desvio padrão

DRG – Grupo respiratório dorsal

E2 – Segundo estágio da expiração

EA – Expiração ativa

early-I – neurônios “*early inspiratory*”

EMG – Eletromiograma

EPM – Erro padrão da média

eYFP – Proteína fluorescente amarela
F'eCO₂ – Fração de dióxido de carbono no ar de saída
F'eO₂ – Fração de oxigênio no ar de saída
FiCO₂ – Fração de dióxido de carbono no ar de entrada
FiO₂ – Fração de oxigênio no ar de entrada
fR – Frequência respiratória
FRi – Fluxo de entrada (volume de ar por minuto)
g – grama
GFP – Proteína fluorescente verde
GG – Músculo genioglosso
GRP – Peptídeo liberador de gastrina
h – hora
HCO₃⁻ – ânion bicarbonato
HN – Nervo hipoglosso
Hz – Hertz
I – Inspiração
i.m. – Intramuscular
i.p. – Intraperitoneal
IgG – Imunoglobulina G
IgY – Imunoglobulina Y
INT EXT – Músculo intercostal externo
IPSCs – correntes pós-sinápticas inibitórias
KCl – Cloreto de potássio
KCN – Cianeto de potássio
KF – Núcleo Kölliker-Fuse
kg – quilograma
KH₂PO₄ – dihidrogenofosfato de potássio
kHz – kilohertz
L – Litro
L1 – Primeira vértebra lombar
late-E – *late expiration*
LC – *locus coeruleus*
LRN – Núcleo reticular lateral
mCherry – Proteína fluorescente vermelha

mg – miligrama

MgSO₄ – Sulfato de magnésio

min – minuto

mL – mililitro

mm – milímetro

mM – millimolar

mmHg – milímetro de mercúrio

mmol – milimol

ms – milisegundo

mV – millivolt

mW – milliwatt

N₂ – Nitrogênio

NA – Núcleo ambíguo

NaCl – Cloreto de sódio

NaHCO₃ – Bicarbonato de sódio

NDS – Soro normal de burro

NK1Rs – receptores de neurocinina 1

nL – nanolitro

nm – nanômetro

nM – nanomolar

NMB – Neuromedina B

NREM – Sono não REM

NTS – Núcleo do Trato Solitário

O₂ – Oxigênio

PaCO₂ – Pressão parcial arterial de dióxido de carbono

PAG – Substância cinzenta periaquedutal

PaO₂ – Pressão parcial arterial de oxigênio

P_B – Pressão barométrica

PB – Tampão fosfato

PBN – Núcleo Parabraquial

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

P_C – Pressão de vapor do vapor de água na câmara do animal

PCO₂ – Pressão parcial de dióxido de carbono

pFL – Grupo respiratório parafacial lateral

pFv – Grupo respiratório parafacial ventral
pH – Potencial Hidrogeniônico
PHOX2b – *Homeobox* pareado 2B
PI – Pós-inspiração
PiCo – Complexo pós-inspiratório
P_K – Deflexão de pressão associada ao volume injetado para calibração
PN – Nervo frênico
PO₂ – Pressão parcial de oxigênio
Pós-I – Pós-inspiratório
PP – Pressão de perfusão
P_R – Pressão de vapor da água a temperatura corporal
pré-BötC – Complexo pré-Bötzinger
PRG – Grupo respiratório pontino
PSI – Libra por polegada quadrada
P_T – Deflexão de pressão associada com cada volume de ar corrente
PV – Parvalbumina
r² – Coeficiente de determinação
REM – *Rapid eyes movement*
RF – Formação reticular
rpm – Rotação por minuto
RTN – Núcleo retrotrapezoide
rVRG – grupo respiratório ventral rostral
s – segundo
s.c. – Subcutâneo
SNC – Sistema nervoso central
SP – Substância P
SST – Somatostatina
SUDEP – Morte súbita associada à epilepsia
T11 – Décima primeira vértebra torácica
T12 – Décima segunda vértebra torácica
T_A – Temperatura do ar dentro da câmara do animal
T_C – Temperatura corporal
tdTomato – Proteína fluorescente vermelha
TRH – Hormônio liberador de tireotropina

UI – Unidades internacionais

V – Volts

$\dot{V}CO_2$ – Produção de dióxido de carbono

$\dot{V}_E$ – Ventilação pulmonar

$\dot{V}_E/\dot{V}O_2$ – Equivalente ventilatório

VII – Núcleo facial

vIRT – Formação reticular intermediária ventral

V_K – Volume de ar injetado na câmara do animal para calibração

$\dot{V}O_2$ – Consumo de oxigênio

V_T – Volume corrente

XII – Núcleo motor do hipoglosso

μg – micrograma

μm – micrômetro

μM – micromolar

μV – microvolt

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 PROPOSIÇÃO.....	23
2.1 Protocolo 1: Aspectos Funcionais da Expiração Ativa.....	23
2.1.1 Objetivos específicos.....	23
2.2 Protocolo 2: Neurônios do Pré-BötC e a Geração do Padrão Expiratório ativo.....	23
2.2.1 Objetivos específicos.....	24
2.3 Protocolo 3: Neurônios Parvalbuminérgicos do BötC e a Geração do Padrão Expiratório Ativo.....	24
2.3.1 Objetivo específico.....	24
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	25
3.1 Controle da Respiração.....	25
3.2 Mecanismos Envolvidos na Geração da Expiração Ativa.....	30
3.3 Considerações Gerais.....	34
4 MATERIAL E MÉTODO.....	36
4.1 Protocolo 1: Aspectos Funcionais da Expiração Ativa.....	36
4.1.1 Animais.....	36
4.1.2 Procedimentos cirúrgicos.....	36
4.1.3 Avaliação da ventilação pulmonar e do padrão respiratório.....	37
4.1.4 Medições do consumo de O ₂	39
4.1.5 Registros das atividades do diafragma e dos músculos abdominais em animais com livre movimentação.....	40
4.1.6 Protocolo experimental.....	41
4.1.7 Análise de dados e estatística.....	42
4.2 Protocolo 2: Contribuição dos Neurônios Inspiratórios do Pré-BötC Sobre a Geração do Padrão de Expiração Ativa <i>in situ</i>	45
4.2.1 Animais.....	45
4.2.2 Obtenção de preparações <i>in situ</i>	45
4.2.3 Registros das atividades eferentes dos nervos frênico, vago e	

abdominal em preparações <i>in situ</i>	47
4.2.4 Microinjeções no pré-BötC.....	48
4.2.5 Protocolo experimental.....	48
4.2.6 Análise de dados e estatística.....	50
4.3 Protocolo 3: Contribuição dos Neurônios Parvalbuminérgicos do Bötzinger no Controle do Padrão Expiratório Ativo e na Atividade Inspiratória.....	50
4.3.1 Animais.....	50
4.3.2 Microinjeções de vetores virais.....	51
4.3.3 Protocolo experimental.....	52
4.3.4 Análise gasométrica.....	52
4.3.5 Histologia.....	53
4.3.6 Análise de dados e estatística.....	54
 5 RESULTADOS.....	56
5.1 Protocolo 1: Aspectos Funcionais da Expiração Ativa.....	56
5.1.1 Expiração ativa e seu impacto funcional durante a exposição à hipóxia em ratos não anestesiados.....	56
5.1.2 Expiração ativa e seus efeitos funcionais durante exposição a hipercapnia em ratos não anestesiados.....	63
5.1.3 Efeitos da expiração ativa na dinâmica inspiratória e expiratória e na duração das fases.....	71
5.2 Protocolo 2: Contribuição dos Neurônios Inspiratórios do Pré-BötC Sobre a Geração do Padrão de Expiração Ativa <i>in situ</i>	74
5.2.1 Respostas motoras observadas na preparação <i>in situ</i>	74
5.2.2 Efeitos da estimulação dos neurônios do pré-BötC por meio de microinjeções unilaterais de glutamato.....	75
5.2.3 Efeitos da estimulação dos neurônios do pré-BötC por meio de microinjeções unilaterais de substância P.....	78
5.2.4 Efeitos da inibição parcial dos neurônios do pré-BötC por meio de microinjeções unilaterais de isoguvacina.....	80
5.3 Protocolo 3: Contribuição dos Neurônios Parvalbuminérgicos do Bötzinger no Controle do Padrão Expiratório Ativo e na Atividade Inspiratória.....	83

5.3.1 Caracterização da influência de diferentes anestésicos em preparações intactas e vagotomizadas de camundongos.....	83
5.3.2 Efeitos da fotoinibição de neurônios parvalbuminérgicos do BötC na atividade inspiratória e abdominal.....	87
5.3.3 Efeitos da fotoinibição de fibras de neurônios do BötC no pFL de camundongos PV-cre;Ai9.....	92
5.3.4 Efeitos de pulsos de luz em neurônios parvalbuminérgicos do BötC de camundongos PV-cre;Ai9 injetados com vírus controle.....	94
 6 DISCUSSÃO.....	 96
6.1 Aspectos Funcionais da Expiração Ativa.....	96
6.2 Pré-BötC no Controle do Padrão Expiratório Ativo.....	101
6.3 BötC e Neurônios PV no Controle do Padrão Expiratório Ativo.....	105
6.4 Limitações do Estudo.....	109
 7 CONCLUSÃO.....	 111
 REFERÊNCIAS.....	 112
 APÊNDICE.....	 123
 ANEXOS.....	 144

1 INTRODUÇÃO

A respiração é um processo motor rítmico e essencial à manutenção da homeostase, pois permite a adequada oxigenação dos tecidos e remoção de dióxido de carbono (CO_2) do organismo. Tal processo é coordenado por uma sofisticada rede neural localizada no tronco encefálico, responsável pela geração e modulação do ritmo respiratório. O controle neural da respiração é altamente dinâmico e adaptável, permitindo ajustes finos diante de mudanças fisiológicas e comportamentais, como sono, exercício físico, vocalização e estados emocionais¹⁻⁴. No centro dessa rede encontra-se a coluna respiratória ventral (CRV), estrutura longitudinal do bulbo que abriga os principais núcleos respiratórios, incluindo o complexo pré-Bötzinger (pré-BötC), responsável pela geração do ritmo respiratório^{2,3}. O pré-BötC contém neurônios glutamatérgicos e inibitórios (GABAérgicos e glicinérgicos), que interagem entre si e com outras regiões respiratórias, estabelecendo um oscilador capaz de produzir *bursts* inspiratórios rítmicos²⁻⁵. Estudos demonstram que a lesão ou inibição do pré-BötC leva à parada respiratória, evidenciando sua função essencial para a eupneia^{6,7}. Além do pré-BötC, o controle respiratório envolve outras regiões da CRV, como o complexo de Bötzinger (BötC), com neurônios majoritariamente inibitórios que coordenam a transição entre as fases do ciclo respiratório. Essas regiões formam circuitos com conexões recíprocas, como o "anel inibitório", que garante a alternância entre inspiração e expiração^{8,9}.

Em repouso, a ventilação pulmonar é predominantemente passiva durante a fase expiratória. No entanto, frente a desafios metabólicos como hipóxia, hipercapnia ou exercício físico, ocorre o recrutamento de músculos abdominais e intercostais internos, caracterizando o fenômeno denominado expiração ativa (EA)¹⁰⁻¹². O recrutamento expiratório ativo depende da ativação rítmica de neurônios localizados no grupo respiratório parafacial lateral (pFL), um oscilador expiratório condicional, situado ventral ao núcleo facial^{13,14}. Os neurônios do pFL, classificados como *late-expiration* (late-E), encontram-se inibidos em repouso^{15,16}, mas são ativados ritmicamente em condições de aumento da demanda ventilatória, promovendo contrações coordenadas da musculatura abdominal^{12,14}.

Estudos indicam que a EA pode contribuir para o aumento da ventilação pulmonar por diversos mecanismos, como a aceleração do fluxo expiratório e redução

do tempo expiratório, recrutamento do volume de reserva expiratório (o que eleva o volume corrente), e ainda o encurtamento adicional das fibras musculares diafragmáticas durante a expiração, favorecendo a eficiência da contração muscular e potencializando a inspiração subsequente^{11,12,17,18}. No entanto, esses efeitos podem variar entre espécies¹⁸ e também depender da natureza do estímulo¹⁹, além de influências metabólicas^{20,21} e das condições experimentais utilizadas.

Apesar dos avanços na caracterização morfofuncional da rede expiratória, ainda não se compreende completamente os mecanismos neurais que determinam o surgimento e a regulação da EA, nem o papel funcional específico de subpopulações neuronais envolvidas. Evidências anatômicas mostram conexões excitatórias e inibitórias entre o pré-BötC e o pFL²², mas o papel específico dos neurônios do pré-BötC na geração da EA ainda é pouco explorado. Modelos matemáticos sugerem que os neurônios inspiratórios do pré-BötC inibem os neurônios do pFL, mantendo-o silenciado em repouso e durante a inspiração²³. Por outro lado, Huckstepp et al.⁷ apontam um papel excitatório do pré-BötC sobre o pFL, essencial para a ativação do padrão expiratório ativo. Complementando, Magalhães et al.¹⁶ indicam que os neurônios expiratórios do pFL exibem correntes inibitórias pós-sinápticas durante a inspiração em repouso, que se tornam mais intensas durante a EA. Assim, as divergências relatadas na literatura destacam que o papel dos neurônios do pré-BötC na emergência da EA ainda necessita de investigação adicional para ser melhor compreendido. Além disso, estudos anteriores sugerem que o BötC também pode ser uma importante fonte de inibição para o surgimento do padrão expiratório ativo²³⁻²⁵. No entanto, a identidade fenotípica dos neurônios do BötC que forneceriam estímulo inibitório ao pFL e regularia a formação da atividade expiratória abdominal também é objeto de investigação. Sabe-se que o BötC possui neurônios inibitórios que expressam parvalbumina (principalmente GABAérgicos), e que estes são escassos no pré-BötC²⁶. Dados recentes (não publicados) indicam a existência de projeções parvalbuminérgicas do BötC para o pFL. Entretanto, não se sabe qual o papel dos neurônios parvalbuminérgicos do BötC no controle respiratório.

Diante das informações apresentadas, o presente estudo buscou compreender aspectos funcionais/ventilatórios da EA em condição experimental livre de anestesia e investigar os mecanismos neurais envolvidos no recrutamento abdominal.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, os estudos apresentados fornecem informações detalhadas sobre a ocorrência e os impactos funcionais da EA na ventilação pulmonar, mecânica pulmonar, atividade motora respiratória e metabolismo em ratos não anestesiados expostos a vários níveis de hipóxia e hipercapnia. Nossos dados indicam que a EA ocorre periodicamente durante situações de disponibilidade reduzida de O_2 ou excessiva de CO_2 e aumenta o fluxo expiratório e o volume corrente para impulsionar a ventilação pulmonar independentemente do aumento da atividade diafragmática. No entanto, o início da EA acarreta um custo metabólico adicional e não melhora o equivalente respiratório, sugerindo que esse comportamento motor pode influenciar outros aspectos do sistema respiratório que podem melhorar a ventilação alveolar e as trocas gasosas. Além disso, sobre os possíveis mecanismos relacionados ao surgimento da EA, mostramos que o oscilador inspiratório exerce um potente efeito inibitório sobre o surgimento da EA, sugerindo uma interação funcional entre os dois osciladores respiratórios sobre a geração do padrão expiratório ativo. Nossos dados também indicam que o BötC exerce um importante controle inibitório sobre a geração do padrão expiratório ativo. Esse controle inibitório do BötC é desempenhado, em parte, pelos neurônios parvalbuminérgicos. Além disso, esses neurônios também controlam a frequência respiratória e o estímulo aos motoneurônios espinhais inspiratórios. Desta forma, os neurônios parvalbuminérgicos do BötC podem desempenhar um papel na coordenação dos neurônios inspiratórios e expiratórios durante o surgimento do padrão expiratório ativo. Assim, compreender o papel fisiológico da EA e estudar os mecanismos envolvidos no seu recrutamento, é fundamental para revelar aspectos cruciais do controle respiratório em contextos fisiológicos e também patológicos, dada a prevalência de condições que envolvem distúrbios metabólicos e gasométricos, como doença pulmonar obstrutiva crônica, apneia do sono ou aclimação a elevadas altitudes.

REFERÊNCIAS*

1. Bianchi AL, Denavit-Saubie M, Champagnat J. Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiol Rev.* 1995;75(1):1–45.
2. Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW, Feldman JL. Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science.* 1991;254(5032):726–9.
3. Del Negro CA, Morgado-Valle C, Hayes JA, Mackay DD, Pace RW, Crowder EA, et al. Sodium and calcium current-mediated pacemaker neurons and respiratory rhythm generation. *J Neurosci.* 2005;25(2):446–53.
4. Connelly CA, Dobbins EG, Feldman JL. Pre-Botzinger complex in cats: respiratory neuronal discharge patterns. *Brain Res.* 1992;590(1-2):337–40.
5. Gray PA, Janczewski WA, Mellen N, McCrimmon DR, Feldman JL. Normal breathing requires preBotzinger complex neurokinin-1 receptor-expressing neurons. *Nat Neurosci.* 2001;4(9):927–30.
6. Tan W, Janczewski WA, Yang P, Shao XM, Callaway EM, Feldman JL. Silencing preBotzinger complex somatostatin-expressing neurons induces persistent apnea in awake rat. *Nat Neurosci.* 2008;11(5):538–40.
7. Huckstepp RT, Henderson LE, Cardoza KP, Feldman JL. Interactions between respiratory oscillators in adult rats. *Elife.* 2016;5.
8. Smith JC, Abdala AP, Rybak IA, Paton JF. Structural and functional architecture of respiratory networks in the mammalian brainstem. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2009;364(1529):2577–87.
9. Abdala AP, Paton JF, Smith JC. Defining inhibitory neurone function in respiratory circuits: opportunities with optogenetics? *J Physiol.* 2015;593(14):3033–46.
10. Iizuka M, Fregosi RF. Influence of hypercapnic acidosis and hypoxia on abdominal expiratory nerve activity in the rat. *Respir Physiol Neurobiol.* 2007;157(2-3):196–205.
11. Lemes EV, Zoccal DB. Vagal afferent control of abdominal expiratory activity in response to hypoxia and hypercapnia in rats. *Respir Physiol Neurobiol.* 2014;203:90–7.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

12. Leirao IP, Silva CA, Jr., Gargaglioni LH, da Silva GSF. Hypercapnia-induced active expiration increases in sleep and enhances ventilation in unanaesthetized rats. *J Physiol*. 2017.
13. Janczewski WA, Feldman JL. Distinct rhythm generators for inspiration and expiration in the juvenile rat. *J Physiol*. 2006;570(Pt 2):407–20.
14. de Britto AA, Moraes DJ. Non-chemosensitive parafacial neurons simultaneously regulate active expiration and airway patency under hypercapnia in rats. *J Physiol*. 2017;595(6):2043–64.
15. Pagliardini S, Janczewski WA, Tan W, Dickson CT, Deisseroth K, Feldman JL. Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult anesthetized rats. *J Neurosci*. 2011;31(8):2895–905.
16. Magalhaes KS, da Silva MP, Mecawi AS, Paton JFR, Machado BH, Moraes DJA. Intrinsic and synaptic mechanisms controlling the expiratory activity of excitatory lateral parafacial neurones of rats. *J Physiol*. 2021;599(21):4925–48.
17. Andrews CG, Pagliardini S. Expiratory activation of abdominal muscle is associated with improved respiratory stability and an increase in minute ventilation in REM epochs of adult rats. *J Appl Physiol* (1985). 2015;119(9):968–74.
18. Jenkin SE, Milsom WK. Expiration: breathing's other face. *Prog Brain Res*. 2014;212:131–47.
19. Powell FL, Milsom WK, Mitchell GS. Time domains of the hypoxic ventilatory response. *Respir Physiol*. 1998;112(2):123–34.
20. Frappell P, Lanthier C, Baudinette RV, Mortola JP. Metabolism and ventilation in acute hypoxia: a comparative analysis in small mammalian species. *Am J Physiol*. 1992;262(6 Pt 2):R1040–6.
21. Saiki C, Mortola JP. Effect of CO₂ on the metabolic and ventilatory responses to ambient temperature in conscious adult and newborn rats. *J Physiol*. 1996;491 (Pt 1)(Pt 1):261–9.
22. Biancardi V, Saini J, Pageni A, Prashaad MH, Funk GD, Pagliardini S. Mapping of the excitatory, inhibitory, and modulatory afferent projections to the anatomically defined active expiratory oscillator in adult male rats. *J Comp Neurol*. 2021;529(4):853–84.
23. Molkov YI, Abdala AP, Bacak BJ, Smith JC, Paton JF, Rybak IA. Late-expiratory activity: emergence and interactions with the respiratory CpG. *J Neurophysiol*. 2010;104(5):2713–29.
24. Barnett WH, Abdala AP, Paton JF, Rybak IA, Zoccal DB, Molkov YI. Chemoreception and neuroplasticity in respiratory circuits. *Exp Neurol*. 2017;287(Pt 2):153–64.

25. Flor KC, Barnett WH, Karlen-Amarante M, Molkov YI, Zoccal DB. Inhibitory control of active expiration by the Botzinger complex in rats. *J Physiol.* 2020;598(21):4969–94.
26. Alheid GF, Gray PA, Jiang MC, Feldman JL, McCrimmon DR. Parvalbumin in respiratory neurons of the ventrolateral medulla of the adult rat. *J Neurocytol.* 2002;31(8-9):693–717.
27. Ramirez JM, Baertsch N. Defining the Rhythmogenic Elements of Mammalian Breathing. *Physiology (Bethesda).* 2018;33(5):302–16.
28. Richter DW, Smith JC. Respiratory rhythm generation in vivo. *Physiology.* 2014;29(1):58–71.
29. Del Negro CA, Funk GD, Feldman JL. Breathing matters. *Nat Rev Neurosci.* 2018;19(6):351–67.
30. West JB. *Respiratory Physiology: The Essentials.* 8th ed ed2008.
31. Shao XM, Feldman JL. Respiratory rhythm generation and synaptic inhibition of expiratory neurons in pre-Botzinger complex: differential roles of glycinergic and GABAergic neural transmission. *J Neurophysiol.* 1997;77(4):1853–60.
32. Tan W, Sherman D, Turesson J, Shao XM, Janczewski WA, Feldman JL. Reelin demarcates a subset of pre-Botzinger complex neurons in adult rat. *J Comp Neurol.* 2012;520(3):606–19.
33. Tan ZY, Lu Y, Whiteis CA, Simms AE, Paton JF, Chapleau MW, et al. Chemoreceptor hypersensitivity, sympathetic excitation, and overexpression of ASIC and TASK channels before the onset of hypertension in SHR. *Circ Res.* 2010;106(3):536–45.
34. Jasinski PE MY, Shevtsova NA, Smith JC, Rybak IA. Sodium and calcium mechanisms of rhythmic bursting in excitatory neural networks of the pre-Bötzing complex: A computational modelling study. *Eur J Neurosci.* 2013;37:212–30.
35. Kam K, Worrell JW, Janczewski WA, Cui Y, Feldman JL. Distinct inspiratory rhythm and pattern generating mechanisms in the preBotzinger complex. *J Neurosci.* 2013;33(22):9235–45.
36. Guyenet PG, Wang H. Pre-Bötzing neurons with preinspiratory discharges ‘in vivo’ express NK1 receptors in the rat. *J Neurophysiol* 2001;86: 438–46.
37. Gray PA, Rekling JC, Bocchiario CM, Feldman JL. Modulation of respiratory frequency by peptidergic input to rhythmogenic neurons in the preBötzing Complex. *Science.* 1999;286:1566–8.
38. Wang H, Stornetta RL, Rosin DL, Guyenet PG. Neurokinin-1 receptor-immunoreactive neurons of the ventral respiratory group in the rat. *J Comp Neurol.* 2001;434:128–46.

39. Peña F, Ramirez JM. Substance P-mediated modulation of pacemaker properties in the mammalian respiratory network. *J Neurosci*. 2004;24:7549–56.
40. Hayes JA, Del Negro CA. Neurokinin receptor-expressing pre-Bötzinger complex neurons in neonatal mice studied in vitro. *J Neurophysiol*. 2007;97:4215–24.
41. Pantaleo T, Mutolo D, Cinelli E, Bongianni F. Respiratory responses to somatostatin microinjections into the Bötzinger complex and the pre-Bötzinger complex of the rabbit. *Neurosci Lett*. 2011;498:26–30.
42. Ramírez-Jarquín JO, Lara-Hernández S, López-Guerrero JJ, Aguilera MA, Rivera-Ángulo AJ, Sampieri A, et al. Somatostatin modulates generation of inspiratory rhythms and determines asphyxia survival. 2012;34(2):360–72.
43. Llona I, Eugén J. Central actions of somatostatin in the generation and control of breathing. *Biol Res*. 2005;38:347–52.
44. Rekling JC, Champagnat J, Denavit-Saubié M. Thyrotropin-releasing hormone (TRH) depolarizes a subset of inspiratory neurons in the newborn mouse brain stem in vitro. *J Neurophysiol*. 1996;75:811–9.
45. Smith JC, Abdala APL, Koizumi H, Rybak IA, Paton JFR. Spatial and functional architecture of the mammalian brain stem respiratory network: A hierarchy of three oscillatory mechanisms. *J Neurophysiol*. 2007;98:3370–87.
46. Ezure K. Synaptic connections between medullary respiratory neurons and considerations on the genesis of respiratory rhythm. *Prog Neurobiol*. 1990;35(6):429–50.
47. Smith JC, Abdala APL, Borgmann A, Rybak IA, Paton JFR. Brainstem respiratory networks: Building blocks and microcircuits. *Trends Neurosci*. 2013;36:152–62.
48. Dutschmann M, Herbert H. The Kolliker-Fuse nucleus gates the postinspiratory phase of the respiratory cycle to control inspiratory off-switch and upper airway resistance in rat. *Eur J Neurosci*. 2006;24(4):1071–84.
49. Bailey TW, Hermes SM, Andresen MC, Aicher SA. Cranial visceral afferent pathways through the nucleus of the solitary tract to caudal ventrolateral medulla or paraventricular hypothalamus: target-specific synaptic reliability and convergence patterns. *J Neurosci*. 2006;26(46):11893–902.
50. Song G, Xu H, Wang H, Macdonald SM, Poon CS. Hypoxia-excited neurons in NTS send axonal projections to Kolliker-Fuse/parabrachial complex in dorsolateral pons. *Neuroscience*. 2011;175:145–53.
51. Alheid GF, Jiao W, McCrimmon DR. Caudal nuclei of the rat nucleus of the solitary tract differentially innervate respiratory compartments within the ventrolateral medulla. *Neuroscience*. 2011;190:207–27.

52. Kubin L, Alheid GF, Zuperku EJ, McCrimmon DR. Central pathways of pulmonary and lower airway vagal afferents. *J Appl Physiol.* 2006;101(2):618–27.
53. Bonham AC, McCrimmon DR. Neurones in a discrete region of the nucleus tractus solitarius are required for the Breuer-Hering reflex in rat. *J Physiol.* 1990;427:261–80.
54. Dutschmann M, Jones SE, Subramanian HH, Stanic D, Bautista TG. The physiological significance of postinspiration in respiratory control. *Prog Brain Res.* 2014;212:113–30.
55. Yackle K. Transformation of Our Understanding of Breathing Control by Molecular Tools. *Annu Rev Physiol.* 2023;85:93–113.
56. Guyenet PG, Bayliss DA. Neural Control of Breathing and CO₂ Homeostasis. *Neuron.* 2015;87(5):946–61.
57. Feldman JL, Del Negro CA. Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(3):232–42.
58. Abdala AP, Rybak IA, Smith JC, Paton JF. Abdominal expiratory activity in the rat brainstem-spinal cord in situ: patterns, origins and implications for respiratory rhythm generation. *J Physiol.* 2009;587(Pt 14):3539–59.
59. Zoccal DB, Silva JN, Barnett WH, Lemes EV, Falquetto B, Colombari E, et al. 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.* 2018;315(5):L891–L909.
60. Lopez-Barneo J. Oxygen-sensing by ion channels and the regulation of cellular functions. *Trends Neurosci.* 1996;19(10):435–40.
61. Nattie E. CO₂, brainstem chemoreceptors and breathing. *Prog Neurobiol.* 1999;59:299–331.
62. Feldman JL, Mitchell GS, Nattie EE. Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. *Annu Rev Neurosci.* 2003;26:239–66.
63. Takakura AC, Moreira TS, Colombari E, West GH, Stornetta RL, Guyenet PG. Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats. *J Physiol.* 2006;572(Pt 2):503–23.
64. Kim E, Lee H. The Effects of Deep Abdominal Muscle Strengthening Exercises on Respiratory Function and Lumbar Stability. *J Phys Ther Sci.* 2013;25(3):663–5.
65. Kurokawa Y, Kato S, Yokogawa N, Shimizu T, Matsubara H, Kabata T, et al. Relationship between Respiratory Function and the Strength of the Abdominal Trunk Muscles Including the Diaphragm in Middle-Aged and Older Adult Patients. *J Funct Morphol Kinesiol.* 2024;9(4):175.

66. Shafik A, El Sibai O, Shafik IA, Shafik AA. Electromyographic activity of the anterolateral abdominal wall muscles during rectal filling and evacuation. *J Surg Res.* 2007;143(2):364–7.
67. Sapsford RR, Hodges PW. The effect of abdominal and pelvic floor muscle activation on urine flow in women. *Int Urogynecol J.* 2012;23(9):1225–30.
68. Qian X, Li P, Shi SQ, Garfield RE, Liu H. Uterine and abdominal muscle electromyographic activities in control and patient-controlled epidural analgesia-treated nulliparous women during the second stage of labor. *Reprod Sci.* 2017;24(8):1214–20.
69. Maag S, Croy T, Köster M, Melnyk M, Garcia-Manso JM, R. Z. Intra-abdominal pressure is strongly correlated with abdominal wall tension during clinical evaluation test. *Clin Biomech.* 2021;86:105–12.
70. Moraes DJ, Dias MB, Cavalcanti-Kwiatkoski R, Machado BH, Zoccal DB. Contribution of the retrotrapezoid nucleus/parafacial respiratory region to the expiratory-sympathetic coupling in response to peripheral chemoreflex in rats. *J Neurophysiol.* 2012;108(3):882–90.
71. Silva JN, Tanabe FM, Moreira TS, Takakura AC. Neuroanatomical and physiological evidence that the retrotrapezoid nucleus/parafacial region regulates expiration in adult rats. *Respir Physiol Neurobiol.* 2016;227:9–22.
72. Janczewski WA, Onimaru H, Homma I, Feldman JL. Opioid-resistant respiratory pathway from the preinspiratory neurones to abdominal muscles: in vivo and in vitro study in the newborn rat. *J Physiol.* 2002;545:1017–26.
73. Barnett WH, Jenkin SEM, Milsom WK, Paton JFR, Abdala AP, Molkov YI, et al. The Kolliker-Fuse nucleus orchestrates the timing of expiratory abdominal nerve bursting. *J Neurophysiol.* 2018;119(2):401–12.
74. Yang CF, Kim EJ, Callaway EM, Feldman JL. Monosynaptic Projections to Excitatory and Inhibitory preBotzinger Complex Neurons. *Front Neuroanat.* 2020;14:58.
75. Baertsch NA, Baertsch HC, Ramirez JM. The interdependence of excitation and inhibition for the control of dynamic breathing rhythms. *Nat Commun.* 2018;9(1):843.
76. Kuwana S, Tsunekawa N, Yanagawa Y, Okada Y, Kuribayashi J, Obata K. Electrophysiological and morphological characteristics of GABAergic respiratory neurons in the mouse pre-Botzinger complex. *Eur J Neurosci.* 2006;23(3):667–74.
77. Ezure K, Tanaka I, Kondo M. Glycine is used as a transmitter by decrementing expiratory neurons of the ventrolateral medulla in the rat. *J Neurosci.* 2003;23(26):8941–8.

78. Jenkin SE, Milsom WK, Zoccal DB. The Kolliker-Fuse nucleus acts as a timekeeper for late-expiratory abdominal activity. *Neuroscience*. 2017;348:63–72.
79. Yang CF, Feldman JL. Efferent projections of excitatory and inhibitory preBotzinger Complex neurons. *J Comp Neurol*. 2018;526(8):1389–402.
80. Saini JK, Pagliardini S. Breathing during sleep in the postnatal period of rats: the contribution of active expiration. *Sleep*. 2017;40(12).
81. Toward MA, Abdala AP, Knopp SJ, Paton JF, Bissonnette JM. Increasing brain serotonin corrects CO₂ chemosensitivity in methyl-CpG-binding protein 2 (Mecp2)-deficient mice. *Exp Physiol*. 2013;98(3):842–9.
82. Devinsky O, Hesdorffer DC, Thurman DJ, Lhatoo S, Richerson G. Sudden unexpected death in epilepsy: epidemiology, mechanisms, and prevention. *Lancet Neurol*. 2016;15:1075–88.
83. Drorbaugh JE, Fenn WO. A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics*. 1955;16(1):81–7.
84. Li P, Janczewski WA, Yackle K, Kam K, Pagliardini S, Krasnow MA, et al. The peptidergic control circuit for sighing. *Nature*. 2016;530(7590):293–7.
85. Hernandez AB, Kirkness JP, Smith PL, Schneider H, Polotsky M, Richardson RA, et al. Novel whole body plethysmography system for the continuous characterization of sleep and breathing in a mouse. *J Appl Physiol* (1985). 2012;112(4):671–80.
86. Abbott SB, Stornetta RL, Coates MB, Guyenet PG. Phox2b-expressing neurons of the parafacial region regulate breathing rate, inspiration, and expiration in conscious rats. *J Neurosci*. 2011;31(45):16410–22.
87. Mortola JP. Breathing pattern in newborns. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. 1984;56(6):1533–40.
88. Cummings KJ, Hewitt JC, Li A, Daubenspeck JA, Nattie EE. Postnatal loss of brainstem serotonin neurones compromises the ability of neonatal rats to survive episodic severe hypoxia. *J Physiol*. 2011;589(Pt 21):5247–56.
89. Lighton JRB, Halsey LG. Flow-through respirometry applied to chamber systems: pros and cons, hints and tips. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2011;158(3):265–75.
90. Leirao IP, Zoccal DB, Gargaglioni LH, da Silva GSF. Differential modulation of active expiration during hypercapnia by the medullary raphe in unanesthetized rats. *Pflugers Arch*. 2020;472(11):1563–76.
91. Zoccal DB, Simms AE, Bonagamba LG, Braga VA, Pickering AE, Paton JF, et al. Increased sympathetic outflow in juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia correlates with enhanced expiratory activity. *J Physiol*. 2008;586(13):3253–65.

92. Bittencourt-Silva PG, Menezes MF, Mendonca-Junior BA, Karlen-Amarante M, Zoccal DB. Postnatal intermittent hypoxia enhances phrenic and reduces vagal upper airway motor activities in rats by epigenetic mechanisms. *Exp Physiol*. 2020;105(1):148–59.
93. St-John WM, Paton JF. Characterizations of eupnea, apneusis and gasping in a perfused rat preparation. *Respir Physiol*. 2000;123(3):201–13.
94. Zoccal DB, Paton JF, Machado BH. Do changes in the coupling between respiratory and sympathetic activities contribute to neurogenic hypertension? *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009;36(12):1188–96.
95. Liu YY, Ju G, Wong-Riley MTT. Distribution and colocalization of neurotransmitters and receptors in the pre-Bötzinger complex of rats. *J Appl Physiol*. 2001;91(3):1387–96.
96. Saiki C, Matsuoka T, Mortola JP. Metabolic-ventilatory interaction in conscious rats: effect of hypoxia and ambient temperature. *J Appl Physiol* (1985). 1994;76(4):1594–9.
97. Molkov YI, Zoccal DB, Moraes DJ, Paton JF, Machado BH, Rybak IA. Intermittent hypoxia-induced sensitization of central chemoreceptors contributes to sympathetic nerve activity during late expiration in rats. *J Neurophysiol*. 2011;105(6):3080–91.
98. Marchenko V, Koizumi H, Mosher B, Koshiya N, Tariq MF, Bezdudnaya TG, et al. Perturbations of respiratory rhythm and pattern by disrupting synaptic inhibition within pre-Bötzinger and Bötzing complexes. *eNeuro*. 2016;3(2):0011–16.
99. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. Amsterdam ; Boston ;: Academic Press/Elsevier; 2007.
100. Flor KC, Silva EF, Menezes MF, Pedrino GR, Colombari E, Zoccal DB. Short-Term Sustained Hypoxia Elevates Basal and Hypoxia-Induced Ventilation but Not the Carotid Body Chemoreceptor Activity in Rats. *Front Physiol*. 2018;9:134.
101. Mateika JH, Essif E, Fregosi RF. Effect of hypoxia on abdominal motor unit activities in spontaneously breathing cats. *J Appl Physiol* (1985). 1996;81(6):2428–35.
102. Huckstepp RT, Cardoza KP, Henderson LE, Feldman JL. Role of parafacial nuclei in control of breathing in adult rats. *J Neurosci*. 2015;35(3):1052–67.
103. Burke PG, Kanbar R, Basting TM, Hodges WM, Viar KE, Stornetta RL, et al. State-dependent control of breathing by the retrotrapezoid nucleus. *J Physiol*. 2015;593(13):2909–26.
104. Lemes EV, Colombari E, Zoccal DB. Generation of active expiration by serotonergic mechanisms of the ventral medulla of rats. *J Appl Physiol* (1985). 2016;121(5):1135–44.

105. Lemes EV, Aiko S, Orbem CB, Formentin C, Bassi M, Colombari E, et al. Long-term facilitation of expiratory and sympathetic activities following acute intermittent hypoxia in rats. *Acta Physiol (Oxf)*. 2016;217(3):254–66.
106. Magalhaes KS, Spiller PF, da Silva MP, Kuntze LB, Paton JFR, Machado BH, et al. Locus Coeruleus as a vigilance centre for active inspiration and expiration in rats. *Sci Rep*. 2018;8(1):15654.
107. Fregosi RF, Bartlett D, Jr. Central inspiratory influence on abdominal expiratory nerve activity. *J Appl Physiol*. 1988;65(4):1647–54.
108. Takasaki Y, Orr D, Popkin J, Xie AL, Bradley TD. Effect of hypercapnia and hypoxia on respiratory muscle activation in humans. *J Appl Physiol* (1985). 1989;67(5):1776–84.
109. Abe T, Yamada T, Tomita T, Easton PA. Posture effects on timing of abdominal muscle activity during stimulated ventilation. *J Appl Physiol* (1985). 1999;86(6):1994–2000.
110. Abe T, Kusuhara N, Yoshimura N, Tomita T, Easton PA. Differential respiratory activity of four abdominal muscles in humans. *J Appl Physiol* (1985). 1996;80(4):1379–89.
111. Zoccal DB, Vieira BN, Mendes LR, Evangelista AB, Leirao IP. Hypoxia sensing in the body: An update on the peripheral and central mechanisms. *Exp Physiol*. 2024;109(4):461–9.
112. Rajani V, Zhang Y, Jalubula V, Rancic V, SheikhBahaei S, Zwicker JD, et al. Release of ATP by pre-Botzinger complex astrocytes contributes to the hypoxic ventilatory response via a Ca^{2+} -dependent P2Y1 receptor mechanism. *J Physiol*. 2018;596(15):3245–69.
113. Mortola JP, Lauzon AM, Mott B. Expiratory flow pattern and respiratory mechanics. *Can J Physiol Pharmacol*. 1987;65(6):1142–5.
114. Buchanan GF, Smith HR, MacAskill A, Richerson GB. 5-HT_{2A} receptor activation is necessary for CO₂-induced arousal. *J Neurophysiol*. 2015;114(1):233–43.
115. Abbott SBG, Souza GMP. Chemoreceptor mechanisms regulating CO₂-induced arousal from sleep. *J Physiol*. 2021;599(10):2559–71.
116. Sherrey JH, Pollard MJ, Megirian D. Proprioceptive, chemoreceptive and sleep state modulation of expiratory muscle activity in the rat. *Exp Neurol*. 1988;101(1):50–62.
117. Megirian D, Pollard MJ, Sherrey JH. The labile respiratory activity of ribcage muscles of the rat during sleep. *J Physiol*. 1987;389:99–110.
118. Li P, Yackle K. Sighing. *Curr Biol*. 2017;27(1):88–9.

119. Lieske SP, Thoby-Brisson M, Telgkamp P, Ramirez JM. Reconfiguration of the neural network controlling multiple breathing patterns: eupnea, sighs and gasps. *Nat Neurosci*. 2000(3):600–7.
120. Yao Y, Chen J, Li X, Chen ZF, Li P. A carotid body-brainstem neural circuit mediates sighing in hypoxia. *Curr Biol*. 2023;33:827–37.
121. Wilson CG. Respiration: The circuit for hypoxia-induced sighs. *Curr Biol*. 2023;33(6):248–50.
122. Richter DW, Smith JC. Respiratory rhythm generation in vivo. *Physiology (Bethesda)*. 2014;29(1):58–71.
123. Guyenet PG, Sevigny CP, Weston MC, Stornetta RL. Neurokinin-1 receptor-expressing cells of the ventral respiratory group are functionally heterogeneous and predominantly glutamatergic. *J Neurosci*. 2002;22(9):3806–16.
124. Mellen NM, Janczewski WA, Bocchiaro CM, Feldman JL. Opioid-induced quantal slowing reveals dual networks for respiratory rhythm generation. *Neuron*. 2003;37(5):821–6.
125. Takeda S, Eriksson LI, Yamamoto Y, Joensen H, Onimaru H, Lindahl SG. Opioid action on respiratory neuron activity of the isolated respiratory network in newborn rats. *Anesthesiology*. 2001;95(3):740–9.
126. Sears TA, Berger AJ, Phillipson EA. Reciprocal tonic activation of inspiratory and expiratory motoneurons by chemical drives. *Nature*. 1982;299:728–30.
127. Kawaguchi Y, Kubota Y. GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex*. 1997;7(6):476–86.
128. Sohal VS, Zhang F, Yizhar O, Deisseroth K. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature*. 2009;459(7247):698–702.
129. Cardin JA, Carlén M, Meletis K, Knoblich U, Zhang F, Deisseroth K. Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature*. 2009;459(7247):663–7.
130. Freund TF, Katona I. Perisomatic inhibition. *Neuron*. 2007;56(1):33–42.
131. Bartos M, Vida I, Jonas P. Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(1):45–56.
132. Tepper JM, Koós T, Wilson CJ. GABAergic microcircuits in the neostriatum. *Trends Neurosci*. 2004;27(11):662–9.
133. Thankachan S, Katsuki F, McKenna JT, Yang C, Shukla C, Deisseroth K. Thalamic reticular nucleus parvalbumin neurons regulate sleep spindles and electrophysiological aspects of schizophrenia in mice. *Sci Rep*. 2019;9(1):3607.

134. Radovanovic L, Petrovic J, Saponjic J. Hippocampal and reticulo-thalamic parvalbumin interneurons and synaptic re-organization during sleep disorders in the rat models of Parkinson's disease neuropathology. *Int J Mol Sci.* 2021;22(16):8922.
135. Celio MR. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience.* 1990;35(2):375–475.
136. Schreihof AM, Stornetta RL, Guyenet PG. Evidence for glycinergic respiratory neurons: Botzinger neurons express mRNA for glycinergic transporter 2. *J Comp Neurol.* 1999;407(4):583–97.
137. Ezure K, Tanaka I, Saito Y. Activity of brainstem respiratory neurones just before the expiration-inspiration transition in the rat. *J Physiol.* 2003;547(Pt 2):629–40.
138. Ezure K, Tanaka I, Saito Y. Brainstem and spinal projections of augmenting expiratory neurons in the rat. *Neurosci Res.* 2003;45(1):41–51.
139. Stuth EA, Stucke AG, Brandes IF, Zuperku EJ. Anesthetic effects on synaptic transmission and gain control in respiratory control. *Respir Physiol Neurobiol.* 2008;164(1-2):151–9.