



Programa de Doctorado de BIOMEDICINA, INVESTIGACIÓN
TRASLACIONAL Y NUEVAS TECNOLOGÍAS EN SALUD

Facultad de Medicina
Universidad de Málaga

TESIS DOCTORAL

CONTROL HIPOTALÁMICO DE LA ACTIVIDAD MOTORA LARÍNGEA

Laura Carrillo Franco

Directores:

Prof. Dr. Manuel Víctor López González

Prof. Dr. Marc Stefan Dawid Milner

Tutor/a

Prof. Dr. Marc Stefan Dawid Milner

Málaga, 2026



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTORA: Laura Carrillo Franco

 <https://orcid.org/0000-0002-3835-7633>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA

D./Dña: LAURA CARRILLO FRANCO, estudiante del Programa de Doctorado en BIOMEDICINA, INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL Y NUEVAS TECNOLOGÍAS EN SALUD de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis titulada CONTROL HIPOTALÁMICO DE LA ACTIVIDAD MOTORA LARÍNGEA, presentada para la obtención del título de Doctor/a por la Universidad de Málaga, realizada bajo la tutorización de MARC STEFAN DAWID MILNER y dirección de MARC STEFAN DAWID MILNER y MANUEL VÍCTOR LÓPEZ GONZÁLEZ (si tuviera varios directores/as, deberá hacer constar todos los nombres).

Declaro que:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), y sus posteriores modificaciones.

La tesis presentada es fruto de mi trabajo personal. Todas las fuentes han sido citadas correctamente y cualquier uso de herramientas de Inteligencia Artificial (IA) ha sido informado de manera transparente.

DECLARACIÓN SOBRE EL USO DE HERRAMIENTAS DE INTELIGENCIA ARTIFICIAL (IA)

Declaro que:

Con la conformidad de mi(s) director(a/es/as), que en la elaboración y redacción de la tesis depositada para solicitar su admisión a trámite he realizado el siguiente uso de herramientas de Inteligencia Artificial (IA):

- No he hecho uso de herramientas de IA para la elaboración y redacción de la tesis doctoral.
- He hecho uso de la/s siguiente/s herramienta/s de IA en los contenidos señalados a continuación, siendo consciente de que ésta puede proporcionar resultados erróneos o sesgados. He comprobado, revisado y editado cuidadosamente el resultado del uso de la IA y soy responsable, en última instancia, del contenido del manuscrito presentado.



Herramienta	Finalidad	Apartado
ChatGPT (OpenAI)	Edición de imágenes	Figuras 1 y 8 (Introducción) Figuras 9 y 12 (Material y métodos)
ChatGPT (OpenAI)	Asistencia lingüística	Thesis summary
ChatGPT (OpenAI)	Asistencia lingüística	Conclusions
ChatGPT (OpenAI)	Apoyo búsqueda bibliográfica	Introducción

DECLARACIÓN SOBRE EL CONTROL ANTIPLAGIO

Declaro que:

- He realizado un control antiplagio sobre el texto completo de mi tesis utilizando la herramienta indicada por la Universidad. He incorporado al DAD el documento generado por dicha herramienta, sin efectuar modificación alguna en el mismo.
- Igualmente asumo, ante la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme el ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a fecha de 20 de febrero de 2026

FIRMAS	
Doctorando/a: Laura Carrillo Franco	Tutor/a: Marc Stefan Dawid Milner
Director/a/es/as: Manuel Víctor López González Marc Stefan Dawid Milner	



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

D. Manuel Víctor López González, Profesor Permanente Laboral del Departamento de Fisiología Humana, Histología Humana, Anatomía Patológica y de la Educación Física y Deportiva de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga.

Informa:

Que Dña. **Laura Carrillo Franco** ha realizado bajo mi dirección, y dentro del Programa de Doctorado de **Biomedicina, Investigación Traslacional y Nuevas Tecnologías en Salud** de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga, el trabajo presentado en esta Tesis Doctoral titulada: ***“Control Hipotalámico de la Actividad Motora Laríngea”***.

Tras la revisión de la presente memoria, estimo oportuna su presentación ante la Comisión de Evaluación correspondiente, autorizando su exposición y defensa para optar al Grado de Doctora por la Universidad de Málaga.

Y para que así conste, en cumplimiento de las disposiciones legales vigentes, firmo el presente informe en Málaga a 20 de febrero de 2026:

Director de la Tesis Doctoral
Fdo. Prof. Dr. D. Manuel Víctor López González





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

D. Marc Stefan Dawid Milner, Profesor Titular del Departamento de Fisiología Humana, Histología Humana, Anatomía Patológica y de la Educación Física y Deportiva de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga.

Informa:

Que Dña. **Laura Carrillo Franco** ha realizado bajo mi dirección, y dentro del Programa de Doctorado de **Biomedicina, Investigación Traslacional y Nuevas Tecnologías en Salud** de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga, el trabajo presentado en esta Tesis Doctoral titulada: ***“Control Hipotalámico de la Actividad Motora Laríngea”***.

Tras la revisión de la presente memoria, estimo oportuna su presentación ante la Comisión de Evaluación correspondiente, autorizando su exposición y defensa para optar al Grado de Doctora por la Universidad de Málaga.

Y para que así conste, en cumplimiento de las disposiciones legales vigentes, firmo el presente informe en Málaga a 24 de marzo de 2026.

Director y Tutor de la Tesis Doctoral
Fdo. Prof. Dr. D. Marc Stefan Dawid Milner



*A mis abuelos,
a mis padres,
a mis hermanas,
a mis sobrinos,
a mi Travis.*



“El fracaso es no intentarlo”

– **Marc Márquez**

Esta tesis es el resultado de muchos años de esfuerzo, y no habría sido posible sin el cariño, la paciencia y el apoyo incondicional de quienes me habéis acompañado en este camino. Pido disculpas si alguien no aparece mencionado de forma explícita.

En primer lugar, deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis, el Prof. Dr. Manuel Víctor López González, y a mi tutor y director de tesis, el Prof. Dr. Marc Stefan Dawid Milner, quienes con su conocimiento y experiencia han contribuido de forma decisiva en el desarrollo de este trabajo. Gracias por cambiar mi visión de la neurofisiología, la investigación y por ser mis referentes en la docencia. Agradezco profundamente la guía, dedicación y apoyo que me habéis brindado, no solo en el ámbito académico y profesional, sino también a nivel personal. Gracias por vuestros consejos desinteresados, por vuestro interés en mi bienestar y por no cerrarme el camino en el mundo de la Anatomía Patológica. Gracias también por abrirme las puertas de vuestras casas y, sobre todo, por vuestra amistad y por haber hecho este proceso mucho más humano. Formar parte de este proyecto ha sido un privilegio y os voy a estar eternamente agradecida.

A la Dra. Dña. Marta González García, mi compañera de investigación y un pilar fundamental en el laboratorio. Gracias por tus inagotables y acertados consejos, por estar siempre dispuesta a ayudarme y, sobre todo, por adelantarte a mis pasos, guiándome con la experiencia de quien ya había recorrido el camino. Gracias también por los momentos de risa, tanto dentro como fuera de la facultad. A la futura Dra. Dña. Carmen Morales Luque, que a pesar de ser la última en incorporarse al grupo, ha sabido demostrarme su cercanía, ayuda, preocupación y apoyo moral en esta etapa final.

A mis compañeros y amigos del departamento de Fisiología Humana de la Facultad de Medicina: Laura García, Belén Gago, Silvia Claros y Pablo Zamorano. Gracias por vuestra generosidad, por el trabajo compartido y carente de competencia. Gracias a Belén Gago, a Alicia Rivera y a Marina Ponce, por abrirme las puertas del laboratorio de Biología Celular y transmitirme sus conocimientos. Sin ellas, la consecución de esta tesis doctoral no habría sido posible.

A María García Fernández, directora del departamento de Fisiología Humana, por escucharme en momentos difíciles, por sus preguntas en el pasillo de *'Niña, ¿cómo vas?'* cargadas de su acento tan castellano y por siempre intentar ayudarme. A Estrella Lara, por su apoyo, por sus consejos y por su ayuda al proporcionarme el tan preciado rojo neutro que necesitaba para culminar con éxito los experimentos.

Agradecer a todas las instituciones que han hecho posible este trabajo: a la Universidad de Málaga, por haberme acogido desde 2015 y haberme permitido desarrollar mi carrera académica y profesional; al Max Planck Institute for Brain Research de Frankfurt, por permitirme realizar mi estancia internacional y vivir una experiencia inolvidable a nivel

científico y personal. *Danke schön* a todo el equipo, en especial, a la Dra. Alison Barker y Dra. Luciana López Jury.

También quisiera agradecer a la Clínica Universidad de Navarra y, sobre todo, al Dr. Secundino Fernández González y a Dña. Beatriz del Río Aróstegui por adentrarme en el mundo de la evaluación clínica de la voz. Así como a la Prof. Dra. Isabel Rocha, por su inteligencia y su inagotable capacidad de trabajo. Gracias por cada conversación que me ha animado y por la claridad con la que siempre ve las cosas.

A mi familia. A mi padre y a mi madre, por enseñarme con su ejemplo el verdadero valor del esfuerzo, el sacrificio, el trabajo y la humildad. Gracias por apoyarme siempre, en cada decisión y en cada paso que he dado, incluso cuando el camino no era fácil. Todo lo que soy os lo debo, en gran parte, a vosotros. A mi hermana Belén, quien me ha hecho el mayor regalo de mi vida, mis sobrinos Paco y Samuel, que con una sola sonrisa son capaces de llenar de luz mis días más grises. A mi auténtica mitad, mi hermana Cris, con quien he caminado de la mano toda mi vida, mi espejo y mi mayor apoyo. Gracias por ser ese refugio en el que siempre encuentro calma. Os quiero.

A mi amigo fiel e incondicional de cuatro patas, mi Travis, que sin articular palabra sabe darme la tranquilidad y el acompañamiento justo que necesito en cada momento. Travis, gracias por tu presencia durante las largas horas de escritura, por nuestras charlas mentales y silencios compartidos frente al mar. Te guau mucho *Lord Travintong*.

A mis abuelos maternos, Agustín y Juana que, aunque nos dejaron hace un tiempo siguen estando presentes en mi memoria. Gracias por la huella que habéis dejado en mi corazón y por haber hecho de mi infancia una etapa inmejorable. Recordaros en cada nueva experiencia de mi vida me da fuerza y calma. Os echo de menos.

A mis amigas de siempre: Bea, Bego, Cris, Isa, Marina G., Marina P., Mary, Meri, MJ y Silvia. Mi grupo de mujeres fuertes y ejemplares. Gracias por los años de amistad y gracias por cada charla, cada risa y cada escucha activa cada vez que lo he necesitado y, en especial, en esta última etapa que tanta soledad se siente.

A Miguel, quien ha llegado cuando menos lo esperaba y ha decidido embarcarse en el camino de ser mi compañero de vida en el momento más complicado. Gracias por demostrarme que el amor no se esconde, se presume, y por hacer que la distancia entre el norte y el sur parezca mucho más pequeña. Gracias también por tu amor, apoyo, cariño y por las charlas infinitas cuando más agobiada estaba. Te quiero.

Gracias a la vida por haberme dado la oportunidad de vivir este viaje a lo largo del cual he podido aprender mucho y conocer a personas increíbles. A todos los que habéis sido parte de este trabajo y proceso de crecimiento profesional y personal, millones de gracias.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ÍNDICE |

I. ABREVIATURAS	1
II. THESIS SUMMARY	3
III. INTRODUCCIÓN	50
3.1. Papel del DMH/PeF en la función autonómica y respuesta de defensa.....	53
3.1.1. Organización anatómica-funcional del hipotálamo.....	53
3.1.2. Papel del DMH/PeF en la función cardiorrespiratoria.....	55
3.1.2.1. Conexiones aferentes del DMH/PeF.....	57
3.1.2.2. Conexiones eferentes del DMH/PeF.....	59
3.1.3. Propiedades neuroquímicas del DMH/PeF.....	63
3.1.4. El DMH/PeF en la respuesta de defensa.....	64
3.1.5. Relación entre el DMH/PeF y la SGP.....	65
3.2. Papel del DMH/PeF en el control central de la actividad fonorrespiratoria... 72	72
3.2.1. Base anatómica-funcional de la respiración en la producción vocal.....	72
3.2.2. El DMH/PeF como nodo modulador de la actividad fonorrespiratoria.....	75
3.2.3. Conexiones del DMH/PeF con los grupos respiratorios bulbopontinos.....	76
3.2.3.1. Grupo Respiratorio Pontino.....	76
3.2.3.1.1. Complejo Parabraquial.....	76
3.2.3.1.2. Núcleo Kölliker-Fuse.....	77
3.2.3.2. Grupo Respiratorio Dorsal.....	79
3.2.3.3. Grupo Respiratorio Ventral.....	80
3.2.3.3.1. Complejo pre-Bötzingher.....	80
3.2.3.3.2. Complejo Bötzingher.....	81
3.2.3.3.3. Núcleo Retroambiguo.....	82
3.2.3.4. Núcleo Ambiguo.....	84
3.2.4. Foxp2 como marcador molecular de los circuitos laringo-respiratorios.....	88
3.3. Papel de la laringe en la coordinación fonorrespiratoria: anatomía, fisiología y roedores como modelo animal 90	90
3.3.1. Anatomía y funciones de la laringe.....	90
3.3.2. Cartílagos laríngeos.....	91
3.3.3. Músculos laríngeos.....	92
3.3.4. Inervación laríngea.....	95
3.3.5. Bases biomecánicas y aerodinámicas de la laringe.....	96
3.3.6. Diferencias anatómicas: roedores como modelo animal.....	97
3.4. Implicaciones clínicas..... 101	101
IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	104
V. MATERIAL Y MÉTODOS	107

5.1.	Modelo animal.....	108
5.2.	Protocolo quirúrgico.....	109
5.3.	Estudio de inmunotinción: expresión y coexpresión de las proteínas c-Fos y Foxp2 en el nA por la estimulación eléctrica del DMH/PeF.....	113
5.3.1.	Procesamiento del tejido.....	114
5.3.2.	Anticuerpos primarios.....	115
5.3.3.	Protocolo de la técnica de inmunohistoquímica: doble marcaje c-Fos/ChAT y Foxp2/ChAT.....	116
5.3.4.	Protocolo de la técnica de inmunofluorescencia: doble marcaje c-Fos/Foxp2.....	117
5.3.5.	Análisis y cuantificación del marcaje inmunohistoquímico.....	118
5.3.6.	Análisis y cuantificación del marcaje inmunofluorescente.....	119
5.4.	Estudio neurofuncional: análisis y caracterización de la relación funcional entre el DMH/PeF y el nA.....	121
5.4.1.	Caracterización de la actividad eléctrica neuronal del nA durante la estimulación de DMH/PeF.....	121
5.4.2.	Caracterización de la respuesta de presión subglótica inducida por la estimulación eléctrica y química del DMH/PeF.....	125
5.4.3.	Tratamiento histológico.....	126
5.4.4.	Sistema de registro y análisis de las variables registradas.....	126
5.5.	Análisis estadístico.....	131
5.5.1.	Análisis estadístico del estudio de inmunotinción.....	131
5.5.2.	Análisis estadístico del estudio neurofuncional.....	131
VI.	RESULTADOS	133
6.1.	Interacción DMH/PeF y nA: experimentos c-Fos/Foxp2/ChAT-ir.....	134
6.1.1.	Distribución de neuronas c-Fos-ir y su colocalización con ChAT.....	134
6.1.2.	Distribución de neuronas Foxp2-ir y su colocalización con ChAT.....	135
6.1.3.	Coexpresión de c-Fos-ir y Foxp2-ir.....	144
6.2.	Interacción DMH/PeF y nA: experimentos de registro neuronal.....	147
6.3.	Interacción DMH/PeF y nA: experimentos de estimulación eléctrica/química y presión subglótica.....	156
6.3.1.	Estimulación eléctrica del DMH/PeF y medición de presión subglótica.....	156
6.3.2.	Estimulación química del DMH/PeF y medición de presión subglótica.....	162
VII.	DISCUSIÓN	171
7.1.	Consideraciones generales.....	173
7.2.	Consideraciones metodológicas: modelo animal, cirugía y técnicas experimentales.....	174

7.3. Interacción DMH/PeF y nA: experimentos c-Fos/Foxp2/ChAT-ir.....	178
7.3.1. Expresión de c-Fos y su colocalización con ChAT.....	178
7.3.2. Expresión de Foxp2 y su colocalización con ChAT.....	181
7.3.3. Coexpresión de c-Fos/Foxp2.....	182
7.4. Interacción DMH/PeF y nA: experimentos del registro de la actividad neuronal unitaria extracelular del nA.....	185
7.5. Interacción DMH/PeF y nA: experimentos con estimulación eléctrica/química y presión subglótica.....	189
7.5.1. Efectos de la estimulación eléctrica en el DMH/PeF sobre la presión subglótica.....	189
7.5.2. Efectos de la estimulación química en el DMH/PeF sobre la presión subglótica.....	190
VIII. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	194
IX. REFERENCIAS	199
X. ANEXOS	259
Anexo I. Material y equipamiento para técnicas de inmunomarcaje.....	260
Anexo II. Material y equipamiento para estudio neurofuncional.....	262
Anexo III. Índice de figuras y tablas.....	265
Anexo IV. Artículos que avalan la tesis.....	267

I. ABREVIATURAS

10N: núcleo motor dorsal del vago	IML: columna intermediolateral de la médula espinal
A1: grupo catecolaminérgico A1	KF: núcleo Kölliker-Fuse
A5: región de células noradrenérgicas A5	LC: locus coeruleus
ACTH: hormona adrenocorticotropa	nA: núcleo ambiguo
aDH: área de defensa hipotalámica	NLR: nervio laríngeo recurrente
AmbC: formación compacta del núcleo ambiguo	NLS: nervio laríngeo superior
AmbL: formación dispersa del núcleo ambiguo	NMDA: receptores de N-metil-D-aspartato
AmbSC: formación semicompacta del núcleo ambiguo	NPY: neuropéptido Y
BAT: tejido adiposo marrón	nRA: núcleo retroambiguo
BNST: núcleo de la estría terminal	NTS: núcleo del tracto solitario
BötC: complejo bötzinger	PBI: núcleo parabraquial lateral
BVLR: bulbo ventrolateral rostral	PBm: núcleo parabraquial medial
C1: células C1 adrenérgicas	PFCm: corteza prefrontal medial
c-Fos: proteína del gen <i>Fos</i>	PiCo: complejo postinspiratorio
ChAT: colina acetiltransferasa	Pre-BötC: complejo pre-Bötzinger
CI: corteza insular	PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo
cPB: complejo parabraquial	RP: rafe pálido
CVLM: bulbo ventrolateral caudal	RSNA: actividad simpática nerviosa renal
DMH/PeF: núcleo hipotalámico dorsomedial y el área perifornical	SGP: sustancia gris periacueductal
DP/DTT: corteza peduncular dorsal/tenia tecta dorsal	SGPd: sustancia gris periacueductal dorsal
Foxp2: proteína del gen Forkhead box P2	SGPdl: sustancia gris periacueductal dorsolateral
GRD: grupo respiratorio dorsal	SGPI: sustancia gris periacueductal lateral
GRP: grupo respiratorio pontino	SGPvl: sustancia gris periacueductal ventrolateral
GRpF: grupo respiratorio parafacial	
GRV: grupo respiratorio ventral	
GRVc: grupo respiratorio ventral caudal	
GRVr: grupo respiratorio ventral rostral	



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

THESIS SUMMARY



II. THESIS SUMMARY

2.1. Introduction

Activation of the dorsomedial hypothalamic nucleus (DMH) and the perifornical area (PeF)—collectively known as the hypothalamic defense area (HDA)—induces increases in blood pressure, heart rate, cutaneous vasoconstriction, and ventilation, thereby highlighting their critical role in coordinating autonomic responses to threatening stimuli [1-7]. These responses are supported by extensive afferent and efferent connections with other regions that contribute to cardiorespiratory regulation. The DMH/PeF receives inputs primarily from cortical [8-10], limbic, and hypothalamic regions [6, 11, 12] and projects to brainstem areas involved in the control of cardiorespiratory rhythms [13-18], as well as in the regulation of the baroreflex and chemoreflex [19-24].

In addition to its role in cardiorespiratory regulation, the DMH/PeF has also been implicated in vocalization in mammals. Early studies in cats showed that electrical stimulation of hypothalamic regions—such as the dorsomedial, ventromedial, and supraoptic nuclei—elicited different types of vocalizations [25, 26], ranging from growls, hisses, and intense screams—often accompanied by autonomic responses like tachycardia or piloerection, and defensive or aggressive behaviors—to more structured harmonic vocalizations not clearly associated with emotional states [27, 28]. Despite the significance of these findings, most of this evidence comes from studies conducted between the 1930s and 1980s, and since then, the role of the hypothalamus in vocal control has received limited attention compared to other brain regions such as the periaqueductal gray matter (PAG). However, it has become increasingly clear that vocalization depends on the precise orchestration of neuromuscular systems, respiratory circuits, and subcortical structures.

In the hierarchical model of vocal control proposed by Jürgens [29], the DMH/PeF occupies a higher-level position, integrating affective signals and projecting to the PAG, located at an intermediate level. The PAG functions as a vocal premotor center, organizing motor patterns that are subsequently relayed to lower-level brainstem nuclei [30, 31]. The PAG has been the main focus of vocal control studies because its microstimulation can evoke vocalizations in several species, including cats, monkeys, birds, and humans [32-35]. This role is attributed to its strategic anatomical location between higher and lower levels of control: it receives input from the laryngeal motor cortex [32, 36] and outputs to the nucleus retroambiguus (nRA) and other bulbar nuclei [35], thereby facilitating the integration of affective and motor signals into coordinated respiratory and laryngeal patterns essential for vocal production.

At the lower motor level, the nRA converts passive breathing into active respiration through inspiratory premotoneurons located in the rostral ventral respiratory group (rVRG)

and expiratory premotoneurons within caudal ventral respiratory group (cVRG) [31]. These neurons not only coordinate respiratory movements but also modulate abdominal pressure and project to the nucleus ambiguus (nA), where they regulate laryngeal motoneuron activity [37-40]. The nA controls pharyngeal and laryngeal patency, as well as subglottic pressure, via adduction and abduction of the vocal folds [35, 41, 42]. This is mediated by motoneurons distributed across three functional domains: the compact formation (esophageal control), the semicompact formation (cricothyroid innervation), and the loose formation (intrinsic laryngeal muscles, regulating phonation and laryngeal resistance) [43-45]. These motoneurons are cholinergic, characterized by the expression of the enzyme choline acetyltransferase (ChAT), which is essential for the synthesis of the neurotransmitter acetylcholine [46]. Alongside these cholinergic motoneurons, the nA also contains interneurons, which are smaller, less morphologically complex, and thought to integrate afferent inputs before reaching the laryngeal motoneurons [47].

The functional connectivity between the PAG and these brainstem nuclei has been demonstrated in previous studies by our group. In anesthetized rats, we observed that stimulation of the dIPAG induces c-Fos expression in the compact and loose domains of the nA, reflecting neuronal activation. This was associated with a decrease in subglottic pressure due to increased glottal opening [48]. Vocal fold position directly regulates subglottic pressure: closure increases pressure, whereas opening decreases it, thereby modulating airflow and vocal quality [35]. Furthermore, we observed Foxp2 expression in the semicompact and loose domains, supporting their involvement in fine vocal control [48]. Foxp2 is a highly conserved transcription factor involved in the acquisition of fine motor skills required for vocal production in humans and other communicative species such as birds and rodents [49, 50]. This functional connectivity has also been demonstrated using electrophysiological neuronal recordings in anesthetized rats. These experiments showed that microstimulation of the dIPAG robustly modulates the activity of multiple neuronal populations within the nA. Specifically, we identified six distinct neuronal groups—including inspiratory and expiratory respiratory neurons, cardiovascular-related neurons, and non-modulated units—all exhibiting rapid excitatory or inhibitory responses [51].

Additionally, the dIPAG is involved in autonomic aspects of the defensive response, eliciting behavioural and cardiorespiratory adjustments similar to those induced by DMH/PeF activation [52, 53]. These effects are mediated by its connections with the prefrontal cortex, amygdala, and the dorsomedial hypothalamus, as well as its projections to pontomedullary cardiorespiratory centers shared with the DMH/PeF [53-56]. Previous studies from our group and other authors have shown that the parabrachial complex (PBc) and the A5 region are involved in the defensive response evoked by stimulation of both structures [15-18, 57, 59]. We also characterized the influence of these pontine regions on laryngeal motoneuron activity using the "in situ isolated glottis" technique. This method, which isolates the lower

airways from the larynx, enables precise assessment of laryngeal resistance, without interference from airflow-activated laryngeal reflexes [60].

Although classical studies have shown that the DMH/PeF can evoke vocalizations, its role within the vocal circuits remains underexplored compared to the PAG. Given that both structures are involved in defensive responses and share afferents and projections to cardiorespiratory centers, it is pertinent to ask whether the DMH/PeF, like the PAG, could directly modulate laryngeal patterns via the nA.

2.2. Hypothesis and objectives

Based on both classical and recent evidence, DMH/PeF are recognized as key components of the neural networking that coordinates defensive, autonomic and respiratory behaviors [1-7]. However, their possible influence on laryngeal motor activity remains unexplored. Thus, the present study was designed to investigate the potential role of the DMH/PeF in laryngeal control and its functional relationship with the nA.

According to this, the present study proposes the following hypothesis:

Hypothesis 1: Continuous electrical stimulation of the DMH/PeF for one hour will increase the expression of the neuronal activity marker c-Fos and promote its co-expression with Foxp2 in the nA.

Hypothesis 2: Extracellular single-unit recordings from the nA during DMH/PeF stimulation will demonstrate that this hypothalamic region modulates the activity of laryngeal motoneurons located within the nA.

Hypothesis 3: Activation of the DMH/PeF, through both electrical and chemical stimulation, will produce measurable effects on subglottic pressure.

Based on the proposed hypotheses, the objectives of this study are as follows:

General Objective

To describe, in rats, the influence of the DMH/PeF on the nA in the control of laryngeal activity, with the aim of identifying and expanding current knowledge about the neuronal mechanisms involved in respiratory function and vocalization.

Specific Objectives

Objective I: To characterize the morphofunctional relationship between the DMH/PeF and the nA following electrical stimulation of the DMH/PeF, through the analysis of c-Fos and Foxp2 protein expression in the different subdivisions of the nA.

Objective II: To characterize the neuronal activity of the nA using *in vivo* extracellular single-unit recordings, comparing firing patterns at baseline and after electrical stimulation of the DMH/PeF.

Objective III: To determine the role of the DMH/PeF in the regulation of laryngeal and cardiorespiratory responses through electrical and chemical stimulation of the DMH/PeF, combined with the application of the *in situ isolated glottis* technique to measure subglottic pressure.

2.3. Material and methods

2.3.1. Animals and hosting

A total of 43 adult male Sprague–Dawley rats (SPF; OFA-SD IOPS Caw), 3–6 months old and weighing 300–350 g, were obtained from Charles River Laboratories (Barcelona, Spain); however, 6 of them were excluded from the statistical analysis. They were kept in groups of six in the Animal House of the University of Malaga under controlled conditions (21 ± 1 °C; 12:12 h light–dark cycle) with food and water available ad libitum.

2.3.2. General surgical procedure

Every surgical procedure was performed using previously described techniques [17, 48, 59]. Sodium pentobarbitone (60 mg/kg) was injected intraperitoneally to induce anesthesia, and intravenous supplements (2 mg/kg) were administered as needed. For administering medication and measuring arterial blood pressure, respectively, the femoral artery and vein were cannulated. The trachea and esophagus were also cannulated in order to measure respiratory flow and pleural pressure. A Fleisch pneumotachograph was used to measure respiratory flow, and an air-filled catheter was used to track pleural pressure.

2.3.3. Interaction of DMH/PeF and nA: c-Fos/Foxp2/ChAT-ir experiments

In 10 animals, access to the right DHM/PeF was achieved by drilling a hole in the skull. On this side, a concentric bipolar electrode (Rhodes Medical Electrodes, SNE-100) was implanted. The Paxinos and Watson atlas [61] was used to determine the stereotaxic coordinates for electrode placement (2.2 mm–2.76 mm posterior to the bregma, 0.6 mm lateral to the midline, and 8.2 mm depth from the skull surface). To elicit the distinctive defensive response linked to the right DMH/PeF, a single stimulation was administered using 1 ms pulses of 30–50 μ A, at a frequency of 100 Hz for 5 seconds. To prevent sympathetically mediated cardiovascular reactions guanethidine was administered.

For one hour, a subgroup of rats (n=5) received 1-ms pulse trains (30–50 μ A, 100 Hz, 5 s) every 60 s to repeatedly stimulate the right DMH/PeF. The other five animals served as controls and were not stimulated. Following the experiments, rats received 0.1 M PBS (pH

7.4) transcardially, 4% paraformaldehyde in PBS, and sodium pentobarbital for deep anesthesia. After being extracted, the brains were rinsed, post-fixed overnight, and embedded in 3% agarose (Sigma) diluted in PBS. A vibrating microtome (5100mz, Campden Instruments) was used to obtain coronal brainstem sections (30 μ m thick). Sections were processed for c-Fos, Foxp2, and ChAT immunoreactivity analysis at the nA level, beginning at a random point.

c-Fos/ChAT and Foxp2/ChAT Double Immunohistochemistry

A standard avidin-biotin double immunohistochemistry protocol was used to process free-floating brain sections from control and stimulated rats. All the sections were rinsed in 0.1M PBS (pH 7.4) and pretreated with 3% H₂O₂ to block endogenous peroxidase activity. After that, sections were incubated with the primary antibodies mouse anti-c-Fos (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, SC-271243) or sheep anti-Foxp2 (1:1000; R&D Systems, AF5647) for 24 hours at room temperature (RT). After PBS washes, sections were incubated with biotinylated secondary antibodies (rabbit anti-sheep IgG or goat anti-mouse IgG; Vector Laboratories, 1:500 in PBS-TX with azide) for one hour at RT.

Following additional washing, they received a one-hour treatment with streptavidin-peroxidase (1:2000; Sigma-Aldrich). 0.8 mg/ml of nickel ammonium sulfate (Carlo Erba Reagents) was added to the chromogenic reaction, which was created in 0.05% DAB and 3% H₂O₂. Sections were incubated for 24 h at RT with a goat polyclonal anti-ChAT antibody (1:1000; Sigma-Aldrich, AB144P), followed by incubation for 1 h with a biotinylated anti-goat IgG secondary antibody (1:500; Thermo Fisher Scientific). ChAT-ir was visualized with DAB, resulting in brown labelling. Finally, sections were dehydrated through ethanol and coverslipped with DPX mounting medium.

c-Fos/ Foxp2 double Immunofluorescence

A standard indirect immunofluorescence protocol was used to process free-floating sections from control and stimulated rats. All the sections were blocked using 4% BSA and permeabilized in PBS-Tx-Az during 1 h at RT. After that, sections were incubated with the primary antibodies mouse anti-c-Fos (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, SC-271243) or sheep anti-Foxp2 (1:1000; R&D Systems, AF5647) for 48 hours at RT. After two days, the tissue was washed in PBS (3 x 5 minutes).

For detection, sections were incubated with fluorochrome-conjugated secondary antibodies (1:1,000 Alexa Fluor 647 anti-mouse; 1:1,000 Alexa Fluor 594 anti-goat) for 1 hour at RT and in darkness (diluted in BSA-PBS-TX-Az). The samples were then washed in PBS (3 x 5 minutes) and subjected to nuclear counterstaining with DAPI (1:10,000; Invitrogen) diluted in PBS for 10 minutes. The sections were then placed on gelatin-coated slides and covered with an immunofluorescence mounting medium (Dako) following a final PBS wash.

Cell counting and statistical analysis

An Olympus BX61VS optical microscope with Olympus VS imaging software was used to take histological pictures of sections that had been double-immunolabeled with c-Fos/ChAT and Foxp2/ChAT antibodies. c-Fos- and Foxp2-immunoreactive cells (black nuclei) within the nA were counted using ImageJ software (NIH) for quantification. Three main nA subdivisions—compact, semicompact, and loose formations—were used for cell counting. The Paxinos & Watson rat brain atlas was used to identify these subdivisions, and slice selection was based on distances from bregma [61]. The semicompact region was defined as spanning from -12.84 to -13.44 mm, the loose formation from -13.44 to -14.16 mm, and the compact region from bregma -12.00 to -12.84 mm. Additionally, nuclear expression of both markers was quantified in the nRA (bregma range between -14.28 mm and -15.72 mm). Three categories of cellular analysis were established: motoneurons, non-motoneurons, and total cells. The ipsilateral and contralateral sides were compared with respect to the stimulation site.

Double-labeled c-Fos/Foxp2 sections were analyzed using a Leica TCS SP5 confocal microscope with 10× and 20× oil-immersion objectives. Fluorescence was visualized with 568 nm and 488 nm lasers (Alexa Fluor 594 and 488). Images were taken at two Z-planes to confirm cell identification. Bilateral quantification of c-Fos⁺/Foxp2⁻, c-Fos⁻/Foxp2⁺, and c-Fos⁺/Foxp2⁺ cells in the semicompact formation of the nA was performed using merged fluorescence images. Semi-automated quantification of immunoreactive nuclei was carried out on both ipsilateral and contralateral sides using ImageJ (NIH).

In both techniques, data are presented as mean ± SEM, and statistical differences between groups were assessed using Student's t-test. For group comparisons (baseline vs. post-stimulation), the non-parametric Mann–Whitney U test was used. The significance level was set at p<0.05, p<0.01 y p<0.001.

2.3.4. Interaction of DMH/PeF and nA: neuronal unit recording experiments

Extracellular single-unit neuronal activity was recorded in the nA while applying electrical stimulation to either the DMH/PeF or the right vagus nerve. The experiments were performed in a total of 4 animals to analyze changes in firing rate and other electrophysiological properties. Stimulation of the DMH/PeF was achieved using a stereotaxically positioned microelectrode (2.2 mm–2.76 mm posterior to the bregma, 0.6 mm lateral to the midline, and 8.2 mm depth from the skull surface), and its location was functionally verified by observing cardiorespiratory responses after electrical stimulation of DMH/PeF (30–40 µA at 100 Hz, with 1 ms pulses, for 5 s). Stimulation for orthodromic and antidromic studies was applied at 50–100 µA, with 0,1 ms pulses at 1 Hz. The right vagus

nerve was isolated in the cervical region and stimulated at an intensity of 1 V, a frequency of 1 Hz, and a pulse duration of 0.1 ms.

Neuronal activity in the nA was recorded using tungsten microelectrodes (8–11 M Ω) mounted on a remotely controlled micropositioner. The microelectrode was positioned within the semicompact and loose formations of the nA, based on the position of the obex (0.25–1.5 mm anterior to the obex, 2 mm lateral to the midline, and at a depth of 2–2.5 mm below the surface). Signals were preamplified, filtered (100 Hz–3 kHz), and visualized on a digital oscilloscope along with blood pressure and respiratory flow to evaluate possible functional relationships. Antidromic and orthodromic stimulation tests were used to assess connectivity between DMH/PeF and nA neurons, based on criteria such as latency constancy, refractory period, and collision testing. Spike detection was optimized by monitoring neuronal discharges acoustically and by discriminating single-unit activity according to amplitude and polarity thresholds.

Data acquisition and analysis were performed using LabChartPro software, allowing detailed evaluation of spike shape, amplitude, and frequency. TTL-converted pulse signals were used to synchronize neuronal activity with stimulation events, enabling the construction of peri-stimulus histograms. Recording sites were verified histologically by electrolytic lesions at the end of each experiment to confirm the precise localization of the recorded neurons.

According to their activity and anatomical localization, neuronal discharge patterns were classified into six functional groups: inspiratory neurons with decreasing pattern of discharge; inspiratory neurons with increasing pattern of discharge; expiratory E1 neurons; expiratory E2 neurons; cardiovascular neurons; and neurons without cardiorespiratory modulation.

2.3.5. Interaction of DMH/PeF and nA: electrical/chemical stimulation and subglottic pressure measurement

The standard procedures described were modified to perform a double tracheal cannulation in 22 animals, divided in three experimental groups. This was accomplished by placing one cannula upward toward the glottis for the "in situ isolated glottis" technique and a second cannula downward toward the carina to measure respiratory flow. Both parameters could be recorded independently with this setup [48, 60]. Any possible interference from tongue activity, especially during DMH/PeF stimulation, was controlled by immobilizing the tongue.

The method was used again specifically to measure changes in subglottic pressure linked to the cardiorespiratory response elicited by DMH/PeF stimulation. To enhance the acquisition of the subglottic pressure signal, changes were made to the original experimental design. Pressure was measured using an aneroid transducer (ADInstruments, model FE141,

± 0.03 psi) as a steady stream of warm, humidified medical air (30–70 ml/min) was forced upward through the larynx. A thermal mass digital flow meter controller (Bronkhorst Hi-Tec, model F-201CVAGD-22-V) controlled this airflow. Any change in pressure was interpreted as a change in laryngeal resistance. Furthermore, the data acquisition system (PowerLab 16/30) and analysis software (LabChart Pro) were upgraded, resulting in improved sensitivity and stability of the subglottic pressure recordings. For statistical purposes, only data from animals showing stable recordings before, during, and after DMH/PeF stimulation were included in the analysis.

DMH/PeF electrical stimulation and subglottic pressure measurement

In a subset of 8 animals, a burr hole was made to access the right DMH/PeF, which was stimulated using 1-ms pulses of 30–50 μ A at 100 Hz for 5 s through a concentric bipolar electrode (SNE-100; Rhodes Medical Electrodes, Summerland, CA, USA). Electrical lesions (250 μ A DC for 20 s) were used to mark the sites of electrical and chemical stimulation in the DMH/PeF.

DMH/PeF chemical stimulation and subglottic pressure measurement

In 14 animals, a burr hole was drilled into the skull of each animal to access the right DMH/PeF. Microinjections of a solution of PBS (50 nl, pH 7.4 ± 0.1 , 5-s duration; $n = 7$) or glutamate (0.25 M, 50 nl; $n=7$) were administered using a stereotaxically positioned single glass micropipette connected to a 0.5 μ l Hamilton syringe (Model 7001 Knurled Hub [KH] Neuros Syringe). The microinjections were made in the coordinates previously described.

To identify the injection sites in subsequent histological analyses, both PBS and glutamate were dissolved in an Evans blue solution. The microinjection volume (50 nl) was precisely controlled using a micropump system (Ultra Micro Pump II, Micro 4; World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA), which actuated the 1- μ l microsyringe. Control animals received PBS with Evans blue alone and only one microinjection was performed per animal in both groups.

Data Recording and Statistical Analysis

Following the experiments, the brains were perfused with 10% formal saline. The hypothalamic region was serially sectioned at 80 μ m and staining with neutral red to verify the anatomical location of the stimulation sites. Physiological signals were continuously recorded throughout all experiments to assess both baseline and stimulus-evoked activity. The monitored variables included airflow, pleural pressure (as an index of inspiratory effort), subglottic pressure, and arterial pressure. From these data, instantaneous respiratory frequency, subglottic pressure, mean arterial pressure, and instantaneous heart rate were

analyzed. Data were acquired and stored digitally using LabChartPro software (PowerLab System, ADInstruments, version 8.0, Sydney, Australia).

Each animal underwent a two-phase experimental protocol: an initial assessment of laryngeal and cardiorespiratory parameters at rest, followed by DMH/PeF stimulation using electrical or chemical methods. Baseline measurements were obtained immediately before stimulation, and post-stimulation values were recorded 4 minutes after electrical or 30 minutes after chemical stimulation. In electrical stimulation experiments, the mean cardiorespiratory and laryngeal responses recorded during each analyzed period were considered, whereas in chemical stimulation, only the time point corresponding to the maximal response was analyzed.

All data are expressed as mean \pm SEM. IBM® SPSS® Statistics (v28.0.1.1) was used for statistical analysis, and GraphPad Prism 9 was used to create the graphs. The Shapiro-Wilk test was used to evaluate the normality of the data. A paired Student's t-test was used after normalcy was established. The non-parametric Mann-Whitney U test was employed to compare groups during chemical stimulation (PBS vs. glutamate). The thresholds for significance were set at $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$. The statistical analysis only included data from animals whose histology demonstrated that the microelectrodes were positioned within the DMH/PeF.

2.4. Results

2.4.1. Interaction DMH/PeF and nA: c-Fos/Foxp2/ChAT-ir experiments

Immunohistochemical studies: distribution of Foxp2-ir

Control animals. In non-stimulated animals, no significant differences were observed in the number of Foxp2-ir profiles between ipsilateral and contralateral sides in any of the nA subdivisions or in the nRA (Table 1, Fig. 1; corresponding to Table 3 and Fig. 13 and 14 in sections 6.1.1. and 6.1.2.).

Electrically stimulated animals. In stimulated animals, no significant ipsilateral–contralateral differences were detected in any of the nA subdomains or in the nRA (Table 1, Fig. 1 and Fig. 2; corresponding to Table 3 and Fig. 13-18 and in sections 6.1.1. and 6.1.2.).

Control vs. stimulated animals. No differences were found between groups when comparing the amplitude of ipsilateral–contralateral differences (Δ values) in any of the nA subdivisions or in the nRA (Table 1, Fig. 1; corresponding to Table 3 and Fig. 13 and 14 in sections 6.1.1. and 6.1.2.).

Immunohistochemical studies: distribution of c-Fos-ir

Control animals. In non-stimulated animals, c-Fos-ir expression was low overall but showed significant ipsilateral–contralateral differences in the loose ($p < 0.05$), semicompact ($p < 0.05$), compact ($p < 0.05$) and nRA ($p < 0.01$) domains, predominantly in non-motoneurons (Table 1, Fig. 1; corresponding to Table 3 and Fig. 13 and 14 in sections 6.1.1. and 6.1.2.).

Electrically stimulated animals. In stimulated animals, c-Fos-ir expression markedly increased compared with controls. Significant ipsilateral–contralateral differences were detected in motoneurons and non-motoneurons of the loose ($p < 0.05–0.01$), semicompact ($p < 0.01–0.001$), compact ($p < 0.05$) formations and in the nRA ($p < 0.05–0.01$) (Table 1, Fig. 1 and Fig. 2; corresponding to Table 3 and Fig. 13-18 and in sections 6.1.1. and 6.1.2.).

Control vs. stimulated animals. When comparing the amplitude of ipsilateral–contralateral differences (Δ values) between groups, significant increases were observed in stimulated animals within the semicompact formation ($p < 0.05–0.001$) and in the nRA ($p < 0.05–0.001$), while no differences were found in the loose or compact formations (Table 1, Fig. 1; corresponding to Table 3 and Fig. 13 and 14 in sections 6.1.1. and 6.1.2.).

Immunofluorescence studies: distribution of c-Fos-ir/Foxp2-ir

Control animals. In non-stimulated animals, Foxp2-ir expression was detected both ipsilaterally (105.22 ± 8.34 cells) and contralaterally (88.23 ± 9.33 cells), with no significant differences between sides. c-Fos⁺/Foxp2⁻ cells were also observed on both the ipsilateral and contralateral sides (3.56 ± 1.30 and 1.65 ± 1.85 cells, respectively). c-Fos/Foxp2 co-expression accounted for 19.36% of Foxp2-positive cells on the ipsilateral side (20.38 ± 3.11 cells) and 17.21% on the contralateral side (15.18 ± 2.30 cells) (Table 2; corresponding to Table 4 in section 6.1.3.).

Electrically stimulated animals. In stimulated animals, Foxp2-ir expression was detected both ipsilaterally (121.35 ± 9.26 cells) and contralaterally (107.18 ± 12.72 cells), with no significant differences between sides. c-Fos⁺/Foxp2⁻ cells were also observed on both the ipsilateral and contralateral sides (6.23 ± 2.56 and 2.32 ± 1.87 cells, respectively). c-Fos/Foxp2 co-expression was observed, with a significantly higher number of c-Fos⁺/Foxp2⁺ cells on the ipsilateral side (34.66 ± 4.89 cells) compared to the contralateral side (19.54 ± 2.21 cells; $p < 0.05$). The proportion of double-labeled cells was 28.57% ipsilaterally and 18.23% contralaterally (Table 2, Fig. 3; corresponding to Table 4 and Fig. 19 in section 6.1.3.).

Control vs. stimulated animals. Comparison of the magnitude of the differences (Δ values) between control and stimulated animals revealed significant differences ($p = 0.008$)

in the co-expression of c-Fos and Foxp2 between the ipsilateral and contralateral sides (Table 2; corresponding to Table 4 in section 6.1.3.).

2.4.2. Interaction DMH/PeF and nA: neuronal unit recording experiments

Extracellular unitary neuronal recordings were performed in the semicompact and loose formation of the nA and adjacent regions during electrical stimulation of the DMH/PeF in a total of 4 adult rats.

A total of 78 neurons were recorded from the nA and surrounding regions during DMH/PeF stimulation (Fig 4; corresponding to Fig. 20 in section 6.2). These neurons were classified based on their activity and location, into six functional groups: increasing inspiratory neurons, decreasing inspiratory neurons, expiratory E1 neurons, expiratory E2 neurons, cardiovascular neurons, and neurons without cardiorespiratory modulation.

A. Inspiratory neurons with decreasing pattern of discharge

Eight inspiratory neurons (10.26%) located in the loose formation of the nA were registered (mean depth: $2154.88 \pm 92.83 \mu\text{m}$; anteroposterior position: $+0.50 \pm 0.095 \text{ mm}$ anterior to the obex; mediolateral position: $1.84 \pm 0.094 \text{ mm}$ lateral to the midline) (Fig. 4). Its resting discharge frequency was $2.95 \pm 2.66 \text{ Hz}$, while its discharge frequency upon DMH/PeF and vagus nerve stimulation (1 Hz) was $2.81 \pm 2.58 \text{ Hz}$ and $4.86 \pm 2.14 \text{ Hz}$ ($p < 0.05$), respectively (Table 3; corresponding to Table 5 in sections 6.2.).

None of the neurons showed increases or decreases in the frequency discharge during DMH/PeF stimulation; however, changes were observed during vagal stimulation (four neurons increased its frequency by 2-5 Hz) and during combined vagal and DMH/PeF stimulation. In three of these neurons (37.5%), vagal stimulation alone evoked activation between 35 and 60 ms, whereas combined vagal and DMH/PeF stimulation produced a facilitation of the response, expanding the activation to 30–70 ms and increasing frequency discharge (Fig.5; corresponding to Fig. 21 in section 6.2.).

B. Inspiratory neurons with increasing pattern of discharge

Ten inspiratory neurons with increasing pattern of discharge (12.82%) located in the rVRG were registered (mean depth: $2537.20 \pm 93.03 \mu\text{m}$; anteroposterior position: $+0.95 \pm 0.170 \text{ mm}$ anterior to the obex; mediolateral position: $1.78 \pm 0.079 \text{ mm}$ lateral to the midline) (Fig. 4). Its resting discharge frequency was $13.81 \pm 1.90 \text{ Hz}$, while its discharge frequency upon DMH/PeF stimulation (1 Hz) was $13.82 \pm 2.20 \text{ Hz}$. There were no significant differences when comparing the frequency changes to the different stimulations (Table 3; corresponding to Table 5 in sections 6.2.).

DMH/PeF stimulation reduced the frequency discharge in three neurons (30%) by 2-3 Hz, while no changes were observed in the remaining neurons (seven cells). Vagal

stimulation decreased the frequency discharge in four neurons, increased it in three neurons, and produced no changes in three neurons.

C. Expiratory E1 neurons

Five expiratory E1 neurons (6.41%) located in the semicompact or loose formation of the nA were registered (mean depth: $2306.60 \pm 85.86 \mu\text{m}$; anteroposterior position: $+0.6 \pm 0.170$ mm anterior to the obex; mediolateral position: 1.65 ± 0.061 mm lateral to the midline) (Fig. 4). Its resting discharge frequency was 11.36 ± 6.23 Hz, while its discharge frequency upon DMH/PeF and vagus nerve stimulation (1 Hz) was 13.85 ± 6.24 Hz and 11.28 ± 6.17 Hz, respectively. There were no significant differences when comparing the frequency changes to the different stimulations (Table 3; corresponding to Table 5 in sections 6.2.).

During DMH/PeF stimulation two neurons (40%) showed an increase in their discharge frequency of 2 Hz, with one of them showing an excitatory response between 150 and 300 ms post-stimulation (Fig. 6A; corresponding to Fig. 22A in section 6.2.). No changes were observed in the remaining neurons (3 cells). Vagal stimulation decreased discharge frequency in two neurons, increased it in one neuron, and produced no changes in two neurons. The distance between DMH/PeF and nA electrodes was calculated together with the conduction velocity. The obtained values suggested a polysynaptic response.

D. Expiratory E2 neurons

Five expiratory E2 neurons (6.41%) located in the loose formation of the nA were registered (mean depth: $2343.20 \pm 75.51 \mu\text{m}$; anteroposterior position: $+0.65 \pm 0.260$ mm anterior to the obex; mediolateral position: 1.70 ± 0.145 mm lateral to the midline) (Fig. 4). Its resting discharge frequency was 15.02 ± 6.89 Hz, while its discharge frequency upon DMH/PeF and vagus nerve stimulation (1 Hz) was 16.47 ± 7.05 Hz and 13.21 ± 7.33 Hz, respectively (Table 3; corresponding to Table 5 in sections 6.2.).

During DMH/PeF electrical stimulation, two neurons (40%) showed an increase in their discharge frequency by approximately 2-3 Hz, while no changes were observed in three cells. During vagal stimulation, the discharge frequency was reduced in two neurons by 3-8 Hz and remained unchanged in three of them.

E. Cardiovascular neurons

Thirty-seven cardiovascular neurons (47.44%) located in C1/A1 (CVL) were registered (mean depth: $2913.03 \pm 97.64 \mu\text{m}$; anteroposterior position: $+0.88 \pm 0.060$ mm anterior to the obex; mediolateral position: 1.85 ± 0.024 mm lateral to the midline) (Fig. 4). Its resting discharge frequency was 16.45 ± 2.81 Hz, while its discharge frequency upon DMH/PeF and vagus nerve stimulation (1 Hz) was 18.63 ± 3.01 Hz and 16.51 ± 2.91 Hz, respectively (Table 3; corresponding to Table 5 in sections 6.2.).

During DMH/PeF electrical stimulation, four neurons showed a decrease in their discharge frequency by approximately 2-6 Hz; fourteen neurons showed an increase of approximately 2-14 Hz; and no changes were observed in nineteen neurons. During vagal stimulation, ten neurons decreased their discharge frequency by 3-9 Hz; 9 increased their discharge by 2 Hz; and no changes were observed in eight-teen neurons.

This neuronal group was strongly affected by DMH/PeF stimulation (1 Hz), with 19 of 37 neurons (51.3%) showing changes in activity. In one neuron, an excitatory response was observed between 50 and 250 ms, corresponding to an estimated axonal conduction velocity of 0.05–0.23 m/s (Fig. 7; corresponding to Fig. 23 in section 6.2.).

F. Neurons without cardiorespiratory modulation

Thirteen neurons (16.66%) without cardiorespiratory modulation were registered (mean depth: $2950.91 \pm 97.64 \mu\text{m}$; anteroposterior position: $+0.65 \pm 0.092 \text{ mm}$ anterior to the obex; mediolateral position: $1.77 \pm 0.071 \text{ mm}$ lateral to the midline) (Fig. 4). Its resting discharge frequency was $14.02 \pm 6.75 \text{ Hz}$, while its discharge frequency upon DMH/PeF and vagus nerve stimulation (1 Hz) was $14.44 \pm 6.70 \text{ Hz}$ and $14.82 \pm 6.88 \text{ Hz}$, respectively. There were no significant differences when comparing the frequency changes to the different stimulations (Table 3; corresponding to Table 5 in sections 6.2.).

During DMH/PeF electrical stimulation, two neurons showed a decreased in their discharge frequency (5 Hz); one neuron increased its discharge (15 Hz); and no changes were observed in ten neurons. Thus, DMH/PeF stimulation modified the activity of 23.1% of the neurons. During vagal stimulation, three neurons showed a decrease in discharge frequency (2-4 Hz); two neurons showed an increase (2-12 Hz); and no changes were observed in eight neurons. In one case, an activation was observed at 10–30 ms, with a peak at 12, 22 and 30 ms, yielding an estimated axonal conduction velocity of 0.58–1.18 m/s (Fig.6B; corresponding to Fig. 22B in section 6.2.).

2.4.3. Interaction DMH/PeF and nA: electrical/chemical stimulation and subglottic pressure measurement

DMH/PeF electrical stimulation and subglottic pressure measurement

Electrical stimulation within the DMH/PeF (n=8) elicited a significant increase in respiratory rate ($p < 0.01$), associated with reductions in both expiratory ($p < 0.001$) and inspiratory times ($p < 0.01$). This respiratory facilitation was accompanied by a marked decrease in laryngeal resistance ($p < 0.001$). In addition, a pressor response ($p < 0.001$) and tachycardia ($p < 0.001$) were observed (Table 4; Fig. 8-10; corresponding to Table 6 and Fig. 24-27 in section 6.3.1.).

DMH/PeF PBS microinjections and subglottic pressure measurement

Microinjections of PBS within the DMH/PeF (n=7) did not induce changes in any of the resting cardiorespiratory parameters (Table 5; Figs. 12 and Fig. 13; corresponding to Table 7 and Fig. 28, 30 and 31 in section 6.3.2.).

DMH/PeF glutamate microinjections and subglottic pressure measurement

Glutamate microinjections within the DMH/PeF (n=7) evoked a significant decrease in laryngeal resistance ($p < 0.01$), accompanied by an increase in respiratory rate ($p < 0.001$), reductions in inspiratory and expiratory times ($p < 0.001$ for both), and a rise in inspiratory pleural pressure ($p < 0.05$). Additionally, a pressor ($p < 0.001$) and tachycardic response ($p < 0.001$) were observed (Table 6; Figs. 11–13; corresponding to Table 8 and Fig. 28-31 in section 6.3.2.).

DMH/PeF PBS vs. glutamate microinjections and subglottic pressure measurement

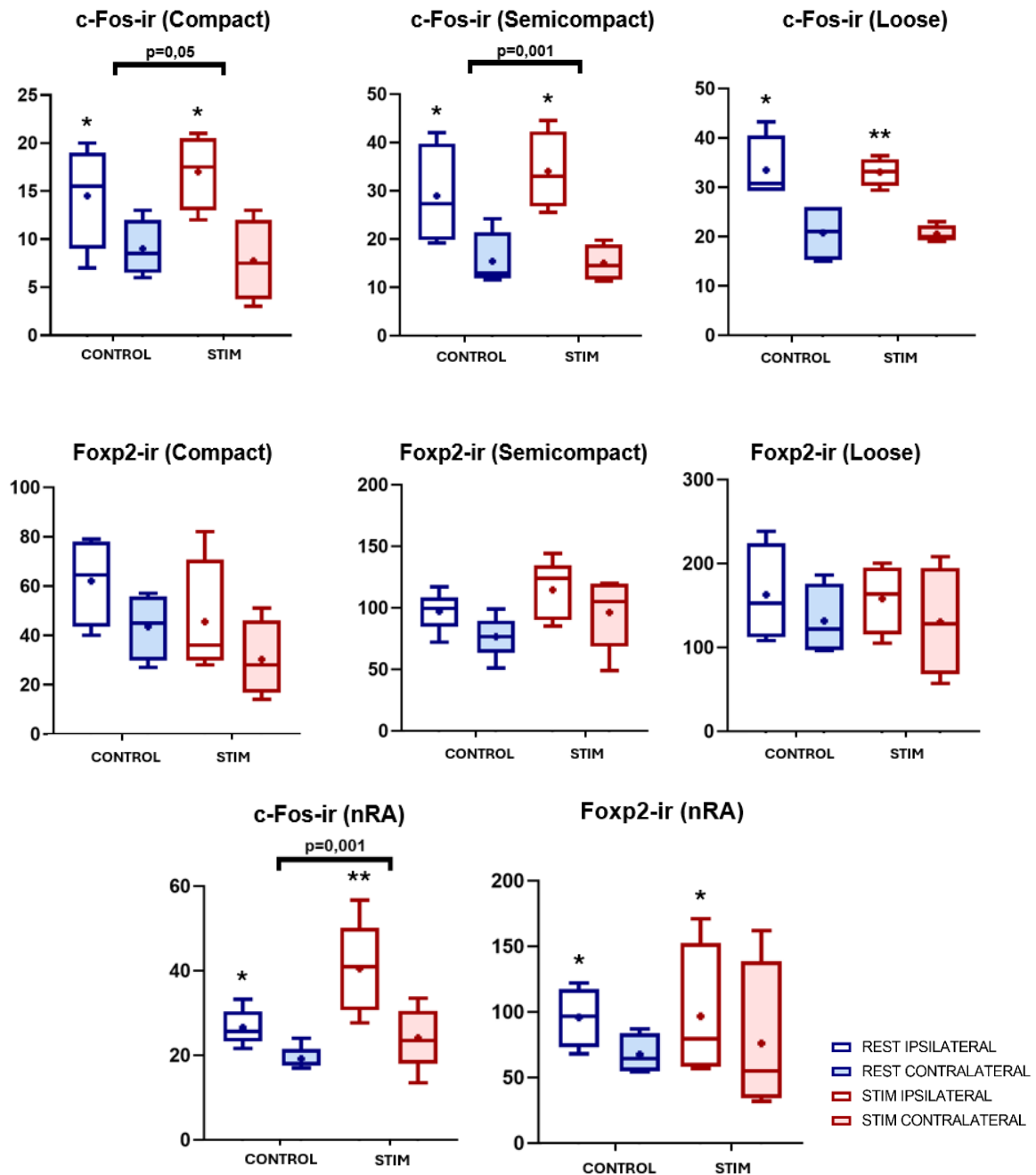
Comparison of the amplitude of the changes between PBS- and glutamate-injected animals revealed significant differences in inspiratory time (-0.010 ± 0.04 to -0.056 ± 0.006 ; $p=0.001$), expiratory time (0.00 ± 0.013 to -0.121 ± 0.021 ; $p=0.001$), respiratory rate (1 ± 0.9 to 23 ± 3.3 ; $p=0.001$), subglottic pressure (0.04 ± 0.04 to -2.04 ± 0.49 ; $p=0.001$), blood pressure (-1.14 ± 0.91 to 11.43 ± 1.45 ; $p=0.001$), and heart rate (-1 ± 0.98 to 75.57 ± 14.52 ; $p=0.001$).

Table 1. Relative quantification and distribution of c-Fos– and Foxp2–immunoreactive cells (c-Fos-ir and Foxp2-ir) within the nA and nRA nuclei in non-stimulated (control) animals and in animals subjected to electrical stimulation of the DMH-PeF (stimulated). The nA was subdivided into its three classical formations (loose, semicompact, and compact), and both ipsilateral and contralateral sides were analyzed.

Immunohistochemical Analysis (c-Fos/ChAT and Foxp2/ChAT)													
		CONTROL (n=5)						STIMULATED (n=5)					
		IPSILATERAL			CONTRALATERAL			IPSILATERAL			CONTRALATERAL		
		Moto	No-Moto	Total	Moto	No-Moto	Total	Moto	No-Moto	Total	Moto	No-Moto	Total
LOOSE FORMATION	c-Fos-ir	0.5 ± 0.25	33 ± 3.44*	33.49 ± 3.32*	0 ± 0	20.75 ± 3.04	20.75 ± 3.04	0.8 ± 0.22*	32.25 ± 1.65**	33.05 ± 1.44**	0 ± 0	20.5 ± 0.87	20.5 ± 0.87
	Foxp2-ir	2.91 ± 1.47	160 ± 30.15	162.91 ± 29.66*	1.25 ± 0.63	130.41 ± 21.56	131.66 ± 21.43	1.57 ± 0.65	156.6 ± 20.2	158.13 ± 20.83	0.32 ± 0.23	130 ± 32.94	130.32 ± 32.8
	Δ c-Fos-ir	0.49 ± 0.25	12.25 ± 3.47	12.74 ± 3.23				0.8 ± 0.22†	11.75 ± 1.55	12.55 ± 1.39			
	Δ Foxp2-ir	1.66 ± 0.84	29.59 ± 9.48	31.25 ± 8.94				1.25 ± 0.72	26.56 ± 22.19	27.81 ± 21.82			
SEMICOMPACT FORMATION	c-Fos-ir	1.65 ± 0.21	27.3 ± 5.1*	28.95 ± 5.29*	0.57 ± 0.24	14.83 ± 2.92	15.39 ± 2.95	5 ± 0.72**	29 ± 3.74**	34 ± 4.05**	0 ± 0	15 ± 1.9	15 ± 1.9
	Foxp2-ir	0 ± 0	97.14 ± 7.21*	97.14 ± 7.21*	0 ± 0	76.58 ± 7.64	76.58 ± 7.64	2 ± 0.71	112.6 ± 10.56*	114.6 ± 10.77*	0.75 ± 2.25	95.5 ± 12.98	96.25 ± 13.17
	Δ c-Fos-ir	1.09 ± 0.37	12.48 ± 2.85	13.56 ± 3.2				5 ± 0.72†††	14 ± 1.85†	19 ± 2.18†††			
	Δ Foxp2-ir	0 ± 0	20.56 ± 5.74	20.56 ± 5.74				1.25 ± 0.55†	17.1 ± 6.26	18.35 ± 2.88			
COMPACT FORMATION	c-Fos-ir	0 ± 0	14.5 ± 2.72*	14.5 ± 2.72*	0 ± 0	9 ± 1.47	9 ± 1.47	0 ± 0	17 ± 1.96*	17 ± 1.96*	0 ± 0	7.75 ± 2.14	7.75 ± 2.14
	Foxp2-ir	0.25 ± 0.25	61.76 ± 9.36	62 ± 9.15	0 ± 0	43.5 ± 6.81	43.5 ± 6.81	0 ± 0	45.5 ± 12.32	45.5 ± 12.32	0 ± 0	30.25 ± 7.76	30.25 ± 7.76
	Δ c-Fos-ir	0 ± 0	5.5 ± 1.55	5.5 ± 1.55				0 ± 0	9.25 ± 2.29†	9.25 ± 2.29†			
	Δ Foxp2-ir	0.25 ± 0.25	18.25 ± 5.85	18.5 ± 5.61				0 ± 0	15.25 ± 6.56	15.25 ± 6.56			
nRA	c-Fos-ir	0 ± 0	26.58 ± 1.91**	26.58 ± 1.91**	0 ± 0	19.2 ± 1.24	19.2 ± 1.24	0.42 ± 0.19	40.1 ± 4.88*	40.52 ± 4.91**	0 ± 0	24.1 ± 3.28	24.1 ± 3.28
	Foxp2-ir	0.39 ± 0.22	95.45 ± 11.67*	95.84 ± 11.49*	0 ± 0	67.57 ± 7.86	67.57 ± 7.86	0.25 ± 0.25	96.5 ± 26.06*	96.75 ± 26.3*	0 ± 0	76 ± 29.73	76 ± 29.76
	Δ c-Fos-ir	0 ± 0	7.38 ± 1.2	7.38 ± 1.2				0.42 ± 0.19†	16 ± 3.62†††	16.42 ± 3.54†††			
	Δ Foxp2-ir	0.39 ± 0.22	27.88 ± 5.39	28.27 ± 5.17				0.25 ± 0.25	20.5 ± 5.19	20.75 ± 4.99			

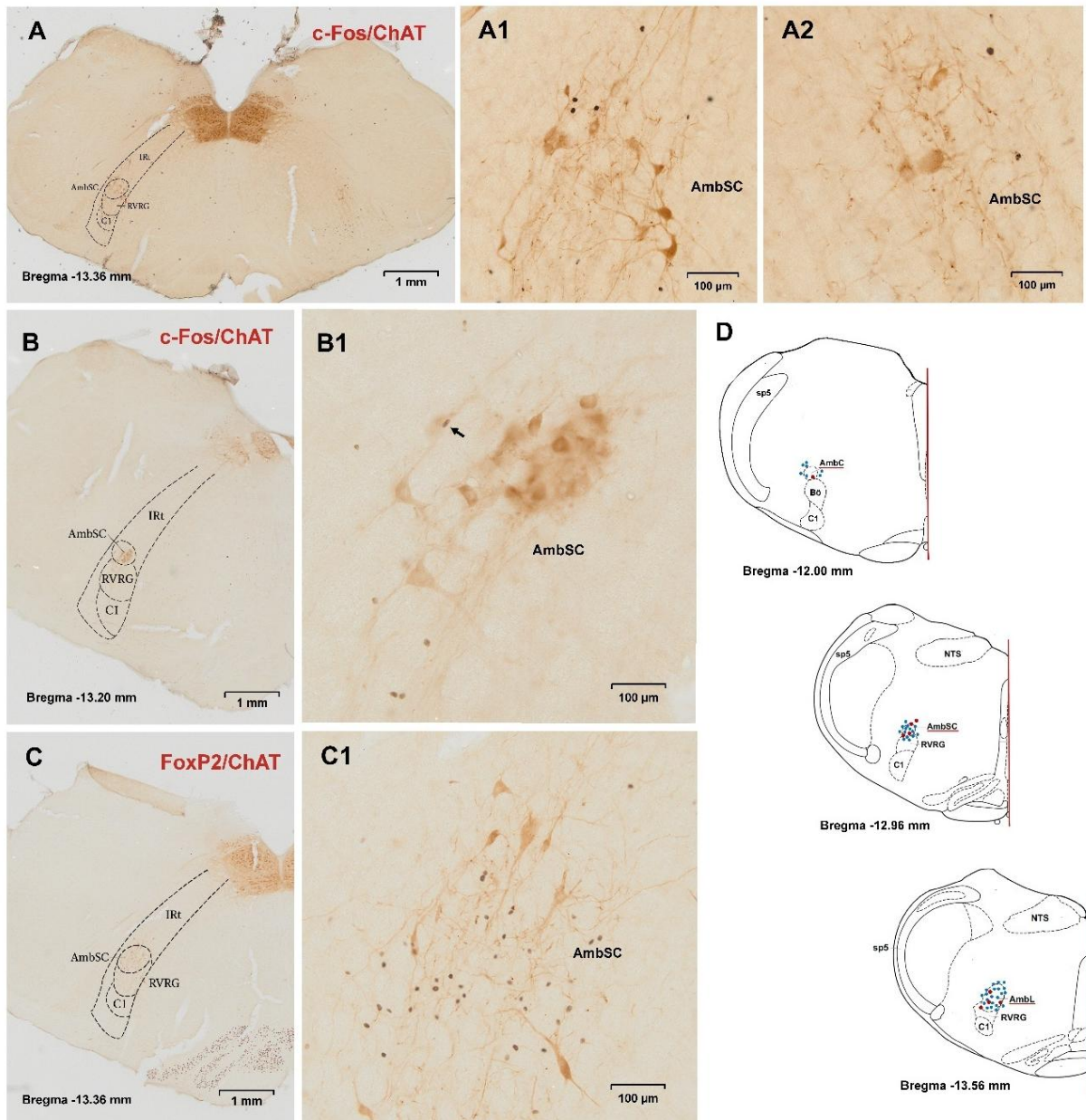
Note. Data are expressed as mean ± SEM (control: n=5; stimulated: n=5). Asterisks (*) indicate differences between ipsilateral and contralateral sides in control or stimulated animals (p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001). Daggers (†) indicate differences between Δ values of control and stimulated groups († p < 0.05; †† p < 0.01; ††† p < 0.001). Δ = mean ipsilateral – contralateral values (within each group). Moto = neurons co-localizing c-Fos/Foxp2 with ChAT; No-Moto = non-motoneuronal cells.

Figure 1. Box-and-whisker plots showing the significant delta change in the number of immunolabeled cells (total population) for c-Fos-ir or Foxp2-ir between ipsilateral and contralateral sides, comparing control animals and animals electrically stimulated in the DMH/PeF (STIM) across the three domains of the nA and nRA.



Note. Experimental conditions are indicated by color and fill type: ipsilateral rest (blue box, unfilled), contralateral rest (blue box, filled), ipsilateral stimulation (red box, unfilled), and contralateral stimulation (red box, filled) (control: $n=5$; stimulated: $n=5$). $p<0.05$; $p<0.01$; $p<0.001$, rest vs. stimulation.

Figure 2. Neuronal activation in the nucleus ambiguus following electrical stimulation of the DMH/PeF



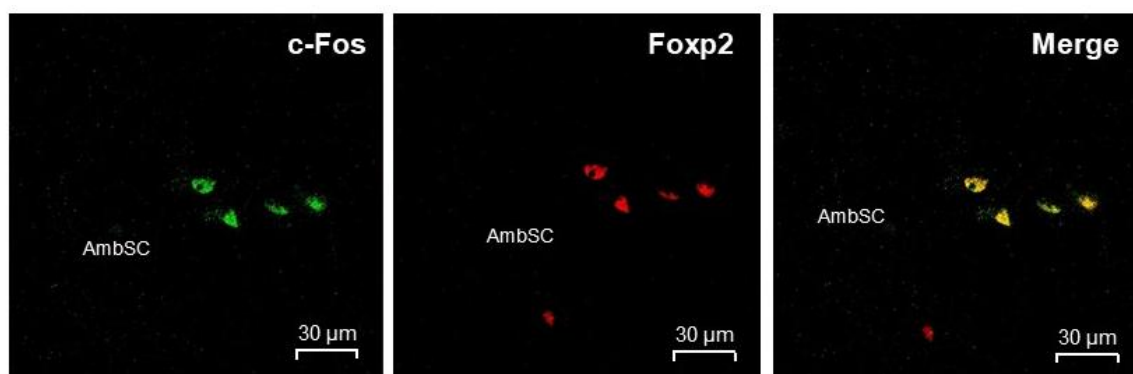
Note. (A–C) Coronal sections showing double labeling for c-Fos/ChAT (A, B) and Foxp2/ChAT (C) in the semcompact subdivision of the nucleus ambiguus. (A1–A2) Higher-magnification images of the AmbSC corresponding to the ipsilateral (A1) and contralateral (A2) sides relative to the stimulation site, illustrating the differential distribution of activated neurons (c-Fos+). (B1, C1) Additional high-magnification views of the AmbSC showing ChAT+, c-Fos+, and Foxp2+ neurons. (D) Schematic diagrams at different anteroposterior levels (Bregma –12.00, –12.56, and –13.56 mm) depicting the approximate distribution of labeled neurons within the AmbC, AmbSC and AmbL following DMH/PeF stimulation. Red dots indicate cFos-positive cells, while blue dots indicate Foxp2-positive cells.

Table 2. Co-expression of c-Fos/Foxp2 in total cells of the semicompact formation of the nA

Immunofluorescence Analysis (c-Fos/Foxp2 co-expression)				
SEMICOMPACT FORMATION	CONTROL (n=5)		ESTIMULATED (n=5)	
	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral
c-Fos ⁻ / Foxp2 ⁺	105.22 ± 8.34	88.23 ± 9.33	121.35 ± 9.26	107.18 ± 12.72
c-Fos ⁺ / Foxp2 ⁻	3.56 ± 1.30	1.65 ± 1.85	6.23* ± 2.56	2.32 ± 1.87
c-Fos ⁺ / Foxp2 ⁺	20.38 ± 3.11	15.18 ± 2.30	34.66* ± 4.89	19.54 ± 2.21
% c-Fos ⁺ / Foxp2 ⁺	19.36 %	17.21 %	28.57 %	18.23 %
Δ c-Fos ⁺ / Foxp2 ⁺	5.20		15.12^{††}	

Note. Quantification and distribution of total cells positive for c-Fos⁻/Foxp2⁺, c-Fos⁺/Foxp2⁻, and c-Fos⁺/Foxp2⁺ in the semicompact formation of the nA in both non-stimulated (control: n=5) animals and animals subjected to electrical stimulation of the DMH/PeF (stimulated:n=5) (mean ± SEM). Ipsilateral and contralateral sides were also analyzed. Co-expression values (c-Fos⁺/Foxp2⁺) are expressed as percentages. Δ values correspond to the difference between ipsilateral and contralateral values for c-Fos⁺/Foxp2⁺ co-expression. Asterisks (*) indicate differences between ipsilateral and contralateral sides in control or stimulated animals (p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001). Daggers (†) indicate differences between Δ values of control and stimulated groups (†p < 0.05; ††p < 0.01; †††p < 0.001).

Figure 3. Co-expression of c-Fos/Foxp2 in the semicompact formation of the nA



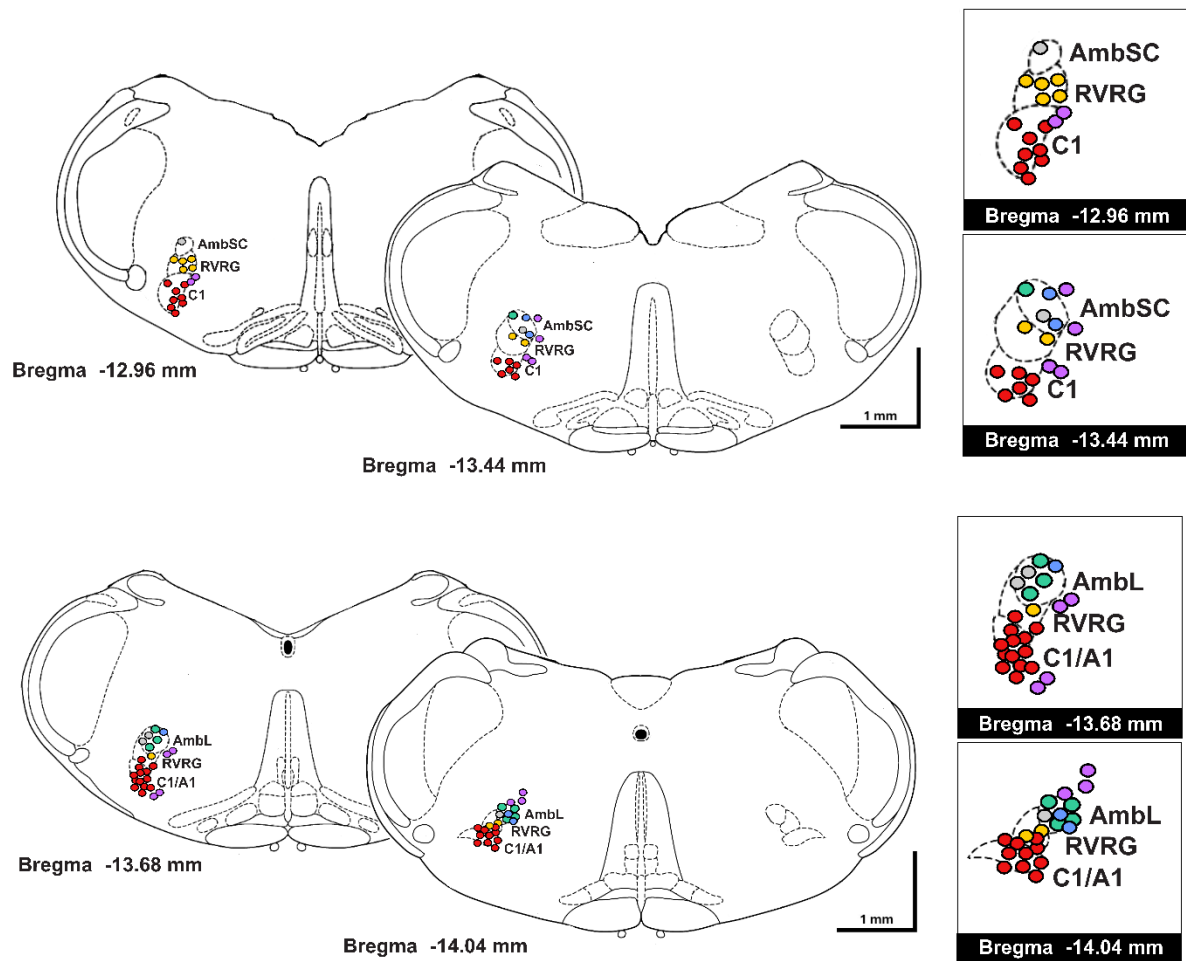
Note. Photomicrographs of the AmbSC (Bregma -13.36 mm) showing immunoreactivity for c-Fos (green) and Foxp2 (red), as well as their colocalization (merged, yellow) on the ipsilateral side of an animal subjected to electrical stimulation of the DMH/PeF. Abbreviations: AmbSC: semicompact formation of the nucleus ambiguus.

Table 3. Results from *in vivo* extracellular neuronal recordings of putative cells within the nA during DMH/PeF stimulation

Neuronal Recording Analysis							
	n	PROF (μm)	POSITION (mm)	FREQ. REST (Hz)	FREQ. DMH/PeF (Hz)	FREQ. VAGO (Hz)	ACT. MODIFIED (%)
INSP DECREASE	8	2154.88 \pm 92.83	0.5 \pm 0.095 ant 1.84 \pm 0.094 lat	2.95 \pm 2.66	2.81 \pm 2.58	4.86 \pm 2.14*	37.5
INSP INCREASE	10	2537.0 \pm 93.03	0.95 \pm 0.170 ant 1.78 \pm 0.079 lat	13.81 \pm 1.90	13.26 \pm 1.81	13.82 \pm 2.20	30
E1	5	2306.60 \pm 85.86	0.6 \pm 0.170 ant 1.65 \pm 0.061 lat	11.36 \pm 6.23	13.85 \pm 6.24	11.28 \pm 6.17	40
E2	5	2343.20 \pm 75.51	0.65 \pm 0.260 ant 1.70 \pm 0.145 lat	15.02 \pm 6.89	16.47 \pm 7.05*	13.21 \pm 7.33	40
CV	37	2913.03 \pm 97.64	0.88 \pm 0.060 ant 1.85 \pm 0.024 lat	16.45 \pm 2.81	18.63 \pm 3.01**	16.51 \pm 2.91	51.3
S/M	13	2950.91 \pm 97.64	0.65 \pm 0.092 ant 1.77 \pm 0.071 lat	14.02 \pm 6.75	14.44 \pm 6.70	14.82 \pm 6.88	23.1

Note. Recorded neurons were classified into six groups. Data are expressed as mean \pm SEM and as percentages (n=4).

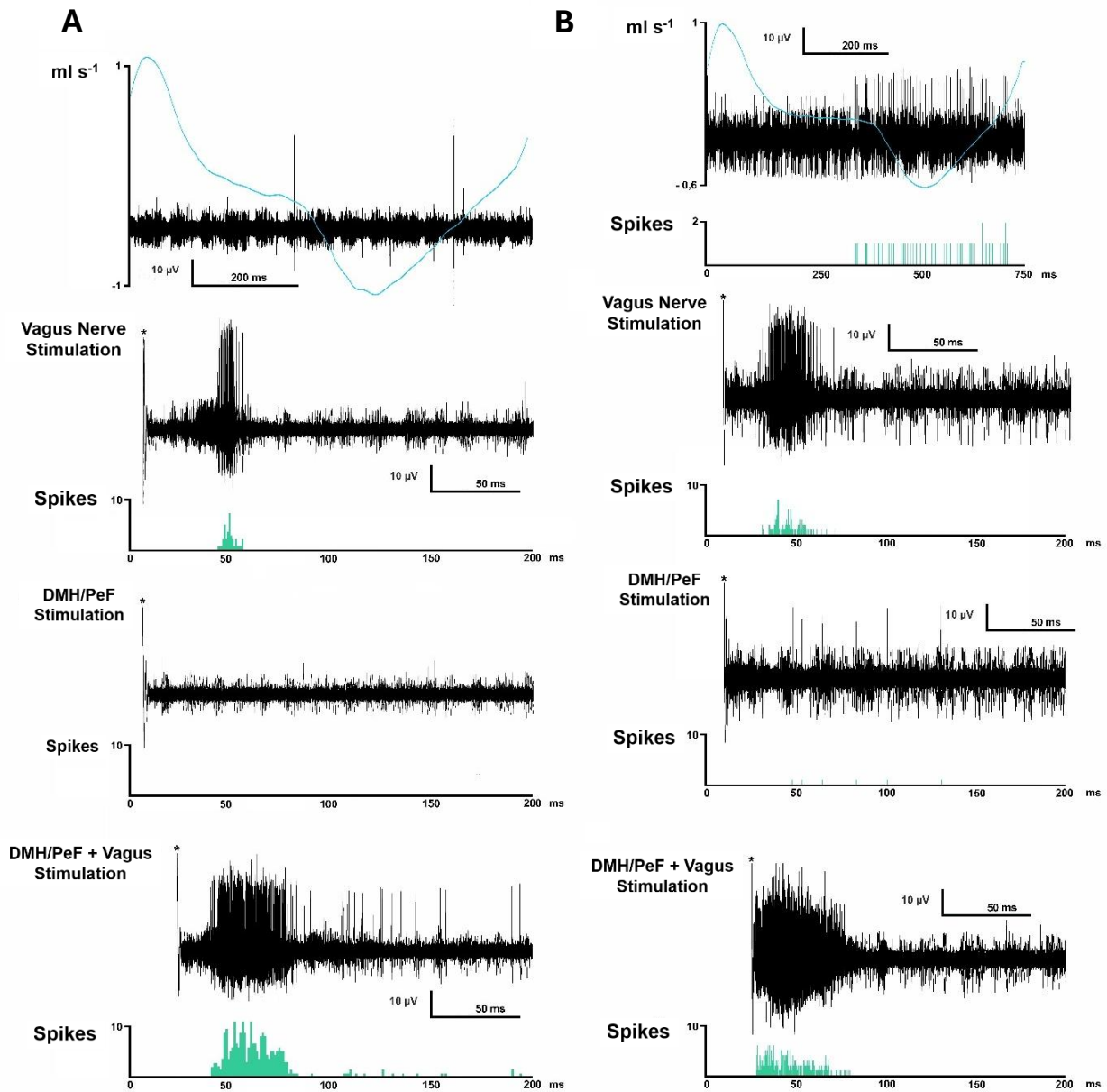
Figure 4. Distribution of neurons recorded in the nA and adjacent regions



- | | |
|--|--|
| ● Inspiratory neurons with decreasing pattern of discharge | ○ Expiratory E2 neurons |
| ● Inspiratory neurons with increasing pattern of discharge | ● Cardiovascular neurons |
| ● Expiratory E1 neurons | ● Neurons without cardiorespiratory modulation |

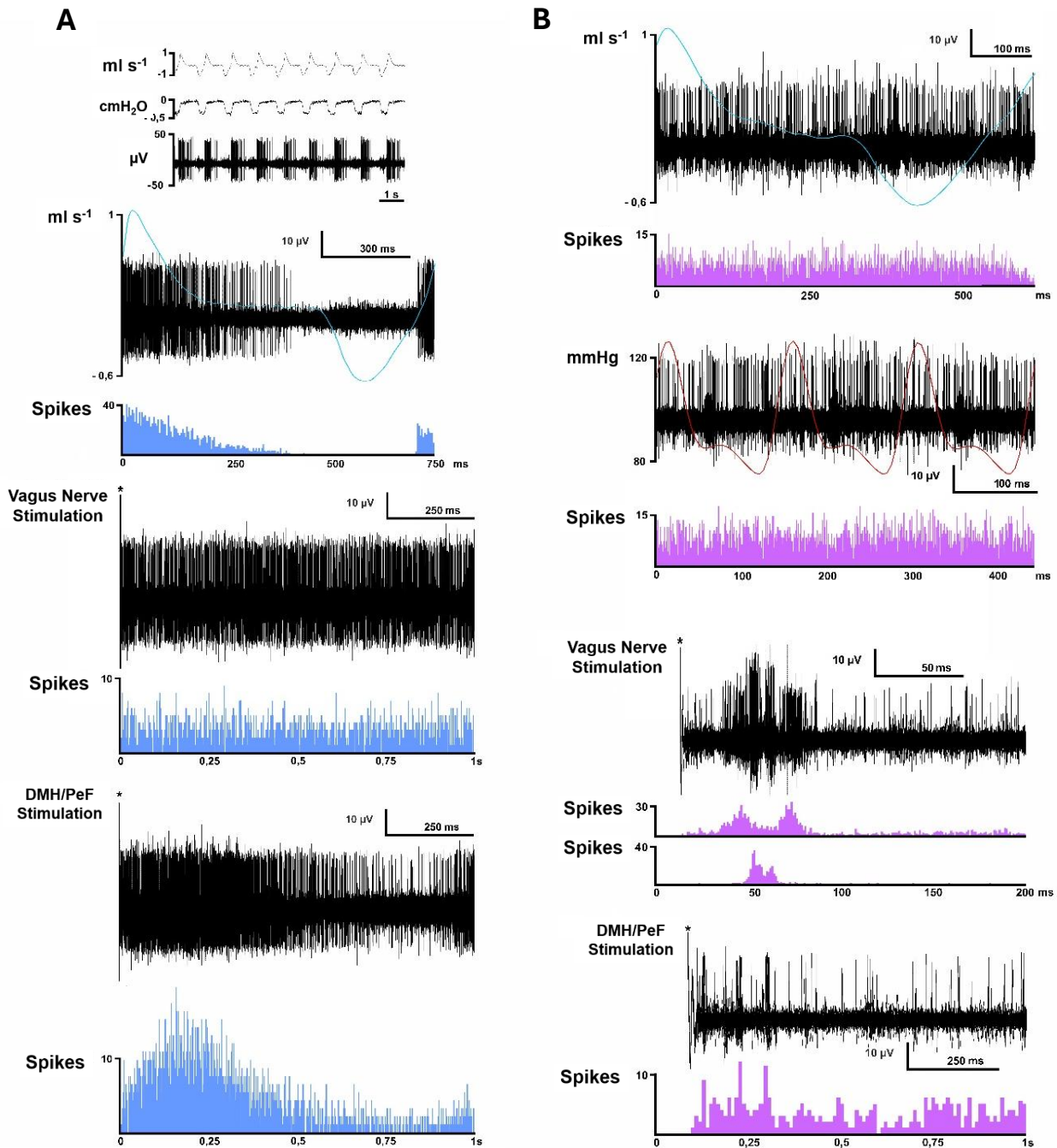
Note. Schematic diagrams of coronal rat brain sections showing the approximate position of the six established neuronal groups identified by extracellular single-unit recording (78 neurons in total). Neuronal positions within the semcompact (AmbSC) and loose (AmbL) formations of the nA are shown, as well as within the rostral ventral respiratory group (rVRG) and the adrenergic and catecholaminergic cell groups (C1/A1).

Figure 5. Extracellular recording of two decremting inspiratory laryngeal motoneurons



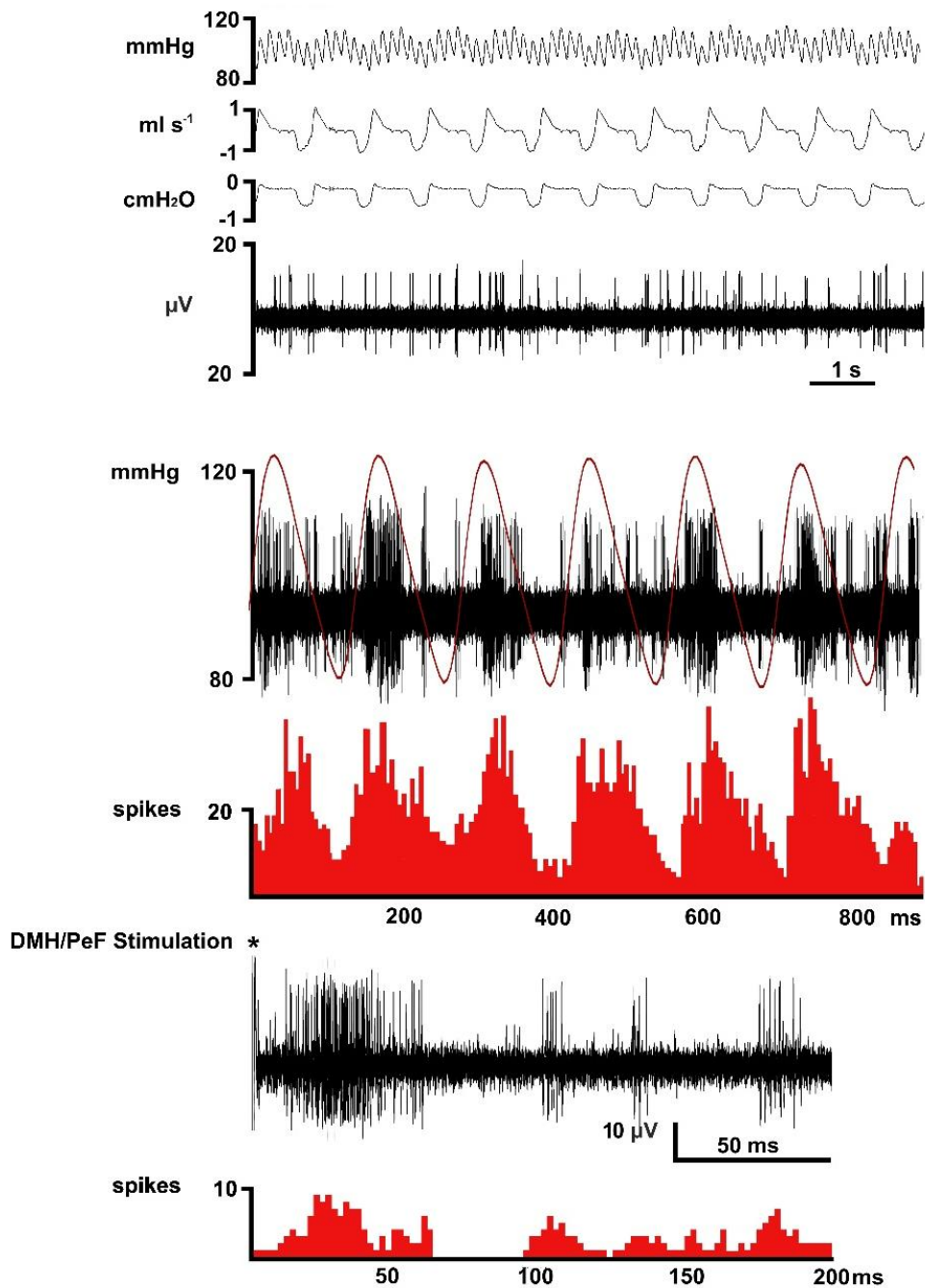
Note. From top to bottom, the following are shown: representative recordings of neuronal discharge superimposed on the mean respiratory flow signal (blue; A and B); peri-stimulus time histogram of neuronal discharge relative to respiratory flow at rest (only in B); superimpositions of 60 sweeps in response to vagus nerve stimulation, DMH/PeF stimulation, and combined DMH/PeF + vagus nerve stimulation. Below each stimulation condition, the corresponding peri-stimulus time histograms are shown.

Figure 6. Extracellular recording of an E1 expiratory neuron and a non-cardiorespiratory-modulated neuron



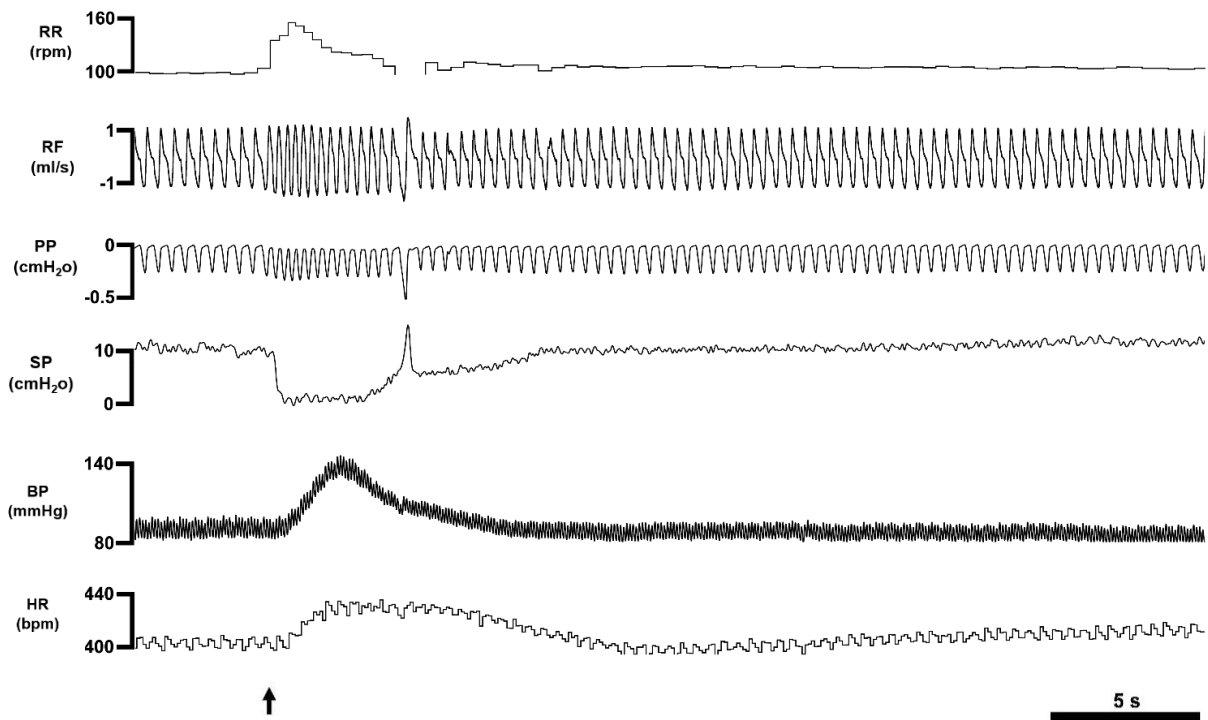
Note. From top to bottom, the following are shown: a representative 10-s sweep of respiratory flow, pleural pressure, and neuronal discharge recordings (only in A); superimposition of 60 sweeps of neuronal discharge superimposed on the mean respiratory flow signal (blue) and arterial pressure (red) (B), together with the peri-stimulus time histogram (PSTH) of neuronal discharge at rest; and superimposition of 60 sweeps (A) and 40 sweeps (B) in response to vagus nerve and DMH/PeF stimulation, respectively, along with the corresponding peri-stimulus time histograms (60 and 240 sweeps).

Figure 7. Extracellular recording of a cardiovascular-modulated neuron



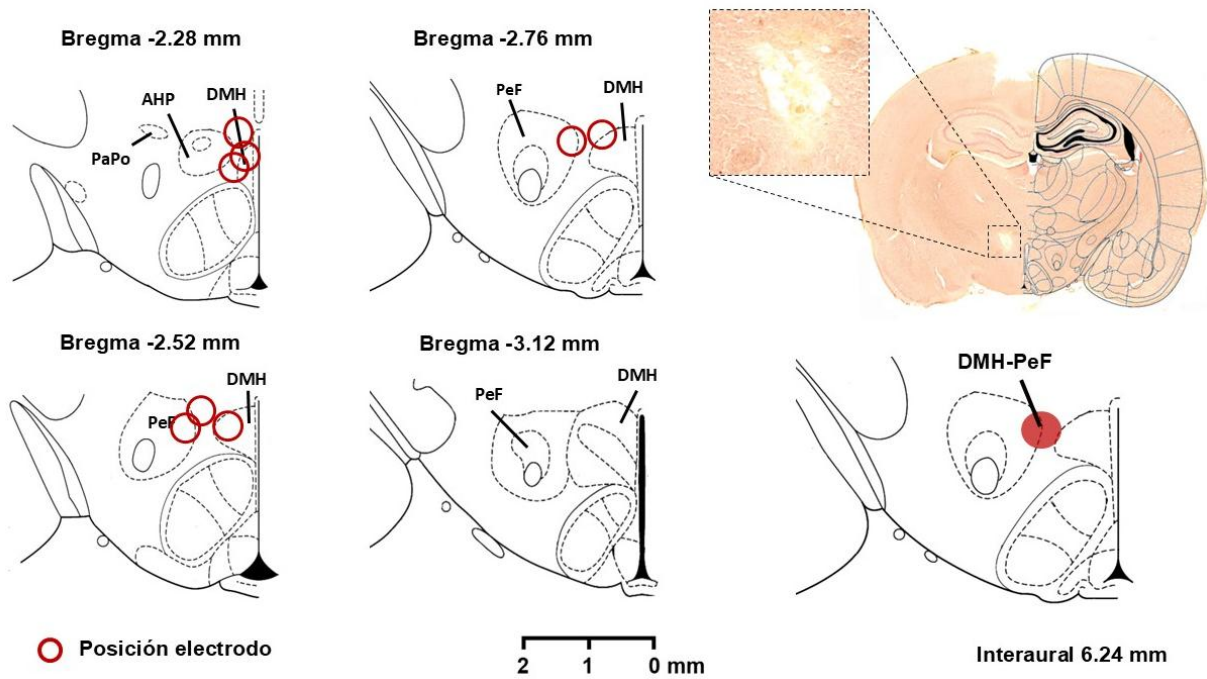
Note. From top to bottom, the following are shown: a representative 10-s sweep of arterial pressure, respiratory flow, pleural pressure, and neuronal discharge recordings; superimposition of 10 sweeps of neuronal discharge superimposed on the mean arterial pressure signal (red), together with the peri-stimulus time histogram (PSTH) of neuronal discharge during a 120-s baseline period (rest); and superimposition of 20 sweeps in response to DMH/PeF stimulation, along with the corresponding peri-stimulus time histogram (240 sweeps).

Figure 8. Electrical stimulation of DMH/PeF



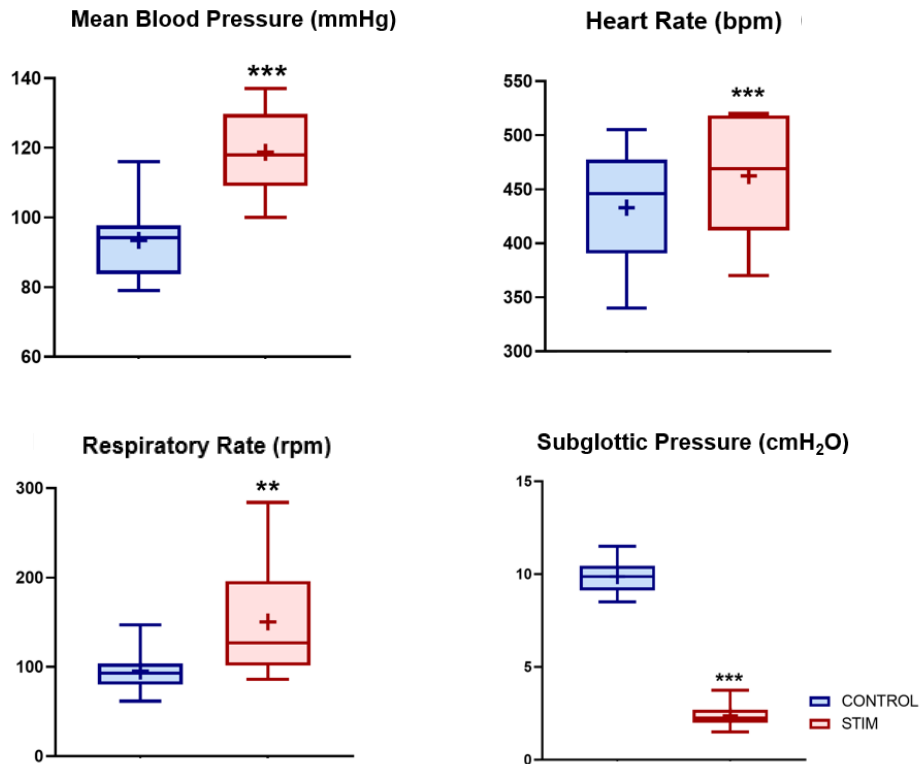
Note. Effects of electrical stimulation of the DMH/PeF on cardiorespiratory and laryngeal activity in a rat with spontaneous breathing before, during, and after stimulation (30 s). From top to bottom, traces represent instantaneous respiratory frequency (RR), respiratory airflow (RF), pleural pressure (PP), subglottic pressure (SP), arterial blood pressure (BP), and instantaneous heart rate (HR).

Figure 9. Mapping of anatomical sites of electrical stimulation in the DMH/PeF



Note. Schematic diagrams of coronal sections of the DMH/PeF showing the distribution of electrically stimulated anatomical sites along the entire rostrocaudal axis of the DMH/PeF. Abbreviations: AHP, anterior hypothalamic area, posterior part; DMH, dorsomedial hypothalamic nucleus; PaPo, paraventricular hypothalamic nucleus, posterior part; PeF, perifornical hypothalamic area.

Figure 10. Box-and-whisker plots showing cardiorespiratory and laryngeal variables during electrical stimulation of DMH/PeF



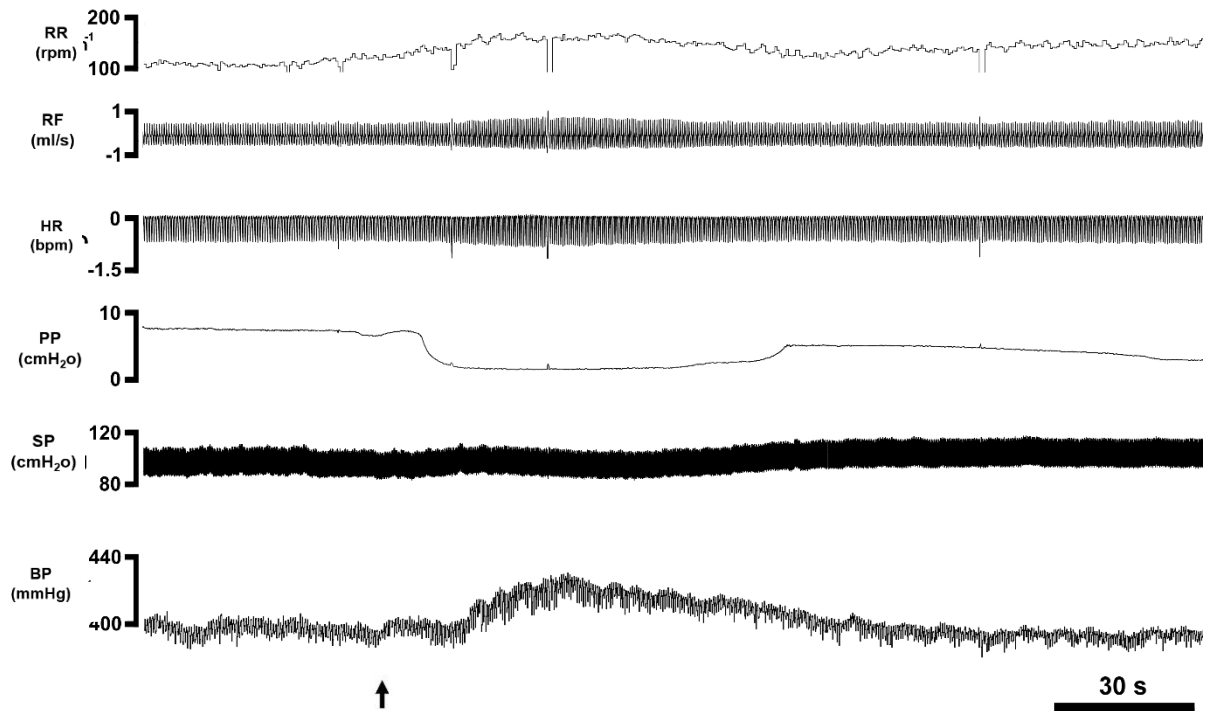
Note. Experimental conditions are indicated by color: rest (blue box) and electrical stimulation (red box). $p < 0.05$; $p < 0.01$; $p < 0.001$, rest vs. stimulation. Each box represents measurements obtained from the same animals ($n=8$).

Table 4. Cardiorespiratory changes induced by electrical stimulation in the DMH/PeF

Electrical stimulation of DMH/PeF			
DMH/PeF (n=8)	Rest	Stimulation	Recovery
TI (s)	0.256 ± 0.016	0.205 ± 0.024**	0.251 ± 0.015
TE (s)	0.409 ± 0.044	0.256 ± 0.040***	0.403 ± 0.042
RR (rpm)	95 ± 9	150 ± 24**	97 ± 9
PP (cmH ₂ O)	0.617 ± 0.115	1.363 ± 0.172**	0.623 ± 0.132
SGP (cmH ₂ O)	9.8 ± 0.3	2.3 ± 0.2***	9.7 ± 0.3
BP (mmHg)	93 ± 4	119 ± 4***	96 ± 4
HR (bpm)	433 ± 19	462 ± 20***	432 ± 18

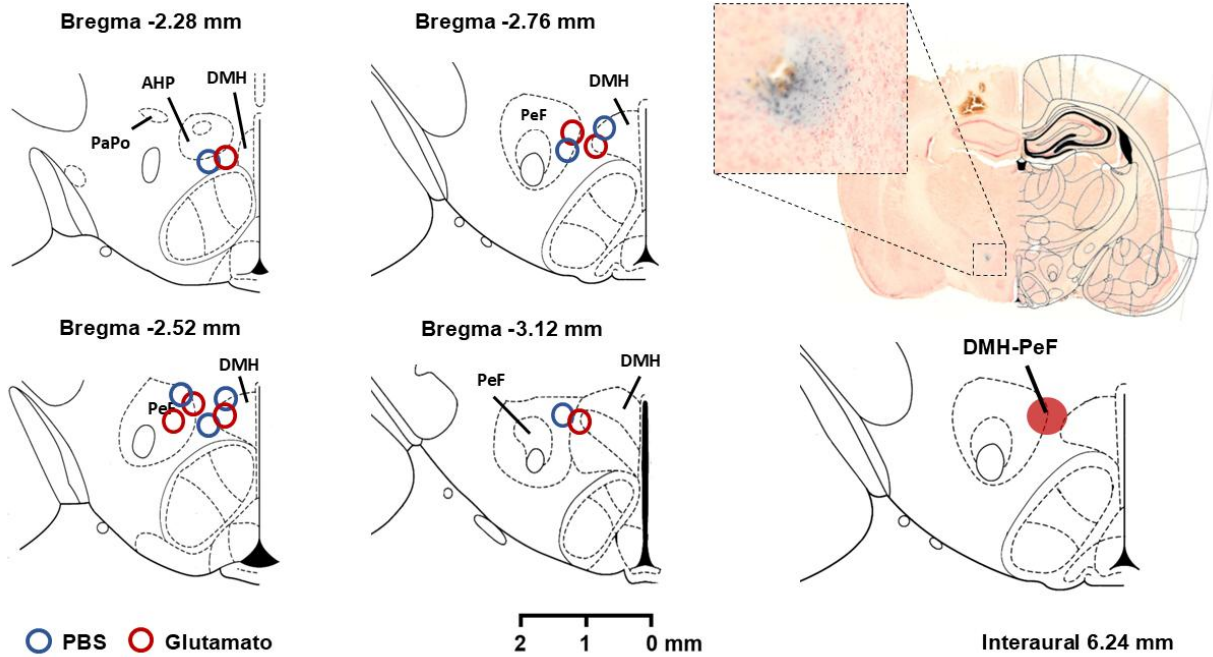
Note. Laryngeal and cardiorespiratory parameters measured before (rest), during (stimulation), and 4 minutes after electrical stimulation in the DMH/PeF (recovery). Data are expressed as mean ± SEM (n=8). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, comparing stimulation versus rest. Abbreviations: inspiratory time (TI), expiratory time (TE), instantaneous respiratory frequency (RR), pleural pressure (PP), subglottic pressure (SGP), blood pressure (BP), and instantaneous heart rate (HR).

Figure 11. Chemical stimulation of DMH/PeF



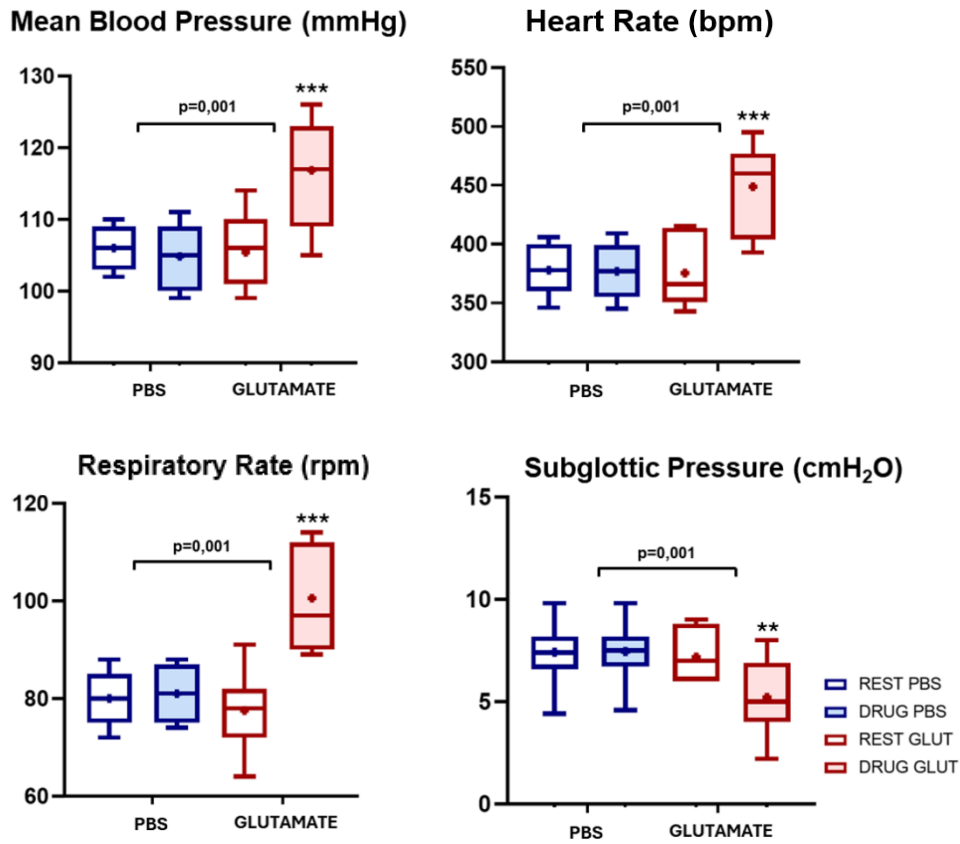
Note. Effects of glutamate microinjection into the DMH/PeF on cardiorespiratory and laryngeal activity in a rat with spontaneous breathing before, during, and 4 minutes after the microinjection. The arrows indicate the onset of glutamate microinjection (5 s). From top to bottom, traces represent instantaneous respiratory frequency (RR), respiratory airflow (RF), pleural pressure (PP), subglottic pressure (SP), arterial blood pressure (BP), and instantaneous heart rate (HR).

Figure 12. Mapping of anatomical sites of chemical stimulation in the DMH/PeF



Note. Schematic coronal sections of the DMH/PeF illustrating the distribution of stimulation sites following PBS (blue circles) and glutamate (red circles) microinjections along the rostrocaudal axis. Abbreviations: AHP, posterior anterior hypothalamic area; DMH, dorsomedial hypothalamic nucleus; PaPo, posterior paraventricular hypothalamic nucleus; PeF, perifornical hypothalamic area.

Figure 13. Box-Whisker graphs showing the cardiorespiratory and laryngeal variables between rest and during stimulation with either PBS-Evans blue or glutamate microinjections within DMH/PeF.



Note. Experimental conditions are indicated by color and fill type: rest with PBS (blue box, unfilled), stimulation with PBS (blue box, filled), rest with glutamate (red box, unfilled), and stimulation with glutamate (red box, filled) (n=14). **p<0,01; ***p<0.001 stimulation (drug) vs. rest. Horizontal bars above the boxplots indicate statistically significant differences between control and stimulated groups.

Table 5. Cardiorespiratory changes induced by PBS microinjection into the DMH/PeF

Microinjections of PBS within the DMH/PeF			
DMH/PeF (n=7)	Rest	Microinjection	Recovery
TI (s)	0.300 ± 0.008	0.290 ± 0.008	0.290 ± 0.008
TE (s)	0.450 ± 0.008	0.450 ± 0.008	0.450 ± 0.008
RR (rpm)	80 ± 2.16	81 ± 2.01	81 ± 2.09
PP (cmH₂O)	1.126 ± 0.019	1.136 ± 0.018	1.134 ± 0.018
SGP (cmH₂O)	7.41 ± 0.6	7.45 ± 0.6	7.45 ± 0.7
BP (mmHg)	106 ± 1.1	104.8 ± 1.7	105.7 ± 1.6
HR (bpm)	378 ± 8.5	377 ± 8.9	377 ± 8.8

Note. Laryngeal and cardiorespiratory parameters measured before (rest), during (PBS microinjection), and 30 minutes after chemical stimulation in the DMH/PeF (recovery). Data are expressed as mean ± SEM (n=7). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, comparing stimulation versus rest. Abbreviations: inspiratory time (TI), expiratory time (TE), instantaneous respiratory frequency (RR), pleural pressure (PP), subglottic pressure (SGP), blood pressure (BP), and instantaneous heart rate (HR).

Table 6. Cardiorespiratory changes induced by glutamate microinjection into the DMH/PeF

Microinjections of glutamate within the DMH/PeF			
DMH/PeF (n=7)	Rest	Microinjection	Recovery
TI (s)	0.219 ± 0.01	0.235 ± 0.008 ^{***}	0.220 ± 0.03
TE (s)	0.485 ± 0.02	0.364 ± 0.01 ^{***}	0.480 ± 0.02
RR (rpm)	77.43 ± 3.19	100.28 ± 4 ^{***}	79.3 ± 3.2
PP (cmH₂O)	1.15 ± 0.09	1.27 ± 0.09	1.14 ± 0.09
SGP (cmH₂O)	7.18 ± 0.47	5.2 ± 0.73 ^{**}	7.19 ± 0.44
BP (mmHg)	105.4 ± 2	116.8 ± 2.8 ^{***}	107.3 ± 2
HR (bpm)	375.4 ± 10.8	448.8 ± 14.62 ^{**}	377.2 ± 9.8

Note. Laryngeal and cardiorespiratory parameters measured before (rest), during (glutamate microinjection), and 30 minutes after chemical stimulation in the DMH/PeF (recovery). Data are expressed as mean ± SEM (n=7). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, comparing stimulation versus rest. Abbreviations: inspiratory time (TI), expiratory time (TE), instantaneous respiratory frequency (RR), pleural pressure (PP), subglottic pressure (SGP), blood pressure (BP), and instantaneous heart rate (HR).

2.5. Discussion

Using a multidisciplinary approach combining physiology and immunohistochemistry, the present work demonstrates that activation of the DMH/PeF modulates laryngeal motor control in parallel with cardiorespiratory adjustments characteristic of defensive responses. Firstly, we demonstrated that, at the neural level, electrical stimulation of DMH/PeF induces a significant increase in c-Fos expression in defined subdivisions of the nA and in the nRA, with a marked ipsilateral predominance. Foxp2 expression, by contrast, was not altered by the stimulation, indicating that DMH/PeF activation preferentially modulates neuronal activity rather than neuronal phenotype. Secondly, a high number (41%) of extracellularly recorded neurones within the nA and vicinity regions modified their activity on electrical stimulation of the DMH/PeF. Finally, using the "isolated glottis in situ" technique together with classical electrophysiological techniques, we demonstrated that stimulation of the DMH/PeF reliably evoked an increase in respiratory rate, tachycardia and arterial pressure, together with a reduction in subglottic pressure consistent with enhanced glottal opening. Taken together, these results support a functional role for the DMH/PeF in coordinating respiratory–laryngeal output during defensive states.

2.5.1. Interaction of DMH/PeF and nA: c-Fos/Foxp2/ChAT-ir experiments

Distribution of c-Fos/ChAT and Foxp2/ChAT expression

Consistent with the established somatotopic organization of the nA, in which the compact, semicompact, and loose formations contain distinct neuronal pools innervating the oesophagus, cricothyroid, and intrinsic laryngeal muscles respectively [43-45], electrical activation of the DMH/PeF induced a clear and topographically organized increase in c-Fos expression along the rostrocaudal extent of this nucleus. This activation was not uniform across subdivisions. The most prominent effects were observed in the semicompact formation, which exhibited a marked ipsilateral increase in c-Fos expression across motoneurons, non-motoneurons, and the total neuronal population. In the compact formation, activation was restricted to non-motoneuronal and total cell populations, whereas the loose formation showed only a modest ipsilateral increase limited to motoneurons. Notably, these effects persisted under sympathetic blockade with guanethidine, indicating that DMH/PeF-driven recruitment of nA subdivisions occurs independently of systemic blood pressure changes.

In parallel, robust c-Fos activation was also detected in the nRA, a key premotor component of the caudal ventral respiratory group that provides expiratory drive to abdominal, intercostal, and laryngeal motoneurons [31, 37-40]. Recruitment of this nucleus is consistent with the tachypnoeic pattern observed during DMH/PeF stimulation and supports the view that hypothalamic activation engages both laryngeal control and expiratory premotor pathways. Together, the coordinated activation of the nA and nRA suggests that the

DMH/PeF orchestrates laryngeal activity in parallel with enhanced expiratory drive during defensive-like states.

This organization fits within contemporary models of the central autonomic and respiratory networks, in which hypothalamic nodes integrate behavioural, respiratory, and cardiovascular components of defence [62]. In these distributed frameworks, hypothalamic outputs interact with pontine centres such as the PBc/KF and with medullary rhythm- and pattern-generating nuclei to adjust respiratory timing and premotor output [31]. Within this organization, the nRA emerges as a critical premotor hub linking respiratory drive with laryngeal and abdominal activity, providing a plausible substrate for the simultaneous modulation of ventilation and upper-airway patency during hypothalamic activation [63].

A key methodological advance of the present study compared with our previous work on the dIPAG [48] lies in the combined use of c-Fos and ChAT immunohistochemistry. Whereas earlier analyses using c-Fos/TH did not allow discrimination between motoneurons and non-motoneurons within the nA, the present approach enabled unequivocal identification of cholinergic laryngeal motoneurons. This revealed that DMH/PeF-induced activation predominantly involved non-motor neuronal populations within the classical subdivisions of the nA. These non-motor cells, which include local interneurons and premotor elements, have been anatomically described but remain poorly characterized functionally [44, 45, 47]. Our findings suggest that the DMH/PeF modulates laryngeal output primarily through local circuit elements rather than by directly driving motoneuronal discharge. Notably, a comparable functional outcome was observed in our previous dIPAG study, where stimulation also reduced laryngeal resistance and increased c-Fos expression within the nA, particularly in the compact and loose subdivisions, supporting the idea that both hypothalamic and mesencephalic structures converge onto common brainstem laryngeal pathways [48].

Foxp2 expression provided complementary information on the molecular identity of the neuronal populations within the nA and nRA. In line with previous observations, FoxP2-positive neurons were most abundant in the semicompact and loose formations and less frequent in the compact formation, with a consistent ipsilateral predominance observed in both control and stimulated animals [48]. In the nRA, Foxp2-positive profiles were clearly present in numbers comparable to those observed in the semicompact formation and only moderately lower than those in the loose formation, a distribution consistent with the mixed cellular composition of this premotor nucleus and its involvement in shaping laryngeal and expiratory motor patterns. DMH/PeF stimulation did not modify Foxp2 expression in any subdivision, reinforcing the interpretation of Foxp2 as a stable phenotypic marker rather than an acute activity-dependent indicator.

Thus, these findings demonstrate that DMH/PeF activation selectively recruits specific neuronal populations within the nA and nRA, shaping laryngeal–respiratory motor

patterns that support the tachypnoeic component of the defence response. Taken together, our findings show that DMH/PeF activation selectively engages the semicompact formation of the nA, along with premotor elements of the nRA, forming a coordinated pattern that supports both glottal activity and the enhanced expiratory drive characteristic of rapid defensive breathing.

Distribution of c-Fos/Foxp2 co-expression

Foxp2 expression remained stable in both control and stimulated animals on the ipsilateral and contralateral sides, whereas c-Fos expression was significantly increased in the ipsilateral side of stimulated animals. Group comparisons showed that the ipsilateral–contralateral difference in c-Fos expression was significantly greater in stimulated animals. Specifically, c-Fos/Foxp2 co-expression remained unchanged in control animals (19.36% ipsilateral and 17.21% contralateral), while in stimulated animals it increased significantly in the ipsilateral side (28.57%) compared with the contralateral side (18.23%). Analysis of between-group differences (control vs stimulated) in the ipsilateral–contralateral comparison also revealed significant differences, confirming that DMH/PeF stimulation enhances c-Fos expression in Foxp2-expressing neurons of the semicompact formation of the nA.

Although the results should be interpreted with caution because ChAT was not used as a cytoplasmic marker to identify nA motoneurons, due to technical limitations that prevented triple labeling of c-Fos, Foxp2, and ChAT. Nevertheless, the validity of this approach is supported by complementary immunohistochemical analyses that identified cholinergic populations within the nA. Furthermore, as observed in this and previous studies [48, 51], Foxp2 expression in the nA appears to be activity-independent and serves as a reliable anatomical guide to delineate the region and quantify c-Fos–positive cells. Thus, immunofluorescence results suggest that DMH/PeF stimulation exerts a direct or indirect effect on Foxp2-positive neuronal populations in the semicompact formation of the nA.

Although the somatotopic organisation of the nA has generally been established, with the neurons that innervate the laryngeal intrinsic muscles located in the semicompact (cricothyroid muscle control) and lax (remaining intrinsic musculature) formations, the boundaries between these are not clearly defined [43]. Some authors believe that laryngeal neurons are diffusely organised and intermingled within the nA [64-71], whereas others argue that the neuronal groups controlling these muscles are more clearly organised. According to the latter group of authors, the cricothyroid neurons are located more rostrally and those that control the posterior cricoarytenoid and thyroarytenoid muscles are distributed progressively towards more caudal regions. The posterior cricoarytenoid muscle occupies an intermediate position within this organisation. However, even within this somatotopic organisation, areas of overlap between adjacent neuronal populations have been identified [72]. This overlap is further supported by evidence of dual innervation of certain laryngeal muscles, particularly

the posterior cricoarytenoid, suggesting a more diffuse organization across nA subdivisions [43, 73-79].

In the event of these overlaps being confirmed, the co-expression of c-Fos+/Foxp2+ cells in the semicompact formation suggests the potential for the DMH/PeF to modulate the activity of Foxp2-dependent laryngo-respiratory circuits that control glottal opening. Consequently, the DMH/PeF would adjust breathing and glottal resistance according to emotional state and autonomic demands. Although this interpretation is consistent with the decrease in subglottic pressure observed in our electrical and chemical stimulation experiments, other alternative explanations should not be ruled out.

2.5.2. Interaction of DMH/PeF and nA: neural recording

After confirming a potential relationship between the DMH/PeF and the nA (semicompact and loose formations) based on c-Fos expression, the electrophysiological relationship between both regions was investigated. Extracellular single-unit recordings were obtained from motoneurons located within these nA formations. Recordings extended from -12.90 to -14.20 mm posterior to bregma along the rostrocaudal axis, with mediolateral coordinates of 1.5–2.5 mm from the midline and depths of 1.8–2.6 mm from the brain surface. Coordinates were based on the Paxinos and Watson atlas [61], with experiment-specific adjustments using the obex as the zero reference point. Recordings were also obtained from adjacent cardiorespiratory regions, including the rVRG, the A1/C1 and the CVLM.

Registered neurons were classified according to spontaneous discharge, recording depth, discharge pattern (cardiovascular or respiratory), and anatomical location. The location of recorded neurons was confirmed by histological analysis, which revealed microlesions in the tissue produced by high-intensity electrical current applied at the end of each experiment (250 μ A for 20 s). The remaining recording sites were estimated relative to this stereotaxic reference point.

Extracellular activity from a total of 78 neurons was recorded, one neuron was excluded after histological analysis revealed that the recording depth was not appropriate. The remaining 77 neurons, except two silent neurons, showed typical spontaneous activity for this medullary region, with discharge frequencies consistent with previous reports [80-82].

Of the total recorded neurons, 41% modified their activity following DMH/PeF stimulation, and 36% exhibited a respiratory discharge pattern. Within this group, four distinct discharge patterns were identified: laryngeal inspiratory neurons (10.26% of the total, exhibiting a decreasing discharge pattern), inspiratory neurons of the rVRG (12.82%, exhibiting an increasing discharge pattern), and laryngeal expiratory E1 and E2 neurons (6.41% and 6.41%, respectively). The group showing the greatest activity changes after DMH/PeF stimulation was the expiratory motoneurons (40% in each type), followed by

laryngeal inspiratory motoneurons (37.5%) and inspiratory motoneurons located in rVRG (30%). The results were consistent with immunohistochemical data.

Although no major changes were observed beyond the increases and decreases in discharge frequency described, one expiratory motoneuron located in the semicompact formation showed a 200 ms excitatory response. Furthermore, three laryngeal inspiratory motoneurons (37.5%) exhibited facilitated activity during combined DMH/PeF and vagal stimulation. The results suggest that DMH/PeF modulates inspiratory activity during stress responses mediated by this hypothalamic region, in agreement with previous findings reported by our research group in cats [81].

In regions adjacent to the nA, inspiratory neurons of the rVRG (12.82%), cardiovascular neurons of the A1/C1–CVLM region (47.44%), and neurons without clear cardiorespiratory modulation (16.7%) were recorded. DMH/PeF activity modified discharge in 51.3% of cardiovascular neurons and 23.1% of non–cardiorespiratory-modulated neurons. The diverse cardiovascular responses to DMH/PeF and vagal stimulation reflect the opposing functions of the A1/C1 and CVLM regions. The presence of both excitatory and inhibitory responses, including short-latency activations, suggests functional, likely polysynaptic, connections between the DMH/PeF and medullary cardiovascular circuits.

Neurons without cardiorespiratory modulation exhibited only minor discharge changes (23% decreases; 13% increases). However, their anatomical position intermingled rVRG, CVL and nA and their responses to vagal and DMH/PeF inputs suggest that they function as interneurons integrating afferent vagal and descending hypothalamic signals.

Taken together, these data provide the first electrophysiological evidence of a functional interaction between DMH/PeF neurons and neurons located in the different regions of the nA.

2.5.3. Interaction of DMH/PeF and nA: electrical/chemical stimulation experiments and subglottic pressure

Electrical stimulation was initially employed to localize the DMH/PeF and to assess its influence on subglottic pressure as an index of laryngeal patency. To confirm that the observed effects arose from intrinsic hypothalamic neurons rather than fibres of passage, complementary experiments using glutamate microinjections were conducted in a separate group of animals. Both stimulation types produced highly comparable physiological responses, including tachypnoea, tachycardia, arterial hypertension, and a pronounced reduction in subglottic pressure, indicating decreased laryngeal resistance. With arterial pressure as the only notable exception, the magnitude and profile of the responses were remarkably similar across stimulation modalities, supporting the conclusion that these effects originate from neuronal populations within the DMH/PeF. This sympathoexcitatory pattern is

consistent with neurogenic mechanisms underlying stress-related cardiovascular activation described in recent models of the defence response [83].

These findings are in line with extensive evidence identifying the DMH/PeF as a central hypothalamic node coordinating autonomic and respiratory components of defensive behaviour. Previous work from our group has demonstrated that activation of this region engages pontine structures such as the PBc, the KF, and the A5 region, with glutamatergic transmission within these nuclei critically shaping the cardiovascular and respiratory outcomes of DMH/PeF stimulation [15-18]. The present study extends this framework by showing that DMH/PeF activation also induces a robust reduction in subglottic pressure, consistent with enhanced glottal opening. This interpretation is further supported by the concomitant recruitment of the nA and the nRA, both of which form part of medullary circuits controlling laryngeal and expiratory motor activity. Together, these observations fit well with current models of hypothalamo-medullary organisation, in which the DMH conveys coordinated defensive commands to downstream autonomic and respiratory centres [7].

The decrease in subglottic pressure observed following DMH/PeF activation can therefore be understood as an integral component of the hypothalamic defence pattern. During tachypnoea, descending pathways from the DMH/PeF to pontine and medullary respiratory nuclei (including the PBc/KF, A5, nRA, and nA) likely suppress laryngeal adductor activity typically associated with vocalisation, favouring instead increased glottal opening to facilitate ventilation. This mechanism parallels findings from our recent study of the dIPAG, in which mesencephalic stimulation similarly reduced subglottic pressure [48]. Together, these results suggest that hypothalamic and mesencephalic defensive circuits converge on shared laryngeal premotor substrates to regulate airway patency according to the physiological demands of defensive states.

In summary, both electrical and chemical activation of the DMH/PeF reveal a coherent pattern of laryngeal and respiratory modulation characterised by reduced subglottic pressure and enhanced respiratory drive. Taken together, these findings position the DMH/PeF as a key hypothalamic structure capable of influencing laryngeal motoneuronal and interneuronal populations within the nA, as well as expiratory premotor elements in the nRA, thereby contributing to the rapid ventilatory adjustments characteristic of defence-related activation. However, more research is needed to better understand these neural circuits and the specific functions of neurons in the nA. Future studies could use techniques such as laryngeal electromyography, neural tracing, and optogenetics in awake animals to clarify how this circuit works. These findings also open new research directions, as the DMH/PeF may be involved in stress-related voice disorders; its dysfunction could affect both breathing and laryngeal movement, potentially leading to psychogenic or stress-induced dysphonia and suggesting possible therapeutic targets.

2.6. References

1. Fontes MA, Tagawa T, Polson JW, Cavanagh SJ, Dampney RA. Descending pathways mediating cardiovascular response from dorsomedial hypothalamic nucleus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 280(6):H2891-H2901. doi:10.1152/ajpheart.2001.280.6.H2891
2. DiMicco JA, Samuels BC, Zaretskaia MV, Zaretsky DV. The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002; 71(3):469-480. doi:10.1016/s0091-3057(01)00689-x
3. Samuels BC, Zaretsky DV, DiMicco JA. Tachycardia evoked by disinhibition of the dorsomedial hypothalamus in rats is mediated through medullary raphe. *J Physiol.* 2002; 538(Pt 3):941-946. doi:10.1113/jphysiol.2001.013302
4. Horiuchi J, McAllen RM, Allen AM, Killinger S, Fontes MA, Dampney RA. Descending vasomotor pathways from the dorsomedial hypothalamic nucleus: role of medullary raphe and RVLM. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004; 287(4): R824-R832. doi:10.1152/ajpregu.00221.2004
5. Kabir MM, Beig MI, Baumert M, et al. Respiratory pattern in awake rats: effects of motor activity and of alerting stimuli. *Physiol Behav.* 2010;101(1):22-31. doi:10.1016/j.physbeh.2010.04.004
6. Bondarenko E, Beig MI, Hodgson DM, Braga VA, Nalivaiko E. Blockade of the dorsomedial hypothalamus and the perifornical area inhibits respiratory responses to arousing and stressful stimuli. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2015;308(10): R816-R822. doi:10.1152/ajpregu.00415.2014
7. Nakamura K, Morrison SF. Central sympathetic network for thermoregulatory responses to psychological stress. *Auton Neurosci.* 2022; 237:102918. doi:10.1016/j.autneu.2021.102918
8. Taugher RJ, Lu Y, Wang Y, et al. The bed nucleus of the stria terminalis is critical for anxiety-related behavior evoked by CO₂ and acidosis. *J Neurosci.* 2014;34(31):10247-10255. doi:10.1523/JNEUROSCI.1680-14.2014
9. Bonnet L, Comte A, Tatu L, Millot JL, Moulin T, Medeiros de Bustos E. The role of the amygdala in the perception of positive emotions: an "intensity detector". *Front Behav Neurosci.* 2015; 9:178. Published 2015 Jul 7. doi:10.3389/fnbeh.2015.00178
10. Marins FR, Limborço-Filho M, Xavier CH, et al. Functional topography of cardiovascular regulation along the rostrocaudal axis of the rat posterior insular cortex. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2016;43(4):484-493. doi:10.1111/1440-1681.12542

11. Nobis WP, Schuele S, Templer JW, et al. Amygdala-stimulation-induced apnea is attention and nasal-breathing dependent. *Ann Neurol.* 2018;83(3):460-471. doi:10.1002/ana.25178
12. Barbier M, González JA, Houdayer C, Burdakov D, Risold PY, Croizier S. Projections from the dorsomedial division of the bed nucleus of the stria terminalis to hypothalamic nuclei in the mouse. *J Comp Neurol.* 2021;529(5):929-956. doi:10.1002/cne.24988
13. da Silva LG, de Menezes RC, dos Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Fontes MA. Role of periaqueductal gray on the cardiovascular response evoked by disinhibition of the dorsomedial hypothalamus. *Brain Res.* 2003;984(1-2):206-214. doi:10.1016/s0006-8993(03)03157-3
14. Cao WH, Fan W, Morrison SF. Medullary pathways mediating specific sympathetic responses to activation of dorsomedial hypothalamus. *Neuroscience.* 2004;126(1):229-240. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.03.013
15. Díaz-Casares A, López-González MV, Peinado-Aragonés CA, Lara JP, González-Barón S, Dawid-Milner MS. Role of the parabrachial complex in the cardiorespiratory response evoked from hypothalamic defense area stimulation in the anesthetized rat. *Brain Res.* 2009; 1279:58-70. doi: 10.1016/j.brainres.2009.02.085
16. Díaz-Casares A, López-González MV, Peinado-Aragonés CA, González-Barón S, Dawid-Milner MS. Parabrachial complex glutamate receptors modulate the cardiorespiratory response evoked from hypothalamic defense area. *Auton Neurosci.* 2012;169(2):124-134. doi: 10.1016/j.autneu.2012.06.001
17. López-González MV, Díaz-Casares A, Peinado-Aragonés CA, Lara JP, Barbancho MA, Dawid-Milner MS. Neurons of the A5 region are required for the tachycardia evoked by electrical stimulation of the hypothalamic defence area in anaesthetized rats. *Exp Physiol.* 2013;98(8):1279-1294. doi:10.1113/expphysiol.2013.072538
18. López-González MV, Díaz-Casares A, González-García M, et al. Glutamate receptors of the A5 region modulate cardiovascular responses evoked from the dorsomedial hypothalamic nucleus and perifornical area. *J Physiol Biochem.* 2018;74(2):325-334. doi:10.1007/s13105-018-0623-3
19. Silva-Carvalho L, Dawid-Milner MS, Goldsmith GE, Spyer KM. Hypothalamic-evoked effects in cat nucleus tractus solitarius facilitating chemoreceptor reflexes. *Exp Physiol.* 1993;78(3):425-428. doi:10.1113/expphysiol.1993.sp003696
20. Silva-Carvalho L, Dawid-Milner MS, Goldsmith GE, Spyer KM. Hypothalamic modulation of the arterial chemoreceptor reflex in the anaesthetized cat: role of the nucleus tractus solitarii. *J Physiol.* 1995;487 (Pt 3) (Pt 3):751-760. doi:10.1113/jphysiol.1995.sp020915

21. McDowall LM, Horiuchi J, Killinger S, Dampney RA. Modulation of the baroreceptor reflex by the dorsomedial hypothalamic nucleus and perifornical area. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006;290(4):R1020-R1026. doi:10.1152/ajpregu.00541.2005
22. Queiroz EA, Okada MN, Fumega U, Fontes MA, Moraes MF, Haibara AS. Excitatory amino acid receptors in the dorsomedial hypothalamus are involved in the cardiovascular and behavioural chemoreflex responses. *Exp Physiol.* 2011;96(2):73-84. doi:10.1113/expphysiol.2010.054080
23. Silva NT, Nalivaiko E, da Silva LG, Haibara AS. Excitatory amino acid receptors in the dorsomedial hypothalamic area contribute to the chemoreflex tachypneic response. *Respir Physiol Neurobiol.* 2015;212-214:1-8. doi:10.1016/j.resp.2015.04.004
24. Zafar T, Brouillard C, Lanfumey L, Sévoz-Couche C. A hypothalamo-midbrain-medullary pathway involved in the inhibition of the respiratory chemoreflex response induced by potassium cyanide in rodents. *Neuropharmacology.* 2018;128:152-167. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.09.036
25. Magoun HW, Atlas D, Ingersoll EH, Ranson SW. Associated Facial, Vocal and Respiratory Components of Emotional Expression: An Experimental Study. *J Neurol Psychopathol.* 1937;17(67):241-255. doi:10.1136/jnnp.s1-17.67.241
26. Kanai T, Wang SC. Localization of the central vocalization mechanism in the brain stem of the cat. *Exp Neurol.* 1962; 6:426-434. doi:10.1016/0014-4886(62)90022-5
27. Fernández de Molina A, Hunsperger RW. Organization of the subcortical system governing defence and flight reactions in the cat. *J Physiol.* 1962;160(2):200-213. doi:10.1113/jphysiol.1962.sp006841
28. Altafullah I, Shipley C, Buchwald JS. Voiced calls evoked by hypothalamic stimulation in the cat. *Exp Brain Res.* 1988;71(1):21-32. doi:10.1007/BF00247519
29. Jüirgens U (1979) Neural control of vocalization in non-human primates. In: Steklis HD, Raleigh MJ (eds) *Neurobiology of social communication in primates: an evolutionary perspective.* Academic Press, New York, pp 11-44
30. Faull OK, Subramanian HH, Ezra M, Pattinson KTS. The midbrain periaqueductal gray as an integrative and interoceptive neural structure for breathing. *Neurosci Biobehav Rev.* 2019;98:135-144. doi:10.1016/j.neubiorev.2018.12.020
31. Krohn F, Novello M, van der Giessen RS, De Zeeuw CI, Pel JJM, Bosman LWJ. The integrated brain network that controls respiration. *Elife.* 2023;12:e83654. Published 2023 Mar 8. doi:10.7554/eLife.83654

32. Jürgens U. The neural control of vocalization in mammals: a review. *J Voice*. 2009;23(1):1-10. doi: 10.1016/j.jvoice.2007.07.005
33. Schmidt MF, Martin Wild J. The respiratory-vocal system of songbirds: anatomy, physiology, and neural control. *Prog Brain Res*. 2014; 212:297-335. doi:10.1016/B978-0-444-63488-7.00015-X
34. Subramanian HH, Holstege G. The midbrain periaqueductal gray changes the eupneic respiratory rhythm into a breathing pattern necessary for survival of the individual and of the species. *Prog Brain Res*. 2014; 212:351-384. doi:10.1016/B978-0-444-63488-7.00017-3
35. Holstege G, Subramanian HH. Two different motor systems are needed to generate human speech. *J Comp Neurol*. 2016; 524(8):1558-1577. doi:10.1002/cne.23898
36. Dichter BK, Breshears JD, Leonard MK, Chang EF. The Control of Vocal Pitch in Human Laryngeal Motor Cortex. *Cell*. 2018;174(1):21-31.e9. doi: 10.1016/j.cell.2018.05.016
37. Subramanian HH, Holstege G. The nucleus retroambiguus control of respiration. *J Neurosci*. 2009;29(12):3824-3832. doi:10.1523/JNEUROSCI.0607-09.2009
38. Subramanian HH, Huang ZG, Silburn PA, Balnave RJ, Holstege G. The physiological motor patterns produced by neurons in the nucleus retroambiguus in the rat and their modulation by vagal, peripheral chemosensory, and nociceptive stimulation. *J Comp Neurol*. 2018;526(2):229-242. doi:10.1002/cne.24318
39. Hartmann K, Brecht M. A Functionally and Anatomically Bipartite Vocal Pattern Generator in the Rat Brain Stem. *iScience*. 2020;23(12):101804. Published 2020 Nov 16. doi:10.1016/j.isci.2020.101804
40. Concha-Miranda M, Tang W, Hartmann K, Brecht M. Large-Scale Mapping of Vocalization-Related Activity in the Functionally Diverse Nuclei in Rat Posterior Brainstem. *J Neurosci*. 2022;42(44):8252-8261. doi:10.1523/JNEUROSCI.0813-22.2022
41. Ludlow CL. Central nervous system control of interactions between vocalization and respiration in mammals. *Head Neck*. 2011;33 Suppl 1:S21-S25. doi:10.1002/hed.21904
42. Pathak S, Slovarp L, Clary MS, Jetté ME. Laryngeal Chemoreflex in Health and Disease: A Review. *Chem Senses*. 2020;45(9):823-831. doi:10.1093/chemse/bjaa069
43. Bieger D, Hopkins DA. Viscerotopic representation of the upper alimentary tract in the medulla oblongata in the rat: the nucleus ambiguus. *J Comp Neurol*. 1987;262(4):546-562. doi:10.1002/cne.902620408

44. Pascual-Font, A., Hernández-Morato, I., McHanwell, S., Vázquez, T., Maranillo, E., Sañudo, J., & Valderrama-Canales, F. J. (2011). The central projections of the laryngeal nerves in the rat. *Journal of anatomy*, 219(2), 217–228. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2011.01390.x>
45. Hernández-Morato I, Pitman MJ, Sharma S. Muscle specific nucleus ambiguus neurons isolation and culturing. *J Neurosci Methods*. 2016; 273:33-39. doi:10.1016/j.jneumeth.2016.07.014
46. Blount Q, Hernández-Morato I, Moayedi Y, Pitman MJ. Expression of Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor Receptors Within Nucleus Ambiguus During Rat Development. *Laryngoscope*. 2023;133(9):2240-2247. doi:10.1002/lary.30440
47. Fogarty MJ. Dendritic morphology of motor neurons and interneurons within the compact, semicompact, and loose formations of the rat nucleus ambiguus. *Front Cell Neurosci*. 2024;18:1409974. Published 2024 Jun 12. doi:10.3389/fncel.2024.1409974
48. González-García M, Carrillo-Franco L, Morales-Luque C, et al. Uncovering the neural control of laryngeal activity and subglottic pressure in anaesthetized rats: insights from mesencephalic regions. *Pflugers Arch*. 2024;476(8):1235-1247. doi:10.1007/s00424-024-02976-3
49. Shu W, Cho JY, Jiang Y, et al. Altered ultrasonic vocalization in mice with a disruption in the *Foxp2* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(27):9643-9648. doi:10.1073/pnas.0503739102
50. Haesler S, Rochefort C, Georgi B, Licznarski P, Osten P, Scharff C. Incomplete and inaccurate vocal imitation after knockdown of FoxP2 in songbird basal ganglia nucleus Area X. *PLoS Biol*. 2007;5(12):e321. doi:10.1371/journal.pbio.0050321
51. González-García M. Mecanismos supraencefálicos involucrados en el control de la actividad laríngea [tesis doctoral]. Málaga (ES): Universidad de Málaga; 2024. Disponible en: <https://riuma.uma.es/xmlui/handle/10630/34924>
52. Motta SC, Carobrez AP, Canteras NS. The periaqueductal gray and primal emotional processing critical to influence complex defensive responses, fear learning and reward seeking. *Neurosci Biobehav Rev*. 2017; 76(Pt A): 39-47. doi:10.1016/j.neubiorev.2016.10.012
53. Trevizan-Baú P, Dhingra RR, Furuya WI, Stanić D, Mazzone SB, Dutschmann M. Forebrain projection neurons target functionally diverse respiratory control areas in the midbrain, pons, and medulla oblongata. *J Comp Neurol*. 2021;529(9):2243-2264. doi:10.1002/cne.25091

54. de Menezes RC, Zaretsky DV, Fontes MA, DiMicco JA. Cardiovascular and thermal responses evoked from the periaqueductal grey require neuronal activity in the hypothalamus. *J Physiol*. 2009; 587(Pt 6):1201-1215. doi:10.1113/jphysiol.2008.161463
55. Horiuchi J, McDowall LM, Dampney RA. Vasomotor and respiratory responses evoked from the dorsolateral periaqueductal grey are mediated by the dorsomedial hypothalamus. *J Physiol*. 2009; 587(Pt21): 5149-5162. doi: 10.1113/jphysiol.2009.179739
56. Koutsikou S, Watson TC, Crook JJ, et al. The Periaqueductal Gray Orchestrates Sensory and Motor Circuits at Multiple Levels of the Neuraxis. *J Neurosci*. 2015; 35(42):14132-14147. doi:10.1523/JNEUROSCI.0261-15.2015
57. Hayward LF, Castellanos M, Davenport PW. Parabrachial neurons mediate dorsal periaqueductal gray evoked respiratory responses in the rat. *J Appl Physiol (1985)*. 2004;96(3):1146-1154. doi:10.1152/japplphysiol.00903.2003
58. López-González MV, González-García M, Peinado-Aragonés CA, Barbancho MÁ, Díaz-Casares A, Dawid-Milner MS. Pontine A5 region modulation of the cardiorespiratory response evoked from the midbrain dorsolateral periaqueductal grey. *J Physiol Biochem*. 2020;76(4):561-572. doi:10.1007/s13105-020-00761-1
59. González-García M, Carrillo-Franco L, Peinado-Aragonés CA, et al. Impact of the glutamatergic neurotransmission within the A5 region on the cardiorespiratory response evoked from the midbrain dIPAG. *Pflugers Arch*. 2023; 475(4):505-516. doi: 10.1007/s00424-022-02777-6
60. Lara JP, Dawid-Milner MS, López MV, Montes C, Spyer KM, González-Barón S. Laryngeal effects of stimulation of rostral and ventral pons in the anaesthetized rat. *Brain Res*. 2002;934(2):97-106. doi:10.1016/s0006-8993(02)02364-8
61. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. San Diego, CA: Elsevier Academic Press; 2007.
62. Lamotte G, Shouman K, Benarroch EE. Stress and central autonomic network. *Auton Neurosci*. 2021; 235:102870. doi: 10.1016/j.autneu.2021.102870
63. Ghali MGZ. Respiratory rhythm generation and pattern formation: oscillators and network mechanisms. *J Integr Neurosci*. 2019;18(4):481–517. doi: 10.31083/j.jin.2019.04.188
64. Gacek RR. Localization of laryngeal motor neurons in the kitten. *Laryngoscope*. 1975;85(11 Pt 1):1841–1861. doi:10.1288/00005537-197511000-00007

65. Hinrichsen CF, Ryan AT. Localization of laryngeal motoneurons in the rat: morphologic evidence for dual innervation?. *Exp Neurol*. 1981;74(2):341-355. doi:10.1016/0014-4886(81)90174-6
66. Pásaro R, Lobera B, González-Barón S, Delgado-García JM. Cytoarchitectonic organization of laryngeal motoneurons within the nucleus ambiguus of the cat. *Exp Neurol*. 1983;82(3):623-634. doi:10.1016/0014-4886(83)90085-7
67. Davis PJ, Nail BS. On the location and size of laryngeal motoneurons in the cat and rabbit. *J Comp Neurol*. 1984;230(1):13-32. doi:10.1002/cne.902300103
68. Hisa Y, Sato F, Fukui K, Ibata Y, Mizuokoshi O. Nucleus ambiguus motoneurons innervating the canine intrinsic laryngeal muscles by the fluorescent labeling technique. *Exp Neurol*. 1984;84(2):441-449. doi:10.1016/0014-4886(84)90240-1
69. Basterra J, Chumbley C, Dilly PN. Topographic distribution of laryngeal motor neurons in the nucleus ambiguus of the guinea pig studied by horseradish peroxidase (HRP) technique. *Acta Otolaryngol*. 1987;103(1-2):105-110. doi:10.3109/00016488709134704
70. Flint PW, Downs DH, Coltrera MD. Laryngeal synkinesis following reinnervation in the rat. Neuroanatomic and physiologic study using retrograde fluorescent tracers and electromyography. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1991; 100(10):797-806. doi:10.1177/000348949110001003
71. Nahm I, Shin T, Watanabe H, Maeyama T. Misdirected regeneration of injured recurrent laryngeal nerve in the cat. *Am J Otolaryngol*. 1993;14(1):43-48. doi:10.1016/0196-0709(93)90009-v
72. Hernández-Morato I, Pascual-Font A, Ramírez C, et al. Somatotopy of the neurons innervating the cricothyroid, posterior cricoarytenoid, and thyroarytenoid muscles of the rat's larynx. *Anat Rec (Hoboken)*. 2013;296(3):470-479. doi:10.1002/ar.22643
73. Kobler JB, Datta S, Goyal RK, Benecchi EJ. Innervation of the larynx, pharynx, and upper esophageal sphincter of the rat. *J Comp Neurol*. 1994; 349(1):129-147. doi:10.1002/cne.903490109
74. Furusawa K, Yasuda K, Okuda D, Tanaka M, Yamaoka M. Central distribution and peripheral functional properties of afferent and efferent components of the superior laryngeal nerve: morphological and electrophysiological studies in the rat. *J Comp Neurol*. 1996;375(1):147-156. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19961104)375:1<147::AID-CNE9>3.0.CO;2-3

75. Hydman J, Mattsson P. Collateral reinnervation by the superior laryngeal nerve after recurrent laryngeal nerve injury. *Muscle Nerve*. 2008;38(4):1280-1289. doi:10.1002/mus.21124
76. Björck G, Margolin G, Måbäck GM, Persson JK, Mattsson P, Hydman J. New animal model for assessment of functional laryngeal motor innervation. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2012;121(10):695-699. doi:10.1177/000348941212101013
77. Berdugo-Vega G, Arias-Gil G, Rodriguez-Niedenführ M, Davies DC, Vázquez T, Pascual-Font A. GFAP immunoreactivity within the rat nucleus ambiguus after laryngeal nerve injury. *J Anat*. 2014;225(5):492-501. doi:10.1111/joa.12231
78. Uludag M, Aygun N, Kartal K, Besler E, Isgor A. Innervation of the human posterior cricoarytenoid muscle by the external branch of the superior laryngeal nerve. *Head Neck*. 2017;39(11):2200-2207. doi:10.1002/hed.24896
79. Martín-Oviedo C, Marañillo E, Sañudo JR, et al. The Human Laryngeal Innervation Revisited-The Role of the Neural Connections. *Anat Rec (Hoboken)*. 2019;302(4):646-651. doi:10.1002/ar.23817
80. Dawid-Milner MS, Lara JP, Milan A, González-Barón S. Activity of inspiratory neurones of the ambiguus complex during cough in the spontaneously breathing decerebrate cat. *Exp Physiol*. 1993;78(6):835-838. doi:10.1113/expphysiol.1993.sp003730
81. Dawid-Milner MS, Silva-Carvalho L, Goldsmith GE, Spyer KM. Hypothalamic modulation of laryngeal reflexes in the anaesthetized cat: role of the nucleus tractus solitarii. *J Physiol*. 1995;487 (Pt 3)(Pt 3):739-749. doi:10.1113/jphysiol.1995.sp020914
82. Moraes, D. J., & Machado, B. H. (2015). Electrophysiological properties of laryngeal motoneurons in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *The Journal of physiology*, 593(3), 619–634. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.283085>
83. Fontes MAP, Marins FR, Patel TA, de Paula CA, Dos Santos Machado LR, de Sousa Lima ÉB, et al. Neurogenic background for emotional stress-associated hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2023;25(7):107–116. doi:10.1007/s11906-023-01235-7



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

INTRODUCCIÓN



III. INTRODUCCIÓN

Diversas estructuras del sistema nervioso central como la amígdala, el hipotálamo y el tronco del encéfalo desempeñan un papel clave en el control de la función cardiorrespiratoria. Aunque estas áreas interactúan entre sí para coordinar las respuestas ante factores estresantes y amenazantes, hasta la fecha no se ha descrito con precisión cómo se comunican entre ellas para generar respuestas adaptativas eficientes (Díaz-Casares et al., 2012; Bruinstroop et al., 2012; Bondarenko et al., 2015; Bonnet et al., 2015; Deng et al., 2016; Díaz-Casares et al., 2018).

En las últimas décadas, también se ha establecido que muchas de estas regiones participan en el control del ritmo respiratorio durante la vocalización. Sin embargo, la participación del hipotálamo en esta función no ha recibido la misma atención que otras estructuras, siendo la sustancia gris periacueductal del mesencéfalo (SGP) la que ha cobrado mayor relevancia a lo largo de los años (Altafullah et al., 1988; Jürgens, 1994; Subramanian et al., 2008; Jürgens, 2009; Holstege & Subramanian, 2016). La vocalización es un proceso fisiológico que comparte redes neuronales con la respiración e integra no solo señales motrices y respiratorias, sino también señales emocionales, lo que permite adaptar las vocalizaciones a situaciones de amenaza (Davis et al., 1996; Krohn et al., 2023; González-García et al., 2024b).

Dentro de este circuito, destacan las conexiones de la SGP con los grupos respiratorios pontino (GRP), dorsal (GRD) y los diferentes núcleos de la columna respiratoria ventral. También destaca su capacidad para modular la actividad de las motoneuronas laríngeas en el núcleo ambiguo (nA) (Krohn et al., 2023; González-García et al., 2024c). Aunque el hipotálamo comparte conectividad con algunos de estos centros respiratorios, incluida la SGP, hasta la fecha no se ha descrito una interacción funcional sólida entre el hipotálamo y el nA. No obstante, el hipotálamo y, en concreto, el núcleo dorsomedial hipotalámico y el área perifornical hipotalámica (DMH/PeF, por sus siglas en inglés) participan en la respuesta de defensa a través de conexiones funcionales con la columna dorsolateral de la SGP (SGPdI) (de Menezes et al., 2006; de Menezes et al., 2009; Horiuchi et al., 2009).

Por esta razón, este trabajo se centra en el estudio de la posible interacción funcional entre el hipotálamo y el nA, teniendo en cuenta su relación con la SGP. Consideramos que la conexión entre el DMH/PeF y la SGPdI podría constituir la base de una interrelación que modula tanto la respuesta cardiorrespiratoria como la vocalización, funciones que son esenciales para una respuesta adaptativa eficiente frente al estrés. Para abordar esta posible interacción, en los siguientes apartados se revisa el papel del DMH/PeF en la función

cardiorrespiratoria y la respuesta de defensa, su relación con la SGPdl y su participación en la producción vocal, con especial atención en el nA. Asimismo, dado que el nA contiene las motoneuronas que controlan la musculatura laríngea, responsables de modular la presión subglótica, se incluye una revisión de la anatomía y fisiología laríngea.

3.1. Papel del DMH/PeF en la función autonómica y respuesta de defensa

3.1.1. Organización anatómica-funcional del hipotálamo

El hipotálamo es una estructura que se ubica en la parte ventral del diencefalo que, clásicamente, se ha vinculado a la función autonómica y, en especial, a la *respuesta de defensa*. La *respuesta de defensa* es un reflejo que se desencadena ante situaciones aversivas y amenazantes y que se caracteriza por cambios cardiorrespiratorios inmediatos, como incrementos de la presión arterial, la frecuencia cardíaca, la frecuencia respiratoria y una vasoconstricción cutánea (Díaz-Casares et al., 2009; Kabir et al., 2010; Díaz-Casares et al., 2012; López-González et al., 2013; Mohammed et al., 2013; Bondarenko et al., 2014; Bondarenko et al., 2015; López-González et al., 2018; Nakamura & Morrison, 2022).

Además de respuestas hipertensoras e hiperprnéicas, desde hace décadas se ha observado también una disminución en la respuesta cardiorrespiratoria según la región hipotalámica estimulada. De hecho, en un inicio, el hipotálamo fue dividido en una zona rostral depresora y una caudal presora (Hess & Brügger, 1981; Mancía & Zanchetti, 1981). Sin embargo, con los años se ha establecido una especialización anatómica y funcional más detallada de esta región.

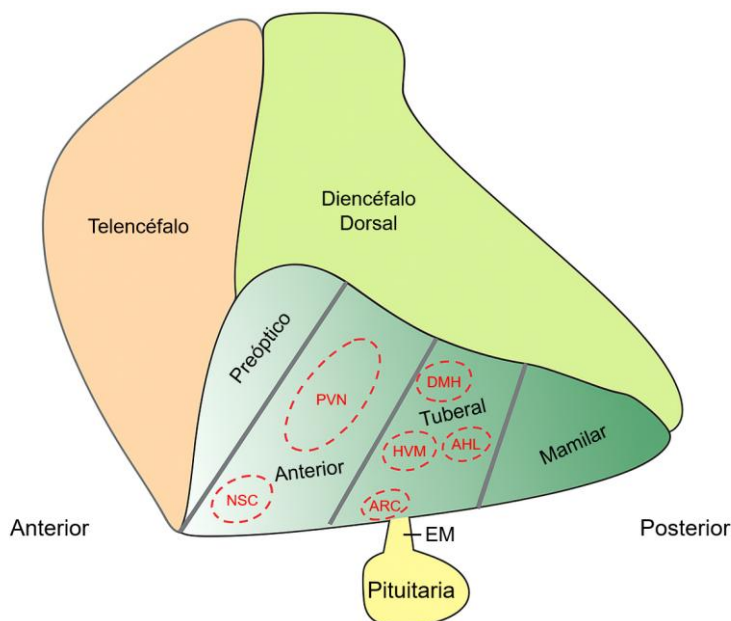
En concreto, se ha demostrado que, a diferencia de otras estructuras cerebrales, los núcleos que componen el hipotálamo presentan una disposición en mosaico tridimensional, que se conserva de forma notable entre las distintas especies de vertebrados. En mamíferos adultos se divide en cuatro regiones rostrocaudales (preóptica, anterior, tuberal y mamilar), cada una de ellas con zonas lateral, medial y periventricular, que cumplen funciones específicas como la termorregulación, la reproducción, la regulación de los ritmos circadianos, el balance energético, la respuesta al estrés y la memoria (Figura 1) (Markakis, 2002; Vann & Nelson, 2015; Burbridge et al., 2016; Xie & Dorsky, 2017).

En este contexto, las regiones hipotalámicas más caudales parecen tener un efecto más potente en la respuesta de defensa debido a su influencia excitadora sobre la función cardiorrespiratoria. De todos esos núcleos, el DMH/PeF se ha identificado como una región mediadora clave de estas respuestas (DiMicco et al., 2002). Estructuralmente son independientes, ya que presentan posiciones anatómicas diferentes dentro del hipotálamo. Según Paxinos y Watson (2007), en el cerebro de rata, el DMH forma parte del área dorsomedial hipotalámica y se localiza en la parte medial del hipotálamo, cerca del tercer ventrículo. Esta estructura se subdivide, a su vez, en dorsal, compacta y ventral. El área perifornical hipotalámica, que incluye el núcleo PeF, se localiza lateral al DMH y rodeando al fórnix.

A pesar de estas diferencias topográficas, desde un punto de vista funcional, ambas estructuras trabajan de forma coordinada para regular las respuestas del sistema nervioso autónomo. Asimismo, se ha descrito que el DMH proyecta de forma significativa hacia el PeF, lo que refuerza la idea de que ambas forman parte de un sistema funcional común. La importancia de esta interacción para el control de respuestas adaptativas frente a amenazas ha llevado a que estas regiones se incluyan dentro del concepto funcional de “Área de Defensa Hipotalámica” (aDH), que engloba un conjunto de estructuras hipotalámicas implicadas en la organización de la respuesta de defensa (ter Horst & Luiten, 1986; DiMicco et al., 2002; McDowall et al., 2006).

Estas estrategias fisiológicas, que incluyen respuestas autonómicas, endocrinas y conductuales, han evolucionado a lo largo de millones de años para ser particularmente efectivas en situaciones de estrés agudo. Sin embargo, esta respuesta facilitada por el DMH/PeF no se limita a las amenazas, sino que involucra los ajustes de todas las respuestas adaptativas, incluido los comportamientos motivacionales y emocionales. Además, su participación en estas respuestas ha cobrado cada vez mayor importancia, ya que la naturaleza de los estresores psicológicos ha cambiado en la sociedad actual, especialmente en cuanto a su gravedad y cronicidad. Este estrés psicológico moderno se ha asociado con un mayor riesgo de alteraciones cardiovasculares y respiratorias, lo que subraya la necesidad de comprender sus mecanismos (DiMicco et al., 2002; Meuret et al., 2010; Fontes et al., 2011; Fontes et al., 2017).

Por lo tanto, el papel del DMH/PeF va más allá de las respuestas inmediatas ante amenazas, abarcando funciones fisiológicas más amplias, esenciales para la adaptación a una variedad de desafíos. Específicamente, existe una amplia evidencia que vincula el DMH/PeF con la regulación de respuestas cardiovasculares, respiratorias, endocrinas, termorreguladoras y el control de la vejiga urinaria (Rocha et al., 2004; Nakamura, 2011; Pang & Han, 2012; Dampney, 2016; Fukushi et al., 2019). Además, el DMH/PeF también regula los ciclos de sueño-vigilia, los ritmos circadianos, la homeostasis, el comportamiento de búsqueda de recompensa y la ingesta de alimentos (Houtz et al., 2021; Li et al., 2022; Ramirez-Plascencia et al., 2024). Aunque el DMH/PeF participa en múltiples funciones, este estudio se centra especialmente en la influencia de esta región sobre la respuesta cardiorrespiratoria y en su posible papel en la vocalización, una función que está aún por esclarecer.

Figura 1*Localización y estructura del hipotálamo*

Nota. Vista lateral del prosencéfalo que muestra las divisiones hipotalámicas conservadas en un vertebrado prototípico adulto. Las diferentes regiones hipotalámicas se muestran delimitadas rostrocaudalmente mediante líneas grises continuas. Los núcleos que conforman cada región se muestran delimitados mediante líneas rojas discontinuas. Abreviaturas: ARC: núcleo arcuato; DMH: hipotálamo dorsomedial; AHL: área hipotalámica lateral; EM: eminencia media; PVN: núcleo paraventricular; NSC: núcleo supraquiasmático; HVM: hipotálamo ventromedial. Adaptado de *Development of the hypothalamus: conservation, modification and innovation*, por Y. Xie y R. I. Dorsky, 2017, *Development*, 144(9), p. 1589. <https://doi.org/10.1242/dev.139055>. Figura elaborada con apoyo de herramientas de inteligencia artificial.

3.1.2. Papel del DMH/PeF en la función cardiorrespiratoria

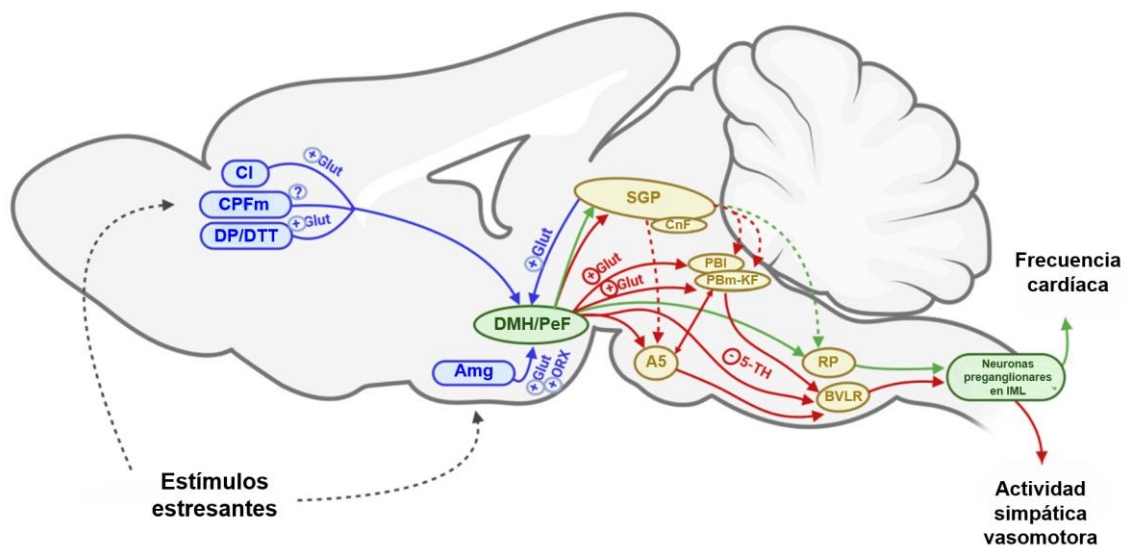
El DMH/PeF tiene un papel esencial en la regulación de los cambios cardiorrespiratorios. Tanto su estimulación eléctrica como su desinhibición con bicuculina (antagonista del receptor GABAA) provocan un aumento de la frecuencia cardíaca y la presión arterial, que se correlaciona con las dosis administradas (Fontes et al., 2001; DiMicco et al., 2002; Horiuchi et al., 2004). En cambio, al bloquear el DMH/PeF se observa una disminución significativa de la respuesta presora, la taquicardia, el flujo sanguíneo en los músculos esqueléticos y la actividad simpática renal en ratas conscientes (Morin et al., 2001; Queiroz et al., 2011). Además, la inhibición de esta región también suprime las respuestas respiratorias a estímulos excitatorios y estresantes (Bondarenko et al., 2015). Curiosamente, los cambios cardiorrespiratorios inducidos por la estimulación del DMH/PeF

en ratas anestesiadas son similares a los observados durante las respuestas naturales al estrés (DiMicco et al., 2002). Asimismo, bajo estas mismas condiciones, la expresión de c-Fos aumenta en esta región (Briski & Gillen, 2001).

Más allá de estas respuestas, el DMH/PeF también participa en el reajuste de los reflejos que regulan la presión arterial. Por ejemplo, durante el estrés, facilita el ajuste del reflejo barorreceptor para acomodar los niveles elevados de presión arterial (McDowall et al., 2006). De igual modo, potencia el reflejo quimiorreceptor para regular el flujo respiratorio en función de los niveles de gases en sangre (Silva et al., 2015; Díaz-Casares et al., 2018). El DMH/PeF modula estas respuestas cardiorrespiratorias y reflejas a través de una extensa red de conexiones con regiones corticales y troncoencefálicas (Figura 2).

Figura 2

Regiones implicadas en la respuesta cardiorrespiratoria mediada por el DMH/PeF



Nota. Vías de entrada (azul) y salida del DMH/PeF que regulan la actividad simpática vasomotora (rojo) y la frecuencia cardíaca (verde), a través de conexiones directas (líneas continuas) e indirectas (líneas discontinuas). Abreviaturas: 5-HT: 5-hidroxitriptamina; A5: región de células noradrenérgicas A5; Amg: amígdala; BVL: bulbo ventrolateral rostral; CI: corteza insular; CnF: núcleo cuneiforme; CPFm: corteza prefrontal medial; DMH/PeF: núcleo hipotalámico dorsomedial y área perifornical; DP/DTT: corteza peduncular dorsal y tenia tecta dorsal en la corteza prefrontal ventromedial; Glut: glutamato; IML: columna intermediolateral de la médula espinal; ORX: orexina; PBI: núcleo parabraquial lateral; PBm-KF: núcleo parabraquial medial y núcleo de Kölliker-Fuse; RP: rafe pálido; SGP: sustancia gris periacueductal. Adaptado de *Hypothalamic regulation of cardiorespiratory functions: Insights into the dorsomedial and perifornical pathways*, por L. Carrillo-Franco, M. González-García, C. Morales-Luque, M. S. Dawid-Milner y M. V. López-González, 2024, *Biology*, 13(11), Artículo 933. <https://doi.org/10.3390/biology13110933>

3.1.2.1. Conexiones aferentes del DMH/PeF

El DMH/PeF modula la actividad cardiorrespiratoria integrando información de múltiples estructuras cerebrales. Las principales vías de entrada al DMH/PeF se detallan, a continuación, organizadas por su localización anatómica en función de si son regiones superiores o inferiores.

Conexiones aferentes desde regiones superiores

El DMH/PeF recibe numerosos inputs procedentes de regiones corticales y subcorticales, que le envían señales relacionadas con el procesamiento de información sensorial, emocional y cognitiva (Zhang et al., 2009; Freitas et al., 2013; Bondarenko et al., 2015; Marins et al., 2016; Kataoka et al., 2020; Barbier et al., 2021; Singh et al., 2022). A nivel cortical, la corteza insular (CI) ha sido identificada como una de las principales vías que proyectan hacia el DMH/PeF, sobre todo, su región intermedia. Esta parece influir en la actividad simpática mediada por el DMH/PeF a través de proyecciones glutamatérgicas directas. En concreto, lo hace a través de los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) (Marins et al., 2016).

Las diferentes subregiones de la corteza prefrontal medial (CPFm) también proyectan hacia el DMH/PeF, pero estas parecen desempeñar roles diferentes. La corteza prelímbica y la infralímbica, que conforman la unidad dorsal, inhiben las respuestas simpáticas mediante un mecanismo de retroalimentación negativa mediado por glucocorticoides (Freitas et al., 2013; Bondarenko et al., 2015; Kataoka et al., 2020). Por el contrario, la corteza peduncular dorsal/tenia tecta dorsal (DP/DTT, por sus siglas en inglés), que constituye la unidad ventral, activa una vía glutamatérgica que va desde la DP/DTT hacia el DMH/PeF para potenciar las respuestas al estrés. Esta vía estimula, a su vez, a las neuronas del núcleo rostral del rafe medular, responsables de la termogénesis, la vasoconstricción cutánea y la activación cardiovascular (Kataoka et al., 2020).

A nivel límbico, la amígdala constituye otra proyección aferente importante del DMH/PeF. El bloqueo de los receptores de glutamato en el DMH/PeF suprime las respuestas cardiovasculares inducidas por la estimulación química de la amígdala (Soltis et al., 1998). Esta interacción no es exclusivamente glutamatérgica, sino que la amígdala proporciona también entrada orexinérgica para regular la actividad cardiorrespiratoria (Zhang et al., 2009). La relación entre estas dos regiones se ha visto corroborada por estudios recientes de neuroimagen que indican que las proyecciones de la amígdala hacia el DMH/PeF ajustan los comportamientos cardiovasculares en respuesta a las amenazas percibidas (Bonnet et al., 2015; Ressler et al., 2022).

En este mismo nivel, el núcleo de la estra terminal (BNST, por sus siglas en inglés) actúa como un intermediario clave entre la amígdala y el DMH/PeF (Dong et al., 2001;

Yoshida et al., 2006; Shin et al., 2008; Lebow & Chen, 2016; Ni et al., 2016; Barbier et al., 2021), especialmente en la regulación de respuestas de miedo, amenaza y estrés. En el control respiratorio participa activamente durante estados de ansiedad o pánico. En concreto, se activa frente a la hipercapnia y contribuye a respuestas defensivas como el *freezing*, que se caracteriza por una disminución de la frecuencia respiratoria (Taughner et al., 2014; Taughner et al., 2015).

A nivel hipotalámico, el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) también proyecta hacia el DMH/PeF. El PVN se ha asociado con la modulación de la frecuencia cardíaca y la actividad ventilatoria en situaciones de hipoxia y estrés. Aunque la influencia de esta región sobre el DMH/PeF sigue siendo objeto de investigación, sus proyecciones parecen contribuir en la integración de la respuesta de defensa (Thompson et al., 1996; Reddy et al., 2005; Ruyle et al., 2019; Singh et al., 2022).

Conexiones aferentes desde regiones inferiores

El DMH/PeF recibe aferencias desde estructuras troncoencefálicas que participan en el control cardiorrespiratorio. Estas conexiones reflejan el papel del DMH/PeF como nodo modulador de esta función, ya que en ella convergen las señales viscerosensoriales y vegetativas necesarias para mediar las respuestas adaptativas. De todas estas conexiones destacan las mesencefálicas procedentes de la SGP y, en concreto, las procedentes de la SGP lateral (SGPl) y la SGPd. La activación de estas regiones genera taquipnea, taquicardia, hipertensión y aumento de la temperatura corporal, efectos que parecen depender de la integridad del DMH/PeF (Thompson & Swanson, 1998; Horiuchi et al., 2009).

De igual modo, se han descrito proyecciones desde el núcleo parabraquial lateral (PBI) en la protuberancia, encargadas de transmitir las señales necesarias para la modulación no solo de estas respuestas autonómicas, sino también para la defensa frente al frío (Saper & Loewy, 1980; Krukoff et al., 1993; Bester et al., 1997; Yang et al., 2023). El núcleo Kölliker-Fuse (KF), que forma parte del complejo parabraquial (cPB), también proyecta hacia el DMH/PeF para coordinar la respuesta respiratoria y autonómica (Panneton et al., 2006; Yokota et al., 2016; Zhang et al., 2018).

A nivel bulbar, el núcleo del tracto solitario (NTS) constituye otra entrada esencial, al integrar aferencias barorreceptoras, quimiorreceptoras y pulmonares, que son retransmitidas hacia el DMH/PeF (Silva-Carvalho et al., 1993; Silva-Carvalho et al., 1995a; Silva-Carvalho et al., 1995b; Umans & Liberles, 2018; Zafar et al., 2018; Suarez-Roca et al., 2021).

3.1.2.2. Conexiones eferentes del DMH/PeF

Aunque estudios de trazado anatómico han evidenciado proyecciones desde el DMH/PeF hacia neuronas simpáticas preganglionares en la médula espinal, estas conexiones no están totalmente establecidas y, en caso de existir, parecen ser limitadas (Hosoya et al., 1987; Thompson et al., 1996). Por tanto, la influencia del DMH/PeF en la actividad autonómica depende, principalmente, de otras vías simpatoexcitatorias ascendentes y descendentes. Las posibles vías de salida a través de las cuales el DMH/PeF modula estas respuestas cardiorrespiratorias se describen, a continuación, organizadas por su localización anatómica en función de si proyectan hacia regiones superiores o inferiores.

Conexiones eferentes hacia regiones superiores

Los estudios pioneros de trazado anatómico han demostrado que el DMH/PeF envía proyecciones eferentes hacia diversas regiones del prosencéfalo, especialmente hacia áreas corticales (ej.; corteza cingulada, frontal, parietal e insular) y hacia estructuras límbicas como la amígdala lateral y basolateral, el hipocampo, el septum y el BNST (Ter Horst & Luiten, 1986; Onat et al., 2002). Estas conexiones han sido respaldadas con los años y refuerzan el papel del DMH/PeF como centro integrador, ya que a través de ellas el DMH/PeF vincula la respuesta autonómica con circuitos emocionales y cognitivos, sobre todo, en situaciones de amenaza o estrés (Schaeuble & Myers, 2022; Schottelkotte & Crone, 2022; Carrillo-Franco et al., 2024).

Conexiones eferentes hacia regiones inferiores

Las proyecciones del DMH/PeF hacia regiones inferiores se dirigen hacia centros mesencefálicos y bulbopontinos, la mayoría de ellos con funciones premotoras. Para comprender mejor el papel del DMH/PeF en el control cardiorrespiratorio, a continuación, se describen sus principales eferencias hacia estas regiones y la influencia que ejerce sobre los núcleos implicados en la regulación de la frecuencia cardíaca, la presión arterial y el patrón respiratorio. Estas proyecciones se presentan organizadas según su posición anatómica en estructuras mesencefálicas, pontinas y bulbares.

Estructuras mesencefálicas

Una de las proyecciones descendentes más importantes del DMH/PeF se dirige hacia la SGP y, en concreto, hacia la SGPI y la SGPdI (Motta et al., 2009; Benarroch, 2012; Dampney, 2015; de Git et al., 2018; Trevizan-Baú et al., 2021a; Schottelkotte & Crone, 2022). Estas integran las señales procedentes del DMH/PeF para redistribuir, por un lado, el componente vasomotor hacia el bulbo ventrolateral rostral (BVLR) y, por otro lado, el componente cardíaco hacia el rafe pálido (RP) (da Silva et al., 2003; de Menezes et al., 2006). De igual modo, estas mismas columnas de la SGP parecen participar en la

transmisión de señales cardiorrespiratorias hacia núcleos bulbopontinos tales como el cPB-KF, las células noradrenérgicas de la región A5 (A5), el NTS, el núcleo retroambiguo (nRA) y nA (Herbert & Saper, 1992; Bianchi et al., 1998; Krout et al., 1998; Vanderhorst et al., 2000; Kawai, 2018; Yang & Feldman, 2018; López-González, 2020; Trevizan-Bau et al., 2021b; Chen et al., 2021; González-García et al., 2023; González-García et al., 2024a; González-García et al., 2024b; González-García et al., 2024c; Rocha et al., 2024).

Estructuras pontinas

La protuberancia contiene núcleos claves que regulan la función cardiorrespiratoria mediada por el DMH/PeF, principalmente el cPB-KF y el A5 (Díaz-Casares et al., 2009; Díaz-Casares et al., 2012; López-González et al., 2013; López-González et al., 2018; Trevizan-Baú et al., 2021b). A través de estas conexiones, el DMH/PeF ajusta tanto la respuesta cardiovascular como la frecuencia y el patrón ventilatorio en respuesta a diferentes demandas fisiológicas (Moga et al., 1990; Díaz-Casares et al., 2009).

El cPB está formado por el núcleo PBI y el núcleo parabraquial medial (PBm) (Fulwiler & Saper, 1984). El núcleo PBI transmite las señales del DMH/PeF hacia circuitos respiratorios del tronco encefálico. Su activación facilita la generación de respuestas ventilatorias rápidas como la taquipnea. Además, el PBI influye sobre las neuronas del BVLR, para que los ajustes respiratorios del DMH/PeF se integren con respuestas cardiovasculares. Este proceso depende, sobre todo, de un mecanismo excitatorio mediado por glutamato, el cual es liberado por el DMH/PeF y actúa sobre los receptores ionotrópicos dentro del cPB. Este mecanismo asegura la generación de respuestas cardiorrespiratorias inmediatas (Dawid-Milner et al., 2003; Díaz-Casares et al., 2009; Díaz-Casares et al., 2012).

El cPB también participa en la facilitación del quimiorreflejo, que es crucial para mantener la homeostasis durante el estrés. Más concretamente, el DMH/PeF facilita los reflejos quimiorreceptores al estimular neuronas del NTS, que proyectan hacia el cPB. En este último, los núcleos PBI, PBm y KF interactúan para ajustar la frecuencia respiratoria, siendo el PBI el que más influencia tiene (Silva-Carvalho et al., 1993; Silva-Carvalho et al., 1995a; Silva-Carvalho et al., 1995b; Zafar et al., 2018).

La región A5 añade otra capa de complejidad a esta red descendente de vías eferentes del DMH/PeF. El DMH/PeF regula la actividad cardiorrespiratoria, en parte, a través de sus conexiones con la región A5, cuya composición heterogénea (neuronas catecolaminérgicas y no catecolaminérgicas) le permite integrar y modular de forma específica y, por separado, respuestas cardiovasculares y respiratorias (Bruinstroop et al., 2012). Se sabe que las neuronas catecolaminérgicas del A5 colaboran en la modulación del flujo simpático mediado por el DMH/PeF (Abbott et al., 2012; Rocha et al. 2024). En concreto, estas neuronas facilitan los ajustes de la presión arterial durante el estrés y ejercen estos

efectos a través de conexiones funcionales con el BVLR. Además, el A5 interacciona funcionalmente con el cPB para la regulación autonómica, pues su inhibición reduce significativamente las respuestas cardiorrespiratorias inducidas por la activación del cPB (Dawid-Milner et al., 2003; López-González et al., 2013; López et al., 2018).

Estructuras bulbares

El bulbo raquídeo actúa como una estación de relevo para las señales descendentes del DMH/PeF hacia las neuronas preganglionares en la médula espinal. Los principales núcleos bulbares involucrados en este proceso incluyen el BVLR, el RP y el NTS. Estos núcleos albergan premotoneuronas simpáticas que modulan el tono vasomotor, la frecuencia cardíaca y la actividad respiratoria respectivamente (Jordan et al., 1988; Mifflin et al., 1988; Samuels et al., 2002, Guyenet et al., 2006).

En concreto, el DMH/PeF controla de forma directa la presión arterial mediante proyecciones que se dirigen hacia el BVLR, un núcleo clave para regular la actividad vasomotora simpática. Desde allí, las premotoneuronas simpáticas proyectan hacia la columna intermediolateral (IML) de la médula espinal para modular la actividad de las neuronas preganglionares simpáticas (Dampney et al., 2002; Guyenet et al., 2006). La activación del DMH/PeF incrementa la frecuencia de descarga de estas neuronas, lo que intensifica el tono simpático vasomotor, provocando vasoconstricción periférica y elevando la presión arterial (Horiuchi et al., 2004).

Esta respuesta está mediada principalmente por vías glutamatérgicas, en las que la liberación de aminoácidos excitadores desde el DMH/PeF activa directamente las neuronas del BVLR, facilitando así los ajustes autonómicos necesarios durante el estrés (Cao et al., 2004). Las neuronas orexinérgicas del DMH/PeF también contribuyen a la modulación de la actividad cardiovascular. Las proyecciones que liberan orexina desde el DMH/PeF activan el BVLR y generan una respuesta simpatoexcitatoria muy significativa, mediada por receptores ORX2 y, en menor medida, por receptores ORX1 (Huang et al., 2010; Li et al., 2018).

Además de estas vías excitatorias, se han identificado proyecciones GABAérgicas que permiten al DMH/PeF tener un control inhibitorio sobre las respuestas cardiovasculares (Cao et al., 2004). Esta variedad neuroquímica refleja la complejidad de la influencia que el DMH/PeF tiene sobre el BVLR en la modulación de la respuesta cardiovascular. Además, a pesar de esta vía directa, se postula que el DMH/PeF también modula indirectamente la presión arterial en el BVLR a través de la SGP (Zhang et al., 2024).

Para regular la frecuencia cardíaca, el DMH/PeF se sirve de sus proyecciones hacia el RP. Esta región contiene una población de neuronas serotoninérgicas que proyectan hacia las motoneuronas preganglionares cardíacas en la columna IML de la médula espinal, las

cuales controlan la frecuencia cardíaca y el volumen sistólico, regulando así el gasto cardíaco. La activación del DMH/PeF estimula las neuronas del RP, lo que se traduce en una respuesta de taquicardia y un aumento de contractilidad (Samuels et al., 2002; Cao et al., 2004; Horiuchi et al., 2004). La mayoría de las proyecciones hipotalámicas que alcanzan el RP se originan específicamente en la porción dorsal del DMH/PeF (Nogueira et al., 2000), lo que sugiere la existencia de una vía dedicada a la modulación cardíaca. Aunque se ha planteado una segunda vía indirecta que involucra la SGP (da Silva et al., 2003; de Menezes et al., 2006), algunos autores proponen que la taquicardia inducida por el estrés emocional depende únicamente de la conexión directa DMH/PeF–RP (Samuels et al., 2002).

Por otro lado, el DMH/PeF contribuye al control del reflejo barorreceptor mediante proyecciones que alcanzan el NTS, que tienen un efecto tónico inhibitor. Esta modulación permite que el sistema cardiovascular genere los aumentos de presión arterial característicos de la respuesta de defensa (Kanbar et al., 2007; Krohn et al., 2023). El mecanismo que hace posible esta regulación implica la inhibición de las neuronas barorreceptoras del NTS a través de la activación de receptores GABA_A. En concreto, la estimulación del DMH/PeF provoca la liberación de glutamato sobre receptores ionotrópicos localizados en interneuronas GABAérgicas del NTS (Jordan et al., 1988; Mifflin et al., 1988). Esto activa la liberación de GABA, que posteriormente inhibe a las neuronas preganglionares colinérgicas del núcleo motor dorsal del vago (10N) y motoneuronas cardíacas vagales del nA. En consecuencia, el tono parasimpático disminuye y se atenúa el reflejo barorreceptor. Esto permite un control más flexible de la presión arterial en condiciones de estrés (Silva-Carvalho et al., 1995a; Silva-Carvalho et al., 1995b; Zafar et al., 2018).

El DMH/PeF también facilita el reflejo quimiorreceptor a través de sus proyecciones hacia el NTS. En este circuito, la activación hipotalámica excita neuronas del NTS que se proyectan hacia los centros respiratorios del DRG y la columna respiratoria ventral, estructuras con las que el propio DMH/PeF también parece mantener conexiones funcionales. La activación de este circuito produce un incremento en la frecuencia respiratoria y en el volumen corriente, que permite una respuesta ventilatoria eficiente frente a condiciones de estrés o aumento de la demanda metabólica (Silva-Carvalho et al., 1993; Silva-Carvalho et al., 1995a; Silva-Carvalho et al., 1995b; Dawid-Milner et al., 1995).

Esta respuesta parece estar modulada también por neuronas LEPR_b+ (receptor de leptina) del DMH/PeF que proyectan hacia el rafe dorsal. Estas proyecciones han sido asociadas con el control de la frecuencia respiratoria y con el control de la musculatura lingual, crucial para mantener la vía aérea abierta durante la respiración (Marina et al., 2018; Amorim et al., 2023). De forma adicional, se ha descrito que para facilitar el quimiorreflejo,

el DMH/PeF también se apoya en vías indirectas que involucran la SGPdI y el núcleo cuneiforme (Dampney et al., 2013; Dampney et al., 2015).

3.1.3. Propiedades neuroquímicas del DMH/PeF

Desde un punto de vista neuroquímico, el DMH/PeF es muy heterogéneo y esta diversidad explica por qué está implicado en múltiples funciones. En el DMH/PeF coexisten poblaciones neuronales glutamatérgicas y GABAérgicas, que establecen un equilibrio en la magnitud de la respuesta autonómica eferente. Más concretamente, se han identificado neuronas glutamatérgicas en el DMH/PeF que potencian la actividad de las proyecciones troncoencefálicas y, con ello, las respuestas simpáticas asociadas a los estados de alerta (Cao et al., 2004; Kataoka et al., 2014). Estas poblaciones neuronales parecen actuar a través de receptores glutamatérgicos de tipo NMDA y no-NMDA (Gören et al., 2003; de Menezes et al., 2009; Xavier et al., 2014).

Por otro lado, esta actividad simpática eferente recibe control inhibitorio por parte de un grupo de neuronas GABAérgicas (Cao et al., 2004; Wang et al., 2022). La disminución de este tono inhibitorio parece facilitar los cambios autonómicos propios de una respuesta de defensa. En este contexto, se ha demostrado que con la desinhibición de las neuronas del DMH/PeF mediante bicuculina se producen incrementos en la frecuencia cardíaca, en la actividad simpática renal (RSNA, por sus siglas en inglés) y en el tejido adiposo marrón (BAT, por sus siglas en inglés), que se traducen en aumentos de la temperatura corporal y en la presión arterial (Cao & Morrison, 2006). Aunque no se han descrito grupos de neuronas serotoninérgicas en el DMH/PeF, se especula que recibe una modulación serotoninérgica de regiones troncoencefálicas para el control de las respuestas cardiovasculares (Horiuchi et al., 2005; Bernabe et al., 2024).

El DMH/PeF también expresa neuropéptidos moduladores como la orexina y el neuropéptido Y (NPY). La orexina se ha vinculado con la activación simpática cardiovascular y conductual en contextos de estrés y vigilia (Huang et al., 2010; Wang & Kirouac, 2017; Li et al., 2018), pero también a otras funciones complementarias como el balance energético (Xia et al., 2023). El NPY, por su parte, se ha asociado con el control de la ingesta y con el ajuste autonómico en función de las demandas metabólicas, ya que su sobreexpresión genera hiperfagia y contribuye a la obesidad. En cambio, su supresión revierte estas respuestas (Yang et al., 2009). Su influencia sobre estas funciones parece deberse a un efecto inhibitorio tónico sobre la actividad simpática, que limita la termogénesis en el BAT y reduce la presión arterial y la frecuencia cardíaca (Shi et al., 2021).

De forma complementaria, el DMH/PeF cuenta con neuronas que expresan receptores de leptina y TrkB (receptores tirosina-quinasa), las cuales también participan en el control metabólico y la ingesta, pero en relación al ritmo circadiano de la alimentación

(Liao et al., 2019; Faber et al., 2021; Tang et al., 2023). La leptina contribuye, además, a los incrementos de presión arterial y frecuencia cardíaca (Marsh et al., 2003; Houtz et al., 2021). Asimismo, se han identificado grupos de neuronas colinérgicas asociadas a la regulación de la homeostasis energética (Groessl et al., 2013; Jeong et al., 2017).

3.1.4. El DMH/PeF en la respuesta de defensa

Kabat et al. (1935) demostraron por primera vez que la estimulación del hipotálamo caudal conlleva no solo un aumento de la respuesta cardiovascular, sino también de la respuesta respiratoria. Con los años, otros autores encontraron cambios neuroendocrinos y conductuales, además de otros cambios autonómicos (Eliasson et al., 1951; Abrahams et al., 1960; Rosen, 1961; Feigl, 1964; Bolme et al., 1967; Folkow et al., 1968; Dean & Coote, 1986; Yardley & Hilton, 1986; Bonham et al., 1987; Arthur et al., 1991; Markgraf et al., 1991). En mamíferos conscientes, incluido el humano, estas respuestas fisiológicas se observan ante situaciones de amenaza y estrés, tanto de forma natural como inducida por estímulos agudos (ej.: exposición a chorro de aire o un ruido intenso) (Mancia & Zanchetti, 1981; Schadt et al., 1998).

Aunque son varias las regiones hipotalámicas implicadas en la respuesta de defensa, como se ha comentado previamente, el papel del DMH/PeF (DiMicco et al., 2002; Cao et al., 2004; Horiuchi et al., 2004; McDowall et al., 2006; Díaz-Casares et al., 2009; Fortuna et al., 2009; Díaz-Casares et al., 2012; ligaya et al., 2012; López-González et al., 2013; Bondarenko et al., 2015; Sabetghadam et al., 2017; López-González et al., 2018; Brasil et al., 2020; Narai et al., 2024; Zahner et al., 2024) es tan sólido que han sido incluidos dentro de la denominada aDH (Hilton, 1982; DiMicco et al., 2002; Mcdowall et al., 2006;).

Con la activación del aDH aumenta la presión arterial, la frecuencia cardíaca, la ventilación (frecuencia respiratoria e intensidad de la actividad frénica), la actividad RSNA y la liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH). Además, se produce vasodilatación muscular, piloerección y dilatación pupilar. Todos estos cambios permiten al animal satisfacer las demandas asociadas al estrés ambiental y promover la supervivencia en condiciones de amenaza (Eliasson et al., 1951; Abrahams et al., 1960; Rosen, 1961; Hilton, 1982; Dean & Coote, 1986; Yardley & Hilton, 1986; Schadt & Hasser, 1998; Waldrop et al., 1988; McDowall et al., 2006; Fontes et al., 2011).

Aunque son conductas instintivas, la magnitud de la respuesta y su perfil hemodinámico dependen de la experiencia previa del animal con el estímulo estresante o amenazante. También depende de la interpretación subjetiva que haga de ella y la estrategia de defensa que adopte: activa (ataque, huida o *freezing*) o pasiva (inmovilidad pasiva). Las respuestas activas se acompañan de hipertensión, taquicardia y taquipnea para aumentar el flujo sanguíneo y el suministro de oxígeno a los músculos esqueléticos. Las respuestas

pasivas, por su parte, se acompañan de hipotensión, bradicardia y bradipnea. Todo ello con el objetivo de reducir las posibilidades de que su depredador le detecte o atrape (Markgraf et al., 1991; Schadt & Hasser, 1998; Bandler et al., 2000).

Inicialmente, los estudios de estimulación eléctrica que identificaron el DMH/PeF como un área crucial en la respuesta de defensa fueron cuestionados, ya que esta técnica activa los cuerpos celulares, pero también los axones de paso (Bandler, 1982; Tan & Dampney, 1983). Sin embargo, con los estudios de estimulación química mediante la microinyección de glutamato se dieron las mismas respuestas cardiorrespiratorias. Por tanto, los cambios observados tienen su origen en la activación de las neuronas localizadas en el aDH (Goodchild et al., 1982; DiMicco et al., 1986; Lipski et al., 1988; Fontes et al., 2001; DiMicco et al., 2002; Cao et al., 2004; Horiuchi et al., 2004; McDowall et al., 2006). Es probable, que la controversia encontrada en la literatura se deba a variables experimentales, como el tipo y dosis de anestesia utilizada, la concentración del neurotransmisor aplicado o la región estimulada (Lipski et al., 1988).

Aunque el DMH/PeF se ha descrito como un nodo esencial en la respuesta de defensa, no actúa de forma aislada. Diversos estudios, tanto de estimulación eléctrica como química, han demostrado que la SGP también media cambios cardiorrespiratorios y conductuales propios de una respuesta de defensa. La similitud en el patrón de respuesta sugiere que ambas estructuras forman parte de un circuito funcional común que debe considerarse (Hilton & Redfern, 1986; Carrive & Bandler, 1991).

3.1.5. Relación entre el DMH/PeF y la SGP

De las múltiples conexiones que el DMH/PeF establece con las diversas regiones cerebrales recientemente descritas, las proyecciones desde y hacia la SGP se destacan como unas de las más importantes en la mediación de la respuesta cardiorrespiratoria frente al estrés (Thompson & Swanson, 1998; Horiuchi et al., 2009; Motta et al., 2009; Benarroch, 2012; Dampney, 2015; Trevizan-Baú et al., 2021a; Schottelkotte & Crone, 2022). Para entender mejor esta interacción, es necesario profundizar en el papel y las funciones específicas de la SGP en la respuesta de defensa, así como su relación funcional con el DMH/PeF y sus conexiones con estructuras prosencefálicas y troncoencefálicas, comunes a esta región hipotalámica.

La SGP en la respuesta de defensa y regulación autonómica

La SGP es una estructura mesencefálica que rodea el acueducto de Silvio y desempeña un papel clave en la regulación de respuestas autonómicas y conductuales asociadas a la respuesta de defensa (Bandler et al., 2000; Benarroch, 2012; Dampney et al., 2013; Deng et al., 2016). Esta región interviene en una amplia variedad de respuestas cardiorrespiratorias, motoras y nociceptivas (Mortensen et al., 1994; Bandler et al., 2000;

Keay & Bandler, 2001; Linnman et al., 2012; Dampney, 2016; Motta et al., 2017; Klingbeil et al., 2021; Vazquez-Leon et al., 2023; Zhang et al., 2024). Además, participa en procesos fisiológicos como la termorregulación, la micción, la defecación, los mecanismos de sueño y vigilia y la presión subglótica (Holstege, 2005; de Menezes et al., 2009; Kuner & Kuner, 2021; Subramanian et al., 2021; González-García et al. 2024c).

Está compuesta por grupos de neuronas organizadas en cuatro columnas longitudinales o subdivisiones a lo largo de todo su eje rostrocaudal. Estas forman la SGPI, la SGPdl, la SGP ventrolateral (SGPvl) y la SGP dorsal (SGPd). Cada una de estas columnas son química y funcionalmente diferentes, además de presentar diferencias en su conectividad (Carrive, 1993; Bandler et al., 2000; Keay & Bandler, 2001; Vianna & Brandao, 2003; Heinricher et al., 2009). Mientras que la SGPI y la SGPdl coordinan respuestas de lucha, huida o *freezing* (enfrentamiento activo), caracterizadas por aumentos de la función cardiorrespiratoria (Bandler et al., 2000; Linnman et al., 2012; Faull et al., 2019; López-González et al., 2020; González-García et al., 2024c), la SGPvl regula la respuesta de inmovilidad (enfrentamiento pasivo), caracterizadas por hipotensión, bradicardia y bradipnea (Figura 3) (Hermans et al., 2013; Motta et al., 2017).

La participación de la SGPdl en la respuesta de defensa ha sido confirmada mediante estudios de lesiones citotóxicas o inhibición farmacogenética. Estas intervenciones han demostrado que la integridad de esta región es crucial para la correcta expresión de la reacción de defensa, ya que reducen dichas respuestas (Gross & Canteras, 2012; Tsang et al., 2023).

Interconexión funcional entre el DMH/PeF y la SGP

Aunque la SGP regula diversas respuestas fisiológicas relacionadas con la supervivencia, como el dolor, la defecación y la micción, destaca su participación en la regulación de la función cardiorrespiratoria. Estas respuestas se asemejan a las observadas tras la estimulación del DMH/PeF (Hilton & Redfern, 1986; Yardley & Hilton, 1986). Esta similitud se debe, en parte, a las conexiones bidireccionales entre la SGPdl y el DMH/PeF y a la interdependencia funcional existente entre ambas (Figura 3).

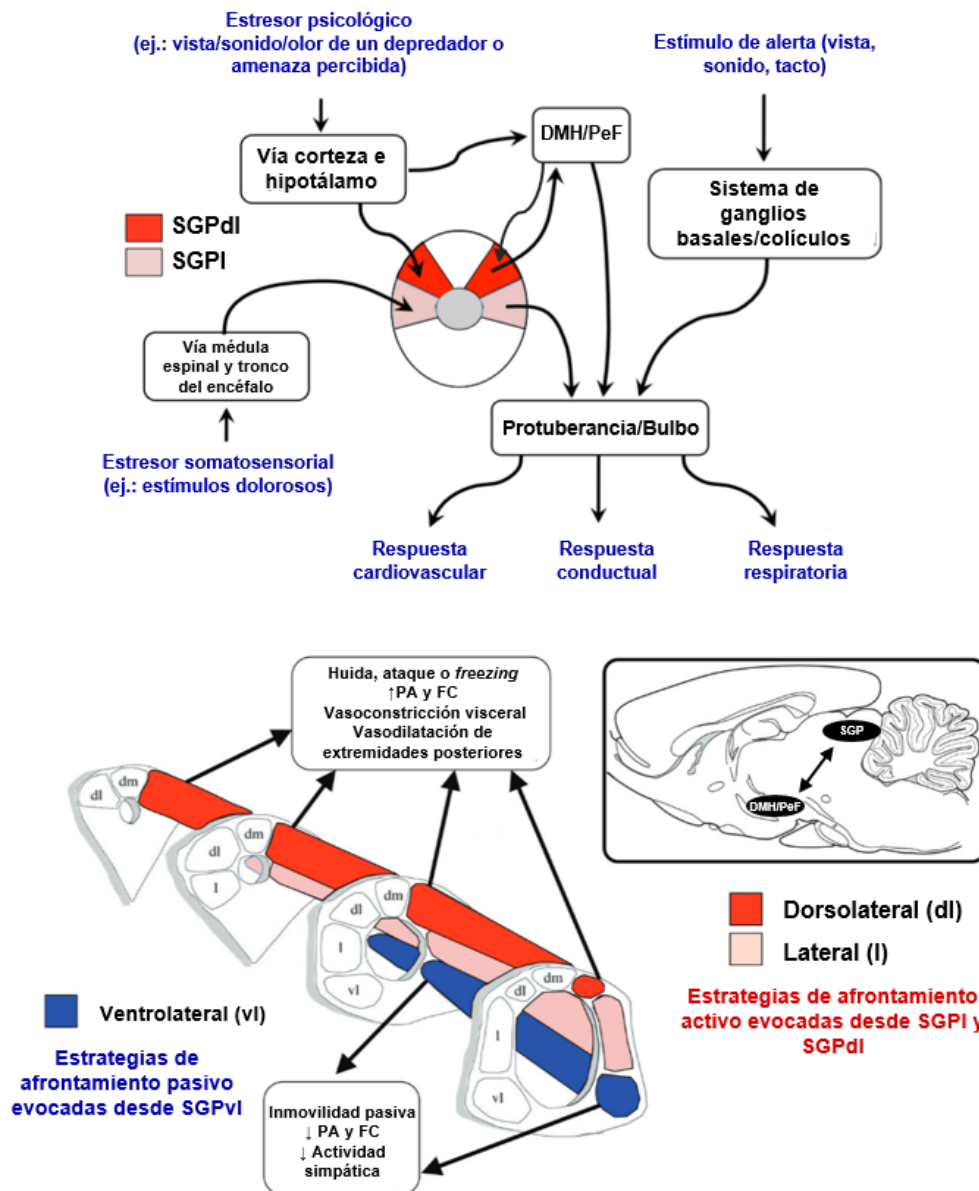
Ambas regiones han sido consideradas centrales en el control de la respuesta de defensa (Dampney, 2015). Sin embargo, ninguna de ellas parece funcionar de manera independiente. La inhibición farmacológica del DMH/PeF suprime, por ejemplo, las respuestas cardiorrespiratorias desencadenadas por la activación de la SGPdl (de Menezes et al., 2009; Horiuchi et al., 2009). De manera similar, la microinyección de muscimol en la SGPdl atenúa los aumentos de la frecuencia cardíaca y la presión arterial inducidos por la estimulación del DMH/PeF (de Menezes et al., 2006).

Además, como se adelantaba en apartados anteriores, la SGPdl modula la actividad de los grupos celulares del BVLr, encargados de regular la presión arterial, indirectamente a través de su interacción con el DMH/PeF (de Menezes et al., 2009; Horiuchi et al., 2009) y sus conexiones con el cPB y A5 (Farley et al., 1992; Hayward et al., 2004; López-González et al., 2020; González-García et al., 2023).

Para regular la respuesta taquicardizante, se cree que el DMH/PeF emplea tanto vías directas como indirectas, a través de la SGP, para influir en la actividad del RP y modular así el ritmo cardíaco (Samuels et al., 2002; da Silva et al., 2003; Cao et al., 2004; Horiuchi et al., 2004; de Menezes et al., 2006). Todas estas interacciones no solo reflejan la compleja relación entre el DMH/PeF y la SGP, sino también la relación de ambas con otras regiones cerebrales que parecen ser comunes.

Figura 3

Organización funcional de la SGP y sus conexiones con el DMH/PeF



Nota. Dibujo esquemático que muestra el papel de las columnas de la SGP en la respuesta de defensa y su interacción con el DMH/PeF. Los estresores activan distintas subregiones de la SGP: las columnas dorsolateral y lateral generan estrategias de afrontamiento activo; la columna ventrolateral media estrategias de afrontamiento pasivo. Las señales procesadas en la SGP convergen hacia la protuberancia/bulbo. Adaptado de *Central neural control of the cardiovascular system: Current perspectives*, por R. A. Dampney, 2016, *Advances in Physiology Education*, 40(3), 283–296. <https://doi.org/10.1152/advan.00027.2016>; y de *Central mechanisms regulating coordinated cardiovascular and respiratory function during stress and arousal*, por R. A. Dampney, 2015, *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 309(5), R429–R443. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00051.2015>

Conexiones compartidas entre el DMH/PeF y la SGP

Al igual que el DMH/PeF, la SGP establece una extensa red de conexiones con estructuras del prosencéfalo, la protuberancia y el bulbo, a través de las que integra y coordina tanto respuestas de afrontamiento activo como pasivo frente a estímulos externos e internos. La SGP cuenta con numerosas proyecciones bidireccionales con estructuras corticales y subcorticales tales como la corteza prefrontal, el córtex cingulado, el sistema límbico, la amígdala, los ganglios de la base y otras regiones hipotalámicas diferentes del DMH/PeF (Yeziarski, 1988; Herbert & Saper, 1992; Krout & Loewy, 2000; Gabbott et al., 2005; Subramanian et al., 2008; Subramanian & Holstege, 2009; Benarroch, 2012; Faull et al., 2019; Lavezzi et al., 2021; Trevizan-Baú et al., 2021a; Schottelkotte & Crone, 2022; González-García et al., 2023).

La similitud en el patrón de respuesta cardiorrespiratoria entre el DMH/PeF y la SGP se ve reforzada por una conectividad compartida entre ambas estructuras, que se extiende a nivel troncoencefálico. La SGP intercambia señales con diferentes regiones a través de las que modula la frecuencia cardíaca, la frecuencia respiratoria y la presión arterial, por ejemplo, el cPB (Bianchi et al., 1998; Krout et al., 1998), el KF (Yang & Feldman, 2018; Trevizan-Bau et al., 2021b), el A5 (López-González, 2020; González-García, 2023; Rocha et al., 2024) y el NTS (Herbert & Saper, 1992; VanderHorst et al., 2000; Kawai, 2018; Chen et al., 2021).

Además de estas regiones compartidas, la SGPdl cuenta con proyecciones hacia otros centros bulbopontinos, tales como los complejos pre-Bötzing (pre-BötC) y Bötzing (BötC), el locus coeruleus (LC) (Luppi et al., 1995; Schwarz et al., 2015), el núcleo parafacial lateral (Yang & Feldman, 2018; Biancardi et al., 2021; Trevizan-Bau et al., 2021b) y el complejo postinspiratorio (PiCo) (Oliveira et al., 2021). Estos núcleos, junto a los anteriormente descritos, permiten a la SGPdl mediar no solo las respuestas cardiorrespiratorias asociadas a la reacción de defensa, sino también las respuestas respiratorias asociadas a la vocalización.

La SGP en la vocalización

El papel de la SGP en la vocalización ha sido ampliamente reconocido en modelos animales y humanos, donde lesiones bilaterales en esta estructura producen mutismo (Jürgens, 1994; Esposito et al., 1999; Jürgens, 2002a; Kittelberger et al., 2006; Jürgens, 2009), y su estimulación eléctrica o química provoca la emisión de sonidos (Bandler & Carrive, 1988; Schuller & Radtke-Schuller, 1990). La actividad de la SGP se asocia, especialmente, con vocalizaciones de carácter emocional e involuntario, como la risa, el llanto, los gruñidos o los chillidos (Holstege & Subramanian, 2016).

En muchos animales, estas vocalizaciones se han observado en contextos que implican una activación de la respuesta de defensa, en los que debe existir una correcta coordinación entre el patrón respiratorio y el fonatorio (Tschida et al., 2019; Zhang et al., 2024). Ante una situación de amenaza, la respiración tranquila (eupnea) modifica su frecuencia y profundidad para incrementar el aporte de oxígeno al cerebro y a los órganos clave en las conductas de afrontamiento activo. Sin embargo, aunque se prioriza la ventilación, en determinadas situaciones, la respiración puede adaptarse a la producción vocal por la acción de circuitos bulbopontinos que sincronizan ambas funciones (Krohn et al., 2023; Veerakumar & Krasnow, 2023; Park et al., 2024; Prostebby et al., 2025). De esta manera, se garantiza tanto una respuesta fisiológica para la acción como la emisión de sonidos defensivos, que intimidan a los depredadores (Zhang et al., 2024). Estas vocalizaciones no dependen de la activación de áreas corticales motoras (Holstege & Subramanian, 2016), sino que se generan gracias a las proyecciones de la SGP hacia los diferentes centros bulbopontinos descritos anteriormente y a sus conexiones con estructuras como el sistema límbico, los ganglios de la base (Wild et al., 2003; Klingbeil et al., 2021), la amígdala (Jürgens et al., 1967), el BSTN y la corteza cingulada anterior (Jürgens, 2002b).

El papel coordinador de la SGPdl en esta función se debe a su interacción funcional con el nA, probablemente mediado por vías indirectas a través del nRA (Shiba et al., 1997; Vanderhorst et al., 2000; Boers et al., 2002; Subramanian & Holstege, 2009; Park et al., 2024). Esta participación de la SGPdl en la producción vocal ha sido corroborada no solo por otros autores, sino también recientemente por nuestro grupo de investigación. En ratas anestesiadas, hemos observado que la estimulación de la SGPdl induce la expresión de c-Fos en los dominios compacto y laxo del nA, lo que refleja activación neuronal. Esto se ha asociado con una disminución de la presión subglótica debido a un aumento de la apertura de la glotis (González-García et al., 2024a, 2024c).

La posición de los pliegues vocales regula directamente la presión subglótica. Mientras que el cierre la incrementa, su apertura la disminuye, modulando así el flujo de aire y la calidad vocal (Holstege et al., 2016). Además, hemos observado expresión de la proteína Foxp2 en los dominios semicompacto y laxo, hallazgo que respalda la participación del nA en el control vocal fino (Shu et al., 2005; Haesler et al., 2007; González-García et al., 2024a, 2024c). La SGPdl no parece ser la única región que participa en esta función. Otros estudios de nuestro equipo de investigación han demostrado que el cPB-KF y la región A5 influyen sobre la resistencia laríngea, al modular la actividad de las motoneuronas laríngeas del nA (Lara et al., 2002). Estas mismas regiones son fundamentales en la regulación de las respuestas cardiorrespiratorias y dependen de la actividad glutamatérgica no solo de la SGP, sino también del DMH/PeF (Díaz-Casares et al., 2009; Díaz-Casares et al., 2012; López-González et al., 2013; López-González et al., 2018; López-González et al., 2020; González-García et al., 2023).

Estos hallazgos sugieren que la SGPdl y el DMH/PeF comparten conectividad con centros de control cardiorrespiratorio y actúan de manera interdependiente en la generación de respuestas adaptativas al estrés. Esta interconexión funcional plantea la posibilidad de que el DMH/PeF, además de su papel bien establecido en la activación simpática y la regulación cardiorrespiratoria, podría participar también en la modulación de la actividad laríngea. En este contexto, resulta pertinente cuestionarse si en la literatura existe evidencia que relacione específicamente al DMH/PeF con el control fonorrespiratorio y, sobre todo, si está conectado anatómicamente y funcionalmente con el nA.

3.2. Papel del DMH/PeF en el control central de la actividad fonorrespiratoria

3.2.1. Base anatómica-funcional de la respiración en la producción vocal

La producción vocal constituye un proceso complejo que requiere la coordinación de los sistemas respiratorio, fonatorio y articulatorio. Aunque se han logrado avances significativos en la comprensión de la vocalización, aún queda por esclarecer cómo se sincronizan la respiración y la producción vocal, así como los circuitos neuronales corticales y subcorticales que facilitan esta coordinación (Correia et al., 2020; González-García et al., 2024b; Park et al., 2024; Di Pasquasio et al., 2025). El control neural de la vocalización ha sido descrito clásicamente bajo un modelo jerárquico de tres niveles funcionales, cuya organización puede abordarse en dirección descendente desde el hipotálamo hacia estructuras más caudales (Jürgens, 1979).

Aunque modelos posteriores de Jürgens han incorporado la corteza motora como estructura perteneciente a una vía corticobulbar paralela que explica el control volitivo de la producción vocal (Jürgens, 2002a; Jürgens, 2002b; 2009), en este trabajo nos centramos en el modelo jerárquico clásico debido a nuestro interés por los mecanismos subcorticales implicados en la vocalización no-volitiva. En este esquema clásico, el nivel más rostral está conformado por estructuras del prosencéfalo, como el hipotálamo, que modula la vocalización en función del estado emocional y del contexto. El segundo nivel incluye a la SGP, que se encarga de acoplar el componente emocional con patrones vocales específicos. Finalmente, el nivel más caudal está formado por el nA y el nRA, núcleos motores bulbares que generan la respuesta laringo-respiratoria final (Jürgens, 1979). Con el paso del tiempo, además de estas estructuras, se han incorporado otros centros respiratorios bulbopontinos que median el ritmo respiratorio y determinan la coordinación fonorrespiratoria (Krohn et al., 2023; González-García et al., 2024b).

La interacción entre estas estructuras es esencial para que se generen las tres fases fisiológicas de la respiración, que permiten la transición coordinada entre la fase inspiratoria a la espiratoria (Smith et al., 2013; Feldman et al., 2013; Toor et al., 2019; Molkov et al., 2017; Del Negro et al., 2018) (Figura 4). Durante la fase inspiratoria se produce la entrada de aire en los pulmones, fundamentalmente, como consecuencia de la activación del diafragma, aunque también participan los intercostales externos. En situaciones que requieren un mayor esfuerzo inspiratorio, se utilizan adicionalmente los músculos intercostales paraesternales, esternocleidomastoideos y escalenos (De Troyer et al., 2005; Torres-Tamayo et al., 2018; Welch et al., 2019; LoMauro & Aliverti, 2021). Además, en esta fase tiene lugar la contracción del músculo geniogloso, que contribuye a reducir la resistencia orofaríngea, junto con la activación de los músculos abductores laríngeos,

responsables de la dilatación del espacio glótico (Harding et al., 1980; Samson et al., 2007; Wang et al., 2018).

La espiración se divide en dos fases distintas: la postinspiración (fase E1) y la espiración tardía (fase E2) (Richter & Smith, 2014). Esta caracterización de la respiración fue establecida por primera vez por Richter et al., (1986) y ha sido corroborada y aceptada durante décadas por otros autores (Anderson & Ramirez, 2017; Morgado-Valle & Beltrán-Parrazal, 2017; Garcia et al., 2019; Ramirez & Baertsch, 2019).

En el caso de la postinspiración o fase E1 el diafragma se mantiene contraído y se relaja progresivamente, mientras que los músculos aductores laríngeos generan una constricción glótica parcial (Paton & Dutschmann, 2002; Dutschmann et al., 2014; Wang et al., 2018). Al mismo tiempo, el músculo geniogloso se relaja favoreciendo el contacto con el paladar blando y el consiguiente incremento de la resistencia orofaríngea (Fregosi & Fuller, 1997). Estos aumentos en la resistencia orofaríngea y laríngea permiten que la transición hacia la fase E2 de la espiración sea más lenta y suave y que el control del flujo de aire espirado sea más preciso y fino (Watson et al., 2012; Salomoni et al., 2016).

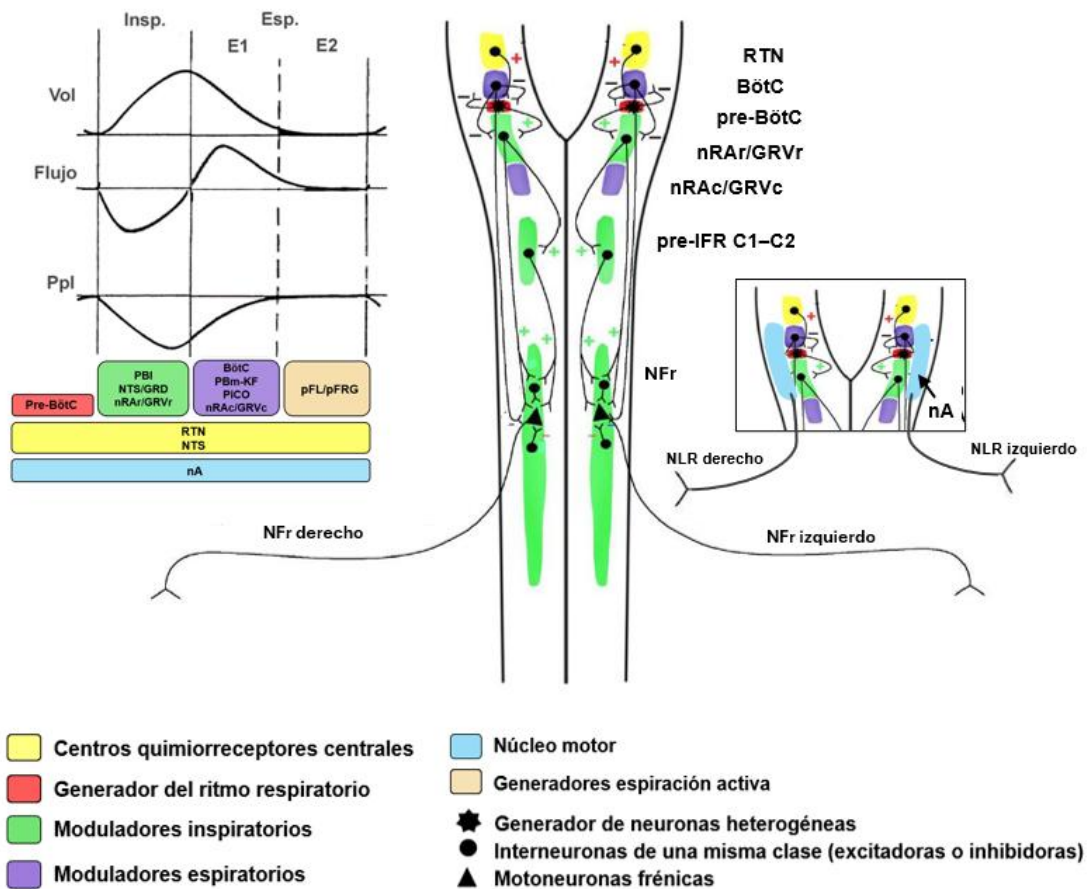
Además, durante la espiración E1 se produce la vocalización, ya que el flujo de aire de salida atraviesa la glotis estrechada. En este caso, la espiración es activa y para generar una presión intrabdominal e intratorácica efectiva es necesario que tanto el diafragma como los músculos intercostales externos e internos y los músculos abdominales transversos se activen (De Troyer et al., 2005; Subramanian & Holstege, 2011; Mortola, 2013; Pitts et al., 2015; Bellani et al., 2018; Welch et al., 2019; Moreira et al., 2025).

La espiración tardía o fase E2 corresponde a una fase de la respiración que, en condiciones de eupnea, no presenta una actividad muscular significativa, de modo que la salida del flujo aéreo se produce de forma pasiva como consecuencia del retroceso elástico pulmonar (Klages et al., 1993; Jenkin et al., 2017). Durante esta fase, la resistencia laríngea es menor, ya que la glotis se encuentra más abierta que en la fase E1, permitiendo que el flujo espiratorio descienda hasta valores cercanos a cero. Sin embargo, la espiración tardía puede volverse activa en condiciones en las que la demanda ventilatoria es mayor como durante el ejercicio, la tos y la vocalización sostenida. En este tipo de vocalizaciones, no solo interviene la fase final de la E1, sino también el inicio de la E2 (Molkov et al., 2014; Zoccal et al., 2018; Pozzi et al., 2022).

En conjunto, la coordinación entre las diferentes fases respiratorias permite tener un control preciso del flujo de aire necesario para la producción vocal. Asimismo, la acción conjunta de los músculos respiratorios, laríngeos y orofaríngeos asegura la generación de sonidos, pero también determina la intensidad, tono y duración de las vocalizaciones.

Figura 4

Ciclo respiratorio y estructuras bulbopontinas implicadas



Nota. A la izquierda se representan las fases inspiratoria (Insp.), postinspiratoria (E1) y espiratoria tardía (E2), junto con los núcleos bulbopontinos predominantes en cada una. La funcionalidad de cada núcleo —generador, modulador o motor— se indica mediante los colores señalados en la leyenda. En el centro se muestran las proyecciones descendentes hacia el nervio frénico (NFr), responsables de activar la musculatura inspiratoria. A la derecha se representa las proyecciones descendentes del núcleo ambiguo (nA) hacia el nervio laríngeo recurrente (NLR), esenciales para el control laríngeo durante la respiración. Los símbolos “+” y “-” indican proyecciones excitatorias e inhibitorias. Abreviaturas: BötC: complejo Bötzing; GRD: grupo respiratorio dorsal; GRVc: grupo respiratorio ventral caudal; GRVr: grupo respiratorio ventral rostral; KF: Kölliker-Fuse; nA: núcleo ambiguo; nRAc: núcleo retroambiguo caudal; nRAR: retroambiguo rostral; NFr: nervio frénico; NLR: nervio laríngeo recurrente; RTN: núcleo retrotrapezoide; NTS: núcleo del tracto solitario; PBm: parabraquial medial; PiCo: complejo postinspiratorio; pFL/pFRG: núcleo parafacial lateral/grupo respiratorio parafacial; pre-BötC: complejo pre-Bötzing. Adaptado de *Respiratory rhythm generation and pattern formation: Oscillators and network mechanisms*, por M. G. Z. Ghali, 2019, *Journal of Integrative Neuroscience*, 18(4), 481–517. <https://doi.org/10.31083/j.jin.2019.04.188>

3.2.2. El DMH/PeF como nodo modulador de la actividad fonorrespiratoria

Históricamente, el hipotálamo ha sido reconocido por su papel en la regulación de funciones autonómicas, endocrinas y comportamentales básicas. No obstante, existen evidencias que sugieren que participa también en la producción vocal, aunque esta función ha sido poco explorada y se apoya en estudios clásicos. Investigaciones pioneras realizadas por Magoun et al. (1937) y Kanai y Wang (1962) demostraron que la estimulación eléctrica de diversas regiones hipotalámicas, entre ellas el DMH, es capaz de generar vocalizaciones (gruñidos, silbidos y gritos) que se dan junto a respuestas fisiológicas de ira o defensa, como hipertensión, piloerección y movimientos bruscos de la cola entre otras (Altafullah et al., 1988).

Estudios posteriores han descrito que el hipotálamo media un espectro más amplio de vocalizaciones, que incluye emisiones de naturaleza menos reactivas o emocionales y que parece depender de la región hipotalámica que se active (Altafullah et al., 1988). Esta producción de sonidos complejos en ausencia de conductas de ira o alerta es consistente con lo observado en estudios realizados en primates y otros mamíferos no humanos (Jürgens et al., 1967; Winter et al., 1973; Jürgens, 1974, 1976; Jürgens & Müller-Preuss, 1977; Jürgens, 1979).

En el modelo jerárquico de control vocal propuesto por Jürgens (1979), el DMH/PeF parece no ser estrictamente necesario para la generación de sonidos, pero sí desempeña un papel clave en su modulación emocional. De hecho, se ha demostrado que las lesiones en el hipotálamo no suprimen completamente la vocalización espontánea en gatos, aunque pueden alterar su componente emocional (Fernández de Molina & Hunsperger, 1962; Hilton & Zbrozyna, 1963). En cambio, se observa mutismo total cuando la lesión se da en la SGP (Adametz & O'Leary, 1959). Estos hallazgos han conducido a que gran parte de la atención se haya centrado en la SGP como centro integrador esencial para la producción vocal, mientras que el papel del DMH/PeF en la vocalización ha sido poco estudiado desde entonces.

En apartados anteriores hemos descrito conexiones del DMH/PeF con las diferentes regiones troncoencefálicas a través de las cuales regula la respuesta cardiorrespiratoria en contextos como el estrés o las respuestas de defensa (Fulwiler & Saper et al., 1984; ter Horst & Luiten, 1986; Silva-Carvalho et al., 1995a; Silva-Carvalho et al., 1995b; Dawid-Milner et al., 2003; Panneton et al., 2006; Kanbar et al., 2007; Díaz-Casares et al., 2009; Tan et al., 2010; Díaz-Casares et al., 2012; Koshiya et al., 2014; Papp & Palkovits, 2014; Yokota et al., 2016; Yang & Feldman, 2018; Zhang et al., 2018; Biancardi et al., 2021; Trevizan-Baú et al., 2021a; Krohn et al., 2023). Sin embargo, estas mismas estructuras no solo participan en la integración autonómica, sino también en la generación y modulación del ritmo respiratorio vinculado a la producción vocal (Del Negro et al., 2018). Por todo ello, resulta necesario

profundizar en la relación del DMH/PeF con los centros laringo-respiratorios bulbopontinos, sobre todo, con el nA, para comprender el papel del DMH/PeF en la coordinación fonorrespiratoria.

3.2.3. Conexiones del DMH/PeF con los grupos respiratorios bulbopontinos

En el estudio de la función respiratoria, el tronco del encéfalo puede organizarse en varios grupos funcionales: GRP, PiCo, grupo respiratorio parafacial (GRpF), GRD y columna respiratoria ventral (Schottelkotte & Crone, 2022; Krohn et al., 2023; González-García et al., 2024b). Debido a que las posibles proyecciones desde DMH/PeF hacia el PiCo o el GRpF no están firmemente establecidas, en los siguientes apartados se describe el papel del DMH/PeF en relación exclusivamente con los principales núcleos pertenecientes al GRP, GRD y la columna respiratoria ventral (Schottelkotte & Crone, 2022, Moreira et al., 2025).

3.2.3.1. Grupo Respiratorio Pontino

El GRP es una región de la protuberancia, formada por el cPB y el núcleo KF. La regulación del ritmo respiratorio está mediada, principalmente, por la región más caudal del tronco del encéfalo. Sin embargo, estas estructuras pontinas también son esenciales para ello (Anderson & Ramírez, 2017), puesto que integran señales desde y hacia otros núcleos respiratorios distribuidos a lo largo de toda la red respiratoria troncoencefálica y, en especial, los ubicados a nivel bulbar (Dhingra et al., 2019; Dhingra et al., 2020).

3.2.3.1.1. Complejo Parabraquial

El cPB no solo participa en el control cardiorrespiratorio mediado por el DMH/PeF (Fulwiler & Saper, 1984), sino que también regula la respiración vinculada a la vocalización y tiene un control directo sobre el calibre laríngeo (Lara et al., 2002). Para ello, el cPB interacciona con la SGP y actúa como núcleo de relevo proyectando hacia la corteza motora laríngea y el nA, para el control motor de la laringe (Farley, 1992; Geerling et al. 2017). El papel del cPB en este proceso se ha visto reforzado por estudios que muestran que sus neuronas se activan durante la vocalización y expresan, además, el factor de transcripción *Foxp2* (Stanić et al., 2018; Kaur et al., 2024).

Aunque todas las subdivisiones del cPB median la duración de las fases de la respiración y modulan el calibre laríngeo, los efectos que ejercen son diferentes (von Euler et al., 1976; Lara et al., 2002; Zuperku et al., 2017). La activación del PBI genera una dilatación glótica, que reduce la resistencia laríngea. Esta respuesta se da junto a una facilitación inspiratoria y cambios cardiovasculares, caracterizados por hipertensión y taquicardia. Por el contrario, el PBM al igual que el A5 se asocia con aumentos de la resistencia laríngea por aducción de las cuerdas vocales. Estos cambios se acompañan de

una facilitación espiratoria y ajustes cardiovasculares similares a los inducidos por la activación del PBI (Lara et al., 2002).

El PBm regula la duración de la espiración e inicio de la inspiración, ejerciendo influencia tanto excitatoria como inhibitoria sobre los centros respiratorios bulbares. Más concretamente, acorta el tiempo espiratorio mediante señales inhibitorias que envía hacia las neuronas espiratorias del complejo BötC. Al mismo tiempo, facilita el inicio de la inspiración a través de señales excitatorias que alcanzan las neuronas inspiratorias y, especialmente, las preinspiratorias del pre-BötC. Además, genera un aumento de la actividad inspiratoria en forma de rampa que permite la contracción controlada y gradual del diafragma. Este balance de señales inhibitorias y excitadoras contribuye a que haya una transición eficiente entre las diferentes fases respiratorias (Zuperku et al., 2017).

Tanto el PBI como el PBm modulan el ritmo respiratorio gracias a su compleja red de conexiones con núcleos bulbares y suprabulbares. Entre ellas, destacan las conexiones con la SGP, los complejos pre-BötC y BötC (Tan et al., 2010; Yang & Feldman, 2018; Zuperku et al., 2019; Yang et al., 2020; Yu et al., 2022), el núcleo KF (Song et al., 2012; Geerling et al., 2017), el núcleo retrotrapezoide (Bochorishvili et al., 2012; Silva et al., 2016), el LC (Yang et al., 2021; Liu et al., 2021), el BNST (Shin et al., 2008; Bienkowski & Rinaman, 2013; Ni et al., 2016; Luskin et al., 2021), la amígdala central (Tokita et al., 2010; Bienkowski & Rinaman, 2013; Yang et al., 2021;), el nA (Rübsamen & Schweizer, 1986) y el NTS (Bianchi et al., 1998; McGovern et al., 2015).

Dada la implicación del cPB en el control laríngeo y su conectividad con múltiples núcleos comunes al DMH/PeF, este último podría, a través de estas mismas conexiones, no solo regular la respuesta cardiorrespiratoria autonómica, sino también la respiración vinculada a la producción vocal.

3.2.3.1.2. Núcleo Kölliker-Fuse

El núcleo KF constituye una estructura dentro del cPB que desempeña un papel clave en la regulación de la función respiratoria. Se considera que este núcleo es el componente principal del denominado "*grupo respiratorio pontino*", debido a su predominante contribución en la actividad rítmica respiratoria en comparación con otros núcleos del cPB (Caille et al., 1981; Ezure & Tanaka, 2006; Damasceno et al., 2014; Zuperku et al., 2017; Dutschmann et al., 2021; Varga et al., 2021). Aunque para ello trabaja con el núcleo PBm, a diferencia de este, la mayoría de sus neuronas son inspiratorias y de fase (Song et al., 2006).

Estas neuronas modulan la respiración, prolongando la fase inspiratoria más de lo habitual, fenómeno conocido como *apneusis*. Este patrón de respiración está vinculado al concepto de "*apagado inspiratorio*", que implica una descarga prolongada del nervio frénico

y ausencia de descarga postinspiratoria del nervio vago (Dutschmann & Herbert, 2006; Bonis et al., 2010; Dutschmann & Dick, 2012; Levitt et al., 2015). Estos hallazgos, junto a los encontrados por otros autores, apoyan la idea de que, dentro de la ritmogénesis, el papel del KF es poner fin a la fase inspiratoria para dar paso a la postinspiración (Ezure & Tanaka, 2006; Dutschmann et al., 2021).

Asimismo, se ha demostrado que la inhibición del KF conlleva una disminución de la frecuencia respiratoria (Dutschmann & Herbert, 2006; Bautista & Dutschmann, 2014) y se ha propuesto que sus eferencias hacia neuronas preinspiratorias ritmogénicas en el pre-BötC y el GRpF determinan la frecuencia y el patrón del ritmo respiratorio. No obstante, el hecho de que la inhibición del KF reduzca la frecuencia respiratoria, sin abolirla por completo, plantea dudas acerca de la existencia de neuronas intrínsecamente ritmogénicas en este núcleo. Estos datos sugieren que el KF no genera directamente el ritmo respiratorio, sino que influye y modula los grupos neuronales que lo producen (Jones et al., 2016; Dutschmann et al., 2021).

El KF modula tanto la frecuencia como el patrón respiratorio a través de sus conexiones aferentes y eferentes con numerosas estructuras entre las que se encuentran el DMH/PeF (Panneton et al., 2006; Yokota et al., 2016), la SGP, el NTS (Herbert et al., 1990; Song et al., 2012; McGovern et al., 2015; Geerling et al., 2017; Trevizan-Baú et al., 2021b), el pre-BötC, el BötC (Tan et al., 2010; Yang & Feldman, 2018; Yang et al., 2020), el grupo respiratorio ventral rostral (GRVr), el grupo respiratorio ventral caudal (GRVc), el cPB, el PiCo y el núcleo parafacial lateral (Song et al., 2012; Jones et al., 2016; Geerling et al., 2017; Biancardi et al., 2021; Oliveira et al., 2021).

Por otro lado, el KF desempeña un papel importante en la permeabilidad de la faringe y en la coordinación de los movimientos de la musculatura lingual, laríngea, facial y nasal durante actividades respiratorias más complejas como la deglución (Bonis et al., 2011; Bonis et al., 2013) y la vocalización (Dutschmann et al., 2006; Dutschmann et al., 2008). Esto puede explicarse por su capacidad para modular la actividad de los nervios hipogloso (Dutschmann & Dick, 2012; Bautista & Dutschmann, 2014; Dutschmann et al., 2021), frénico, vago y facial (Ellenberger et al., 1990; Yokota et al., 2007). Además, se ha descrito que el KF también contribuye tanto al cierre glótico reflejo como voluntario (Dutschmann et al., 2006; Poliacek et al., 2007; Jakus et al., 2008; Bautista & Dutschmann, 2014) mediante una población de neuronas premotoras aductoras laríngeas (Dutschmann & Herbert, 2006; Dutschmann & Dick, 2012) y que proyectan hacia el nA (Núñez-Abades et al., 1990; Yokota et al., 2015). En este sentido, y de acuerdo con estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, la activación del KF induce una constricción laríngea que se asocia a una facilitación espiratoria similar a los cambios del calibre laríngeo inducido por la activación del

PBm y A5 (Lara et al., 2002). También se han identificado grupos de neuronas en el KF que expresan Foxp2 (Geerling et al., 2017; Kaur et al., 2024).

La vinculación del KF con el nA y las conexiones recíprocas entre KF y DMH/PeF (Núñez-Abades et al., 1990; Panneton et al., 2006; Yokota et al., 2016), así como la amplia red de núcleos que comparten, refuerzan una vez más la posible influencia del DMH/PeF en la actividad respiratoria vinculada a la vocalización.

3.2.3.2. Grupo Respiratorio Dorsal

El GRD es una estructura neuroanatómica clave en la función respiratoria que se localiza en la porción ventrolateral del NTS. Se trata de un grupo de neuronas inspiratorias con actividad rítmica que contribuyen a la generación de la inspiración, incluso en ausencia de aferencias sensoriales. En gato, un porcentaje elevado de las neuronas del GRD establece conexiones excitatorias monosinápticas con el núcleo frénico, lo que resulta crucial para el control motor de la respiración (Fedorko et al., 1983). Sin embargo, en otras especies, como la rata, esta relación es menos pronunciada (de Castro et al., 1994). Estas diferencias ponen de manifiesto las variaciones interespecies en la organización y el funcionamiento del GRD.

Además de su implicación en la inspiración, el GRD participa en la mediación de reflejos respiratorios complejos, ya que recibe entradas sensoriales de los nervios vago y glossofaríngeo, que transmiten información proveniente de los pulmones y la caja torácica (Berger, 1977). A partir de la información procedente de los mecanorreceptores y quimiorreceptores ajusta los patrones rítmicos de activación neuronal en función de la insuflación pulmonar y los niveles de O₂ y CO₂ en sangre. De esta manera, coordina la contracción entre el diafragma y otros músculos respiratorios (Kubin et al., 2006; Zoccal et al., 2014; Gasparini et al., 2020; Schottelkotte et al., 2022).

Como se ha descrito anteriormente, el DMH/PeF proyecta hacia el NTS para modular los circuitos involucrados en los reflejos barorreceptor y quimiorreceptor (Silva-Carvalho et al., 1995a; Silva-Carvalho et al., 1995b; Kanbar et al., 2007; Krohn et al., 2023). Sin embargo, la interacción de ambos parece ir más allá, pues la respuesta cardiorrespiratoria inducida por la estimulación del aDH incluye también una facilitación del reflejo laríngeo apneico. Para ello, el aDH activa receptores GABAA en interneuronas inhibitorias del NTS, a través de las que modula la señal de las aferencias laríngeas (Dawid-Milner et al., 1995). El papel del NTS en la respiración y en la actividad laríngea se ha visto reforzado recientemente por estudios que demuestran la expresión del factor de transcripción Foxp2 en este núcleo en diferentes especies, incluidos roedores y humanos (Vallin et al., 2025).

3.2.3.3. Columna Respiratoria Ventral

La columna respiratoria ventral constituye una estructura anatómico-funcional del bulbo raquídeo, que se extiende desde la porción caudal del núcleo facial la médula espinal cervical rostral. Está formada por varios grupos neuronales organizados en diferentes núcleos (complejo pre-BötC, BötC y nRA), que se describen a continuación (Smith et al., 2009).

3.2.3.3.1. Complejo Pre-Bötzinger

El pre-BötC ha sido identificado como el principal generador del ritmo respiratorio (Sherman et al., 2015; Cui et al., 2016; Huff et al., 2022; Park et al., 2024). En roedores, esta estructura parece contener una red de aproximadamente 3000 neuronas por cada hemisferio (Wallén-Mackenzie et al., 2006; Tan et al., 2008; Yackle et al., 2017), que se activan de manera rítmica e inician la inspiración (Schwarzacher et al., 2011; Ashhad & Feldman, 2020; Dhingra et al., 2020).

Las microinyecciones de agonistas de glutamato en esta región inducen respuestas taquipnéicas, lo que se correlaciona con una mayor descarga del nervio frénico (Zuperku et al., 2019). Además, una característica distintiva del pre-BötC es la presencia de células marcapasos, que poseen propiedades intrínsecas de descarga espontánea generada por corrientes persistentes que son generadas, a su vez, por un aumento de permeabilidad a sodio y calcio. Estas células aseguran la generación del ritmo respiratorio incluso en condiciones de alteración de la red inhibitoria, lo que pone de manifiesto su papel en la ritmogénesis (Ghali, 2019).

Estos hallazgos se ven reforzados por estudios que muestran sus proyecciones indirectas hacia el nervio frénico (Wu et al., 2017), las motoneuronas torácicas (Gerrits & Holstege, 1996; Yang & Feldman, 2018), así como hacia los núcleos del nervio hipogloso, el facial y el pre-BötC contralateral (Moore et al., 2013; Chamberlin et al., 2007; Tan et al., 2010; Koshiya et al., 2014; Yang & Feldman, 2018; Guo et al., 2020). Esta organización permite que las neuronas de este complejo actúen de forma coordinada en ambos lados del bulbo, facilitando no solo la producción de movimientos respiratorios rítmicos, sino también simétricos (Wu et al., 2017).

Entre las neuronas inspiratorias, se han encontrado interneuronas excitadoras somatostatina-positivas (SST+) y negativas (SST-), responsables de que haya un equilibrio entre la fase inspiratoria y espiratoria (Cui et al., 2016; Ashhad & Feldman, 2020). Las neuronas excitadoras del pre-BötC son esenciales para la generación de la actividad rítmica, mientras que las inhibitorias juegan un papel clave en la modulación de la frecuencia respiratoria y en la finalización de la inspiración (Janczewski et al., 2013; Sherman et al., 2015; Baertsch et al., 2018; Hülsmann et al., 2021). Estas poblaciones neuronales parecen

tener un papel relevante en la modulación de comportamientos respiratorios relacionados con la vocalización (Tupal et al., 2014).

Aunque las neuronas inspiratorias han sido ubicadas clásicamente en esta región, estudios recientes sugieren que tienen una distribución más difusa a lo largo de toda la columna respiratoria ventral (Baertsch et al., 2019). Además, su actividad es modulada por el núcleo PBm, que incrementa la excitación de sus neuronas inspiratorias para acelerar la transición a la inspiración (Zuperku et al., 2017).

Desde una perspectiva molecular, se ha descrito también que el pre-BötC expresa el factor de transcripción *Foxp2* tanto en roedores como en primates y humanos. Por tanto, el pre-BötC podría participar en la integración de los componentes respiratorios y motores implicados en la vocalización, además de la ritmogénesis respiratoria (Vallin et al., 2025).

Para el control de estas funciones, el pre-BötC parece no actuar de manera aislada, sino que forma parte de una red más amplia dada su conectividad con centros respiratorios como la SGP, el cPB-KF, el PiCo, el núcleo parafacial lateral, el BötC y el NTS. Además de estas interacciones, recientemente se ha demostrado también que el pre-BötC mantiene conexiones funcionales con estructuras hipotalámicas, entre ellas el DMH/PeF (Tan et al., 2010; Koshiya et al., 2014; Yang & Feldman, 2018; Biancardi et al., 2021; Trevizan-Baú et al., 2021b).

Esta conectividad abre una vez más la posibilidad de que el DMH/PeF tenga un papel en la actividad respiratoria asociada a conductas complejas como la vocalización. De forma complementaria, también se ha propuesto que la SGP puede modificar la actividad del pre-BötC (Park et al., 2024). Por tanto, la influencia del DMH/PeF sobre esta región podría ser tanto directa como indirecta a través de la SGP.

3.2.3.3.2. *Complejo Bötzinger*

El complejo BötC es una estructura bulbar fundamental para el control de la fase espiratoria, ya que está formado principalmente por neuronas inhibitorias GABAérgicas y glicinérgicas que modulan la actividad del generador inspiratorio. Estas neuronas se organizan en poblaciones neuronales con dinámicas opuestas, es decir, en neuronas con descargas de perfil decreciente y creciente, cuya activación depende de la insuflación pulmonar (Krohn et al., 2023). Las neuronas de perfil decreciente disminuyen su actividad de forma progresiva durante la postinspiración para inhibir al pre-BötC, relajar los músculos inspiratorios y detener, así, la inspiración. Las neuronas de perfil creciente, por su parte, aumentan su actividad durante la fase espiratoria. De esta manera, facilita la contracción de los músculos respiratorios necesarios para expulsar el aire de los pulmones (Marchenko et al., 2016; Ausborn et al., 2018; Flor et al., 2020).

Se ha demostrado que si se suprime la actividad tanto del BötC como del pre-BötC de manera aislada, la respiración se muestra sustancialmente alterada. Estos hallazgos sugieren que ambas regiones son interdependientes y deben trabajar en conjunto para que haya un equilibrio entre la inhibición y la excitación, que asegure una transición correcta entre la fase inspiratoria y la espiratoria (Smith et al., 2007; Richter & Smith, 2014; Ausborn et al., 2018). Al igual que el pre-BötC, el BötC se ha relacionado con la expresión del factor de transcripción *Foxp2*, por lo que ambas estructuras bulbares parecen compartir una misma base molecular vinculada a la coordinación de los patrones respiratorios y vocales (Vallin et al., 2025).

Además de esta relación funcional y molecular con el pre-BötC, el BötC interactúa con otros núcleos respiratorios como el GRpF (Flor & colegas, 2020), el KF (Ezure et al., 2003; Yang et al., 2020; Biancardi et al., 2021), el GRVr, el GRVc (Bryant et al., 1993), las neuronas motoras en el núcleo frénico (Ellenberger et al., 1990; Tian et al., 1998), el NTS, el PBI y la SGP (Merrill et al., 1983; Smith et al., 1989; Ezure et al., 2003; Trevizan-Baú et al., 2021b). Aunque no se han descrito, hasta la fecha, proyecciones desde el DMH/PeF hacia el BötC, este último forma parte de una red neuronal amplia común al DMH/PeF.

3.2.3.3.3. Núcleo Retroambiguo

El nRA, también conocido como grupo respiratorio ventral (GRV), es una estructura bulbar situada caudal al complejo pre-BötC. Contiene una población de neuronas premotoras respiratorias altamente heterogénea, que le permite regular múltiples funciones motoras asociadas con la respiración, la vocalización y otras actividades que modifican la presión intrabdominal e intratorácica. Desde un punto de vista funcional, este núcleo se divide en una porción rostral, denominada GRVr, con función inspiratoria, y una porción caudal, o GRVc, con función espiratoria (Merrill, 1970).

El GRVr contiene premotoneuronas inspiratorias que proyectan hacia los músculos intercostales externos y también hacia el núcleo frénico para controlar el diafragma (Holstege & Kuypers, 1982). Esta región mantiene interconexiones con múltiples centros respiratorios, entre los que destaca la SGP, el cPB-KF (Zheng et al., 1998; Yokota et al., 2016), el pre-BötC, el BötC (Bryant et al., 1993; Gerrits & Holstege, 1996; Ezure et al., 2003) y el NTS (Zheng et al., 1998).

El GRVc contiene premotoneuronas espiratorias que proyectan hacia las motoneuronas espinales que activan los músculos abdominales y los músculos intercostales internos (Campbell & Green, 1955). Aunque la espiración pasiva no requiere activación muscular, funciones como la vocalización, el habla o la respuesta de lucha y huida dependen de estas neuronas para convertir la espiración pasiva en activa (Zhang et al., 1995). Esta región también se conecta con las motoneuronas laríngeas en el nA. Con ello, se establece

un vínculo directo entre la espiración activa y la modulación de las cuerdas vocales (Holstege, 1989; Park et al., 2024). Además, el nRA caudal conecta con el KF, el núcleo parafacial lateral (Gerrits & Holstege, 1996; Ezure et al., 2003; Song et al., 2012; Silva et al., 2016), el NTS y los núcleos PBl y PBm (Beckstead et al., 1980; Gerrits & Holstege, 1996).

Estudios recientes han encontrado que el GRVc caudal cuenta con una población de interneuronas premotoras laríngeas implicadas en la vocalización. Estas neuronas son esenciales para la aducción de las cuerdas vocales y, en consecuencia, para la fonación, ya que su inhibición elimina tanto los ultrasonidos como los chillidos (Park et al., 2024). Además, se han identificado en ratón una subpoblación de neuronas excitatorias en el nRA que expresan neurotensina y que son capaces de generar sonidos tanto de rango audible como ultrasónicos, así como regular el volumen de dichos sonidos (Veerakumar et al., 2023). Sin embargo, aún no está completamente claro cómo estas células interactúan con el sistema respiratorio para coordinar la vocalización y garantizar la prioridad de la respiración.

Se sabe que estas interneuronas premotoras laríngeas reciben entradas excitadoras de la SGP (VanderHorst et al., 2000; Oka et al., 2008; Subramanian & Holstege, 2009; Holstege & Subramanian, 2016). La estimulación de la SGP induce vocalizaciones que desaparecen en el caso de lesiones en el nRA (Shiba et al., 1997; Hartmann & Brecht, 2020). Por tanto, la SGP no solo excita motoneuronas musculares abdominales e intercostales para la modificación de la actividad diafragmática (Subramanian et al., 2008; Subramanian & Holstege, 2009), sino que también modula la actividad de los grupos celulares del nRA que actúan sobre las motoneuronas faríngeas y laríngeas localizadas en el nA (Boers et al., 2002).

En cuanto a su relación con estructuras hipotalámicas, la evidencia disponible sobre la conectividad entre el nRA y el DMH/PeF es todavía escasa, pero no inexistente. Estudios de trazado anterógrado en rata han mostrado proyecciones descendentes de baja densidad desde el DMH/PeF y, en mayor medida, desde áreas perifornicales y laterales hipotalámicas hacia el nRA (Papp & Palkovits, 2014). No obstante, la influencia del DMH/PeF sobre el nRA parece sostenerse de manera más robusta a través de una vía indirecta mediada por la SGP. Está bien establecido que el DMH/PeF proyecta densamente a la SGP (Motta et al., 2009; Benarroch, 2012; Dampney, 2015; Trevizan-Baú et al., 2021a; Schottelkotte & Crone, 2022), y que esta última ejerce un control fuerte sobre el nRA, particularmente en la modulación de la vocalización, el control respiratorio y los ajustes de la presión abdominal durante respuestas de defensa (Holstege et al., 1997; Papp & Palkovits, 2014).

3.2.3.4. Núcleo Ambiguo

El nA es una estructura longitudinal del bulbo raquídeo que se extiende rostro-caudalmente, desde el núcleo motor del nervio facial hasta la decusación piramidal. Su nombre se debe a que histológicamente es una región poco definida (Akunna & Abah, 2023). Aunque esta condición ha dificultado su estudio, en la actualidad, se reconoce que el nA presenta una especialización funcional a lo largo de su eje rostro-caudal (Pascual-Font, 2011; Hernández-Morato et al., 2013).

El nA está constituido por motoneuronas que controlan músculos específicos de la cabeza y el cuello, lo que le confiere un papel fundamental en la regulación de funciones como la deglución, la fonación y la coordinación respiratoria. Durante la deglución, el nA coordina la contracción de los músculos faríngeos, laríngeos y esofágicos, necesarios para el paso del bolo alimenticio, al mismo tiempo que inhibe la respiración para evitar la aspiración (Bieger & Hopkins, 1987; Jean, 2001; Miller, 2008; Shi et al., 2019; Coverdell et al., 2022). Con respecto al habla, participa en el control motor fino de las cuerdas vocales y, desde un punto de vista respiratorio, participa en la generación del patrón del ritmo respiratorio (Akunna & Abah, 2023; Krohn et al., 2023; González-García et al., 2024b).

Además, el nA contiene motoneuronas cardíacas vagales que controlan la frecuencia cardíaca, junto al NTS y el 10N. Mientras que el NTS se encarga de procesar las aferencias vagales a través de la información sensorial proporcionada por los barorreceptores, el nA y el 10N se encargan de las eferencias parasimpáticas. En concreto, el NTS procesa información sensorial de los barorreceptores y transmite señales excitatorias al nA, que a través de las motoneuronas vagales libera acetilcolina sobre el nodo sinoauricular. Esto ralentiza la aparición de potenciales de acción en el nódulo sinusal para generar bradicardia (Spyer, 1981; Machado & Brody, 1988; Spyer & Gilbey, 1988; Neff et al., 1998; Dergacheva et al., 2010; Brailoiu et al., 2017; Akunna & Abah, 2023; Jalil et al., 2023).

Organización y especialización neuronal del nA

La diversidad funcional del nA se atribuye a la forma en la que sus motoneuronas están distribuidas a lo largo de esta estructura, tema que ha sido objeto de debate en la comunidad científica. Hay autores que proponen que las motoneuronas laríngeas se distribuyen de forma desorganizada a lo largo de todo el eje rostro-caudal (Gacek, 1975; Hinrichsen & Ryan, 1981; Pásaro et al., 1983; Davis & Nail, 1984; Hisa et al., 1984; Basterra et al., 1987; Flint et al., 1991; Nahm et al., 1993). Sin embargo, la teoría más aceptada sostiene que las motoneuronas del nA presentan una organización somatotópica, ya que tienden a agruparse en función de los músculos específicos que inervan (Hinrichsen & Ryan, 1981; Pásaro et al., 1983; Hisa et al., 1984; Davis & Nail, 1984; Basterra et al., 1987; Yoshida et al., 1998; Hirasugi et al., 2007).

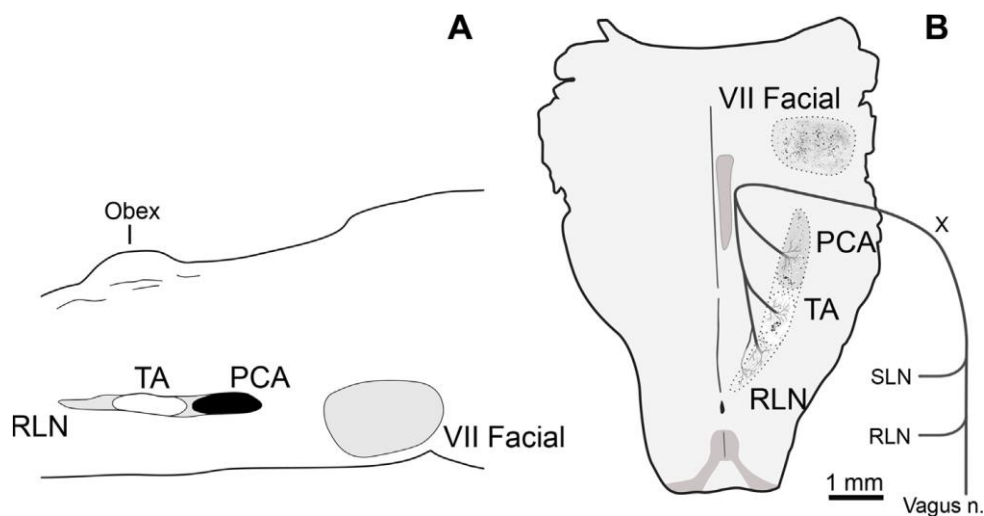
Según Bieger y Hopkins (1987), el nA se divide en formación dorsal y formación externa. La formación dorsal se subdivide, a su vez, en formación compacta, semicompacta y laxa. La formación compacta se corresponde con la región más rostral e inerva el esófago. La formación semicompacta se corresponde con la parte intermedia e inerva los músculos constrictores de la faringe y el músculo cricotiroideo. Finalmente, la formación laxa es la región más caudal e inerva toda la musculatura laríngea, salvo el cricotiroideo (Kalia & Mesulam, 1980; Hinrichsen & Ryan, 1981; Bieger & Hopkins, 1987). La formación externa, por su parte, se sitúa ventrolateral a la formación dorsal y contiene las neuronas parasimpáticas preganglionares cardiomotoras (Bieger & Hopkins, 1987). Además, se han identificado neuronas parasimpáticas con función secretomotora encargadas de regular las glándulas submucosas de la laringe. Estas son responsables de la secreción que protege las cuerdas vocales y disminuye la resistencia al flujo de aire (McHanwell, 2008; Sato & Nakashima, 2008).

Este modelo organizativo se ha visto reforzado por investigaciones posteriores, como la realizada por Hernández-Morato et al. (2013). Para estos autores las neuronas que inervan los músculos intrínsecos de la laringe en rata presentan una organización somatotópica. En su estudio, las poblaciones neuronales que inervan el músculo cricotiroideo ocupan la porción más rostral de la columna, seguidas de las poblaciones correspondientes al músculo cricoaritenoso posterior y los músculos tiroaritenosos en la región más caudal. No obstante, también describen áreas de solapamiento entre poblaciones neuronales adyacentes.

Además, esta organización parece estar vinculada con cómo se distribuyen y proyectan las fibras de los nervios laríngeos superior (NLS) y recurrente (NLR). Mientras que las motoneuronas que controlan el músculo cricotiroideo lo hacen a través del NLS, las motoneuronas que controlan el resto de músculos intrínsecos lo hacen a través del NLR. De igual modo, se ha demostrado que las motoneuronas del NLS se ubican dentro de la formación semicompacta y las motoneuronas del NLR dentro de la formación laxa (Figura 5) (Pascual-Font et al., 2011). Aunque la organización de las motoneuronas laríngeas en el nA ha sido respaldada por varios estudios, existe cierta controversia en cuanto a su grado de conservación entre especies y, en especial, en rata, debido a las diferencias morfológicas de la laringe. No obstante, a pesar de estas diferencias, la evidencia sugiere que esta organización somatotópica muestra adaptaciones funcionales específicas en cada especie (Kobler et al., 1994; Inagi et al., 1998; Hirasugi et al., 2007).

Figura 5

Localización de las motoneuronas laríngeas y faciales dentro del tronco del encéfalo



Nota. Las motoneuronas abductoras y aductoras de la laringe presentan una disposición somatotópica a lo largo del núcleo ambiguo. X: nervio vago; VII Facial; núcleo facial; RLN: nervio laríngeo recurrente; SLN: nervio laríngeo superior; PCA: músculo cricoaritenoides posterior; TA: músculo tiroaritenoides. Reproducido de *Muscle specific nucleus ambiguus neurons isolation and culturing*, por I. Hernández-Morato, M. J. Pitman y S. Sharma, 2016, *Journal of Neuroscience Methods*, 273, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.07.014>

Características morfológicas y neuroquímicas

Parte de la complejidad organizativa del nA se debe a la heterogeneidad de las poblaciones neuronales que lo componen. El nA contiene diferentes poblaciones neuronales entre las que se han descrito principalmente motoneuronas e interneuronas (Delgado-García, 1983; Fogarty, 2024). Las motoneuronas laríngeas presentan variabilidad morfológica y de tamaño que reflejan su especialización en el control de los músculos de la laringe. La mayoría de estas neuronas presentan forma estrellada, aunque también se han identificado motoneuronas fusiformes en los grupos que controlan el cricotiroideo y el cricoaritenoides posterior. En cuanto al tamaño, las motoneuronas de mayor calibre, como las que inervan el músculo tiroaritenoides, se asocian con una aducción rápida de las cuerdas vocales. En cambio, las motoneuronas de menor tamaño, como las que inervan los músculos cricotiroideo y cricoaritenoides posterior, se relacionan con una actividad aductora más lenta (Hinrichsen & Ryan, 1981; Davis & Nail, 1984; Patrickson et al., 1991; Yoshida et al., 1998).

Junto a estas particularidades morfológicas, las motoneuronas del nA son colinérgicas, caracterizadas por la expresión de la enzima colina acetiltransferasa (ChAT), que es esencial para la síntesis de la acetilcolina. Por esta razón, este marcador ha sido

utilizado en estudios de inmunohistoquímica para identificar las neuronas colinérgicas en el nA (Blount et al., 2023).

En comparación con las motoneuronas, las interneuronas del nA han recibido menos atención en la literatura, por lo que la información acerca de su morfología y sus propiedades funcionales y neuroquímicas es limitada. Los estudios disponibles indican que las interneuronas, a diferencia de las motoneuronas, presentan un menor tamaño y sus dendritas son más cortas y simples. Aunque la funcionalidad de estas poblaciones está aún por esclarecer, los hallazgos sugieren que las interneuronas del nA podrían desempeñar un papel integrador, procesando las señales procedentes de otras regiones antes de que alcancen las motoneuronas laríngeas (Fogarty, 2024).

Relación entre el DMH/PeF y el nA

En consonancia con lo descrito anteriormente, el nA desempeña un papel fundamental en la integración de funciones respiratorias y fonatorias, principalmente a través de la actividad de sus motoneuronas laríngeas. No obstante, los mecanismos mediante los cuales estas neuronas son moduladas por otras estructuras continúan siendo objeto de debate (Akunna & Abah, 2023; Krohn et al., 2023; González-García et al., 2024a; 2024c).

Estudios realizados por nuestro grupo de investigación han demostrado que el cPB y la región A5 modulan la actividad de las motoneuronas laríngeas del nA (Lara et al., 2002). Asimismo, trabajos más recientes han puesto de manifiesto que la SGPdI también ejerce una modulación significativa sobre la actividad de estas motoneuronas, especialmente en condiciones de respuesta de defensa. A estos hallazgos se suma la evidencia de que el nA expresa Foxp2, principalmente, en las formaciones semicompacta y laxa (González-García et al., 2024a, 2024c).

De forma complementaria, otros estudios han demostrado que la actividad motora laríngea está sincronizada con el patrón respiratorio, ya que las fases postinspiratoria y espiratoria son las que determinan la vocalización (Tschida et al., 2019; Riede et al., 2020). En esta misma línea, se ha descrito que la estimulación de estas regiones moduladoras del nA no solo altera el calibre laríngeo en distintas fases respiratorias según el núcleo implicado, sino que también provoca cambios cardiovasculares asociados. Estos ajustes autonómicos refuerzan el papel del nA no solo en el control laríngeo, sino también cardiorrespiratorio (Lara et al., 2002; González-García et al., 2024a, 2024c).

Además, el nA influye sobre el control cardíaco parasimpático (Spyer, 1981; Machado & Brody, 1988; Neff et al., 1998; Spyer & Gilbey, 1988; Dergacheva et al., 2010; Brailoiu et al., 2017; Akunna & Abah, 2023; Jalil et al., 2023), lo que refuerza su participación en las funciones motoras y autonómicas. Considerando que el DMH/PeF también participa activamente en la regulación autonómica y cardiorrespiratoria durante el estrés (Kono et al.,

2020), resulta pertinente plantear la posible existencia de conexiones anatómicas y funcionales entre esta región y el nA. Aunque la evidencia es limitada, se han descrito proyecciones monosinápticas desde el DMH/PeF hacia el nA (ter Horst & Luiten, 1986).

Estos hallazgos, junto con la similitud funcional de ambas estructuras y su conectividad con centros respiratorios comunes, abren un campo de investigación clave para comprender los mecanismos que coordinan la respiración, la vocalización y las respuestas autonómicas. Un dato relevante es que muchas de estas estructuras bulbopontinas, como el cPB-KF, el pre-BötC, BötC, el NTS y el nA, expresan el factor de transcripción *Foxp2* (Geerling et al., 2017; Stanić et al., 2018; González-García et al., 2024c; Vallin et al., 2025). La presencia de este marcador molecular en estas regiones apunta a que no solo es importante la conectividad anatómica y funcional entre ellas, sino también sus propiedades genéticas y moleculares. Por ello, cabe estudiar la importancia del *Foxp2* y su valor como marcador para estudiar los circuitos neuronales con función respiratoria y laríngea, así como su posible relación con el DMH/PeF.

3.2.4. *Foxp2* como marcador molecular de los circuitos laringo-respiratorios

El *FOXP2* (Forkhead box protein P2) es un gen que codifica un factor de transcripción clave para el desarrollo cerebral, el control motor, el lenguaje y la vocalización. Además de su papel a nivel cerebral, este gen se expresa en otros tejidos como los pulmones. Su importancia en el habla y la comunicación se debe a que regula la expresión de múltiples genes implicados en la morfogénesis neuronal, la formación de sinapsis y la plasticidad de los circuitos neuronales (Vernes et al., 2011; Hickey et al., 2019; Kosubek et al., 2020).

El interés científico por este gen empezó en la década de 1990, a raíz de investigaciones llevadas a cabo en una familia británica, cuyos miembros presentaban un trastorno hereditario caracterizado por dispraxia verbal, dificultades gramaticales, articulatorias y orofaciales (Vargha-Khadem et al., 1998). Posteriormente, se descubrió que todos los individuos afectados compartían una mutación en este gen. En concreto, una mutación en R553H, una sustitución de arginina por histidina en el dominio de unión al ADN de la proteína. Esta mutación impedía el correcto funcionamiento del factor de transcripción y, con ello, el correcto desarrollo de los circuitos cerebrales lingüísticos y motores (Lai et al., 2001).

Desde entonces se han descrito otros casos independientes asociados a distintos tipos de mutaciones en este mismo gen (Turner et al., 2013; Morgan et al., 2016), pero que igualmente han sido asociados a problemas de habla y lenguaje, además de bajo coeficiente intelectual y retraso en el desarrollo (Reuter et al., 2017). Es más, estudios de neuroimagen han demostrado que las alteraciones del *FOXP2* producen un espectro de afectación más

amplio, que involucra no solo regiones lingüísticas como el área de Broca, sino también circuitos motores y subcorticales tales como el núcleo caudado, el putamen, el tálamo y el cerebelo. La afectación de estas estructuras ha llevado a considerar al *FOXP2* un organizador molecular de las redes motoras y cognitivas que median la comunicación verbal (Enard et al., 2009; Usui et al., 2017).

Por otro lado, los estudios sobre la evolución del gen *FOXP2* han reforzado su vínculo con el lenguaje. Los estudios de genética han demostrado que, tras la separación evolutiva entre humanos y chimpancés, este gen experimentó dos mutaciones (T303N y N325S) que han persistido únicamente en nuestra especie (Enard et al., 2002; Zhang et al., 2002). Estos cambios han sido interpretados como un proceso de selección positiva o adaptativa que ha permitido la aparición del lenguaje articulado en humanos (Enard et al., 2002). Asimismo, experimentos realizados en ratones con una versión “humanizada” de este gen han revelado cambios en la dopamina, más plasticidad sináptica en el estriado y cambios en la producción vocal. Estos resultados indican que las mutaciones de este gen influyen directamente sobre los circuitos corticoestriales, claves para el control motor y el lenguaje humano (Reimers-Kipping et al., 2011).

Estos hallazgos sobre la evolución de este gen, junto a la evidencia de que *FOXP2* interactúa con redes neurales subcorticales, refuerzan la idea de que el lenguaje humano emergió de circuitos motores ancestrales. Con el avance de la investigación, se ha ido constatando también otras regiones que expresan *Foxp2* tales como el cPB-KF, el pre-BötC, BötC, el NTS y el nA (Geerling et al., 2017; Stanić et al., 2018; González-García et al., 2024c; Vallin et al., 2025). Todo ello apoya la idea de que el *Foxp2* sirve como marcador molecular de redes neuronales que participan en la respiración y la producción vocal.

Debido a que el DMH/PeF conecta con alguna de estas estructuras, cabe preguntarse si la influencia del factor de transcripción *Foxp2* se extiende también hacia regiones hipotalámicas. Aunque no existe hasta la fecha evidencia de poblaciones neuronales en el DMH/PeF que expresen esta proteína, algunos autores demuestran que esta región recibe proyecciones de neuronas *Foxp2* procedentes del pre-locus coeruleus y del cPB (Shin et al., 2011; Huang et al., 2021). Por tanto, estos resultados apuntan a que el DMH/PeF podría formar parte de circuitos dependientes de *Foxp2*. Esto refuerza la necesidad de estudiar el papel del DMH/PeF en la actividad respiratoria vinculada a la vocalización.

3.3. Papel de la laringe en la coordinación fonorrespiratoria: anatomía, fisiología y roedores como modelo animal

Si bien en los apartados anteriores se han abordado las principales estructuras centrales de la red respiratoria/fonorrespiratoria y su relación con el DMH/PeF, para comprender cómo estas modulan la producción vocal, resulta necesario analizar el órgano sobre el que recae una parte fundamental de este control, la laringe. Más concretamente, es necesario conocer la anatomía, la fisiología y la innervación laríngea. Desde este enfoque es posible comprender en su totalidad cómo estructuras centrales, como el DMH/PeF, podrían incidir sobre la presión subglótica y la dinámica del flujo aéreo que hace posible la producción vocal. En este contexto, también resulta necesario evaluar la idoneidad de los roedores como modelo animal para el estudio de la laringe y la presión subglótica.

3.3.1. Anatomía y funciones de la laringe

La laringe es un órgano único, móvil y de aspecto tubular ubicado en la zona medial del cuello anterior. Se encuentra anterior a la faringe, inferior al hueso hioides y superior a la tráquea. Aunque varía según la edad y el sexo, en los adultos la laringe se sitúa aproximadamente entre los bordes inferiores de las vértebras C3 y C6 (Céruse et al., 2012). En el caso de los recién nacidos, la laringe se encuentra a la altura de la segunda vértebra cervical, lo que les permite desempeñar la deglución y la respiración nasal de forma simultánea. A medida que se crece, la laringe desciende gradualmente. Este descenso separa la función deglutoria de la respiratoria, además de ampliar el rango fonético (Wadie et al., 2013).

Existen también diferencias de estructura, según la edad y el sexo. Estas diferencias se deben, en especial, a factores hormonales que se hacen más notorios durante la pubertad. Mientras que en los hombres las cuerdas vocales son de mayor longitud y grosor, las mujeres presentan una laringe de menor tamaño, de menor longitud y de menor grosor. Esto explica las variaciones en el tono de voz no solo entre niños y adultos, sino también entre hombres y mujeres (Céruse et al., 2012; Loth et al., 2015; Markova et al., 2016; Glikson et al., 2017).

Anatómica y funcionalmente la laringe se divide en tres niveles: 1) espacio supraglótico, desde epiglotis hasta bandas ventriculares o cuerdas vocales falsas; 2) espacio glótico, desde las bandas ventriculares hasta las cuerdas vocales verdaderas, incluido el ventrículo laríngeo; y 3) espacio subglótico, desde los pliegues vocales hasta el borde inferior del cartílago cricoides (Schünke et al., 2022).

A pesar de su reducido tamaño, la laringe cumple diversas funciones al estar implicada en la respiración, la fonación y la protección de las vías aéreas. Además, gracias

a su capacidad para generar cierres glóticos completos, es clave en todas aquellas actividades que requieren un aumento de la presión intratorácica, como el levantamiento de peso y la realización de esfuerzos físicos intensos (Wadie et al., 2013).

Su capacidad para desempeñar todas estas funciones se debe a su constitución anatómica, compuesta por cartílagos que le dan forma y soporte, músculos que permiten su movilidad, ligamentos que conectan y estabilizan sus estructuras, y una mucosa que la protege y facilita su funcionamiento.

3.3.2. Cartílagos laríngeos

Los cartílagos laríngeos son componentes fundamentales en la anatomía de la laringe, al proporcionar soporte, flexibilidad y protección a las vías respiratorias. La laringe está formada por 4 cartílagos principales que son el tiroides, el cricoides, los aritenoides y la epiglotis (Figura 6). Aunque cada uno desempeña un rol específico, todos trabajan en conjunto y de forma coordinada para garantizar que la laringe funcione en armonía y de forma efectiva (Lev & Curtin, 1998; Wadie et al., 2013).

El cartílago tiroides es el más grande y presenta un aspecto de escudo. Este cartílago se sitúa sobre el cartílago cricoides, con el que forma una unión móvil dando lugar a la articulación cricotiroidea. Esta articulación permite la basculación del tiroides sobre el cricoides y, con ello, la tensión de las cuerdas vocales necesaria para modular el tono (Sataloff et al., 2013; Wadie et al., 2013; Kaur et al., 2016).

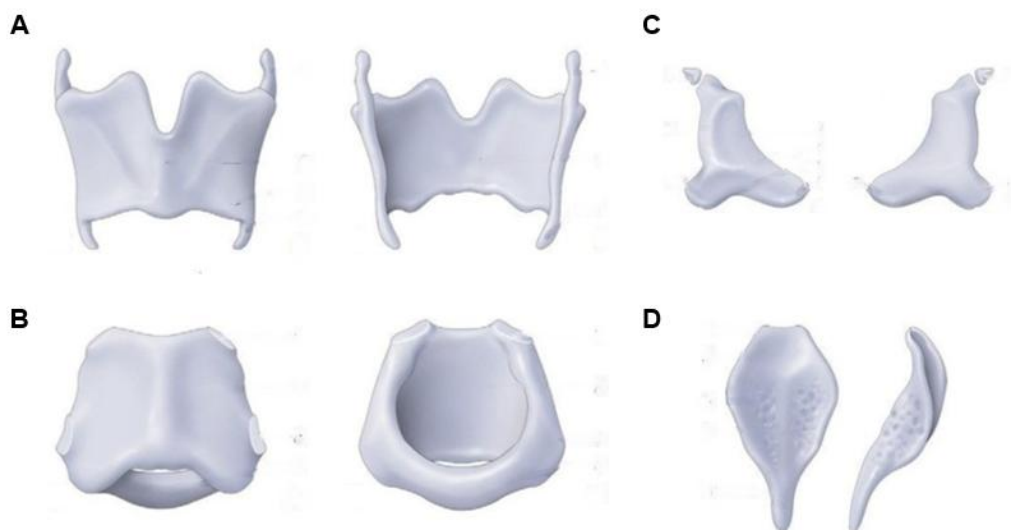
El cricoides, con su forma de anillo, además de proporcionar una base sólida y estable al cartílago tiroides, proporciona solidez y estabilidad a los cartílagos aritenoides, que descansan en su región posterior. Los cartílagos aritenoides movilizan las cuerdas vocales a través de la articulación cricoaritenoides (Sataloff et al., 2013). En concreto, median la apertura y cierre de los pliegues vocales mediante movimientos de rotación ejecutados por la apófisis vocal y muscular, que contactan con el ligamento vocal y los músculos cricoaritenoides posterior y lateral respectivamente (Wadie et al., 2013).

Los cartílagos aritenoides presentan también en su parte superior los cartílagos corniculados, que aportan el soporte necesario para que los aritenoides se muevan de forma correcta. Además, los cartílagos cuneiformes ayudan a mantener la rigidez y forma de los pliegues ariepiglóticos, que están conectados a los aritenoides. Todas estas estructuras son fundamentales para evitar obstrucciones en las vías respiratorias. La epiglotis, aunque no interviene de forma directa en la fonación, es fundamental en la protección de la laringe. Durante la deglución, este cartílago, que tiene forma de pétalo de flor, bascula hacia abajo para cerrar las vías aéreas y evitar que los alimentos o líquidos ingresen en su interior (Krohner & Ramanathan, 2007; McFarland, 2008; Torres Gallardo & Ferrán Gimeno, 2008; Calais-Germain & Germain, 2013; Wadie et al., 2013).

En definitiva, los cartílagos de la laringe trabajan de forma conjunta y coordinada. Mientras que la interacción de los cartílagos tiroides, cricoides y aritenoides controlan las cuerdas vocales, la epiglotis y otros cartílagos accesorios garantizan la seguridad de las vías respiratorias.

Figura 6

Cartílagos laríngeos



Nota. (A) Tiroides, (B) cricoides, (C) aritenoides y corniculados y (D) epiglotis. Adaptado de *Anatomía descriptiva, endoscópica y radiológica de la laringe*, por P. Céruse, A. Ltaief-Boudrigua, G. Buiet, A. Cosmidis y S. Tringali, 2012, *EMC – Otorrinolaringología*, (3). [https://doi.org/10.1016/S1632-3475\(12\)62682-4](https://doi.org/10.1016/S1632-3475(12)62682-4)

3.3.3. Músculos laríngeos

En la laringe se distinguen dos tipos de músculos según su inserción, los músculos laríngeos extrínsecos y los intrínsecos. Los músculos extrínsecos se caracterizan por presentar, al menos, uno de sus extremos insertados fuera de la laringe. La función principal de estos músculos es la de elevar o descender en bloque la laringe, por lo que es posible clasificarlos según sean elevadores o depresores (Wadie et al., 2013; Schünke et al., 2022; Serry et al., 2023).

Los músculos elevadores de la laringe, conocidos también como músculos suprahiodeos, desplazan la laringe hacia arriba tirando del hueso hioides en esa misma dirección con el objetivo de proteger las vías respiratorias durante la deglución. Los principales músculos suprahiodeos son el milohioideo, el digástrico, el estilohioideo y el genihioideo, que actúan coordinadamente para elevar el hioides y, con ello, la laringe. Por el contrario, los músculos depresores de la laringe o músculos infrahiodeos descienden la

laringe al conectar el hueso hioides con estructuras inferiores. Estos músculos actúan, principalmente, tras la deglución para devolver a la laringe su posición normal. Además, proporcionan estabilidad a la laringe durante la respiración y la fonación. Entre los músculos infrahioides encontramos el esternohioideo, el omohioideo, el esternotiroideo y el tirohioideo (Wadie et al., 2013).

Los músculos intrínsecos, por su parte, tienen control directo sobre las cuerdas vocales y la glotis y, dependiendo de los efectos que ejercen sobre estas estructuras, se clasifican en abductores, aductores y tensores. La acción coordinada de los diferentes músculos permite el desarrollo de las funciones de respiración, protección de las vías aéreas y fonación (Krohner & Ramanathan, 2007).

El músculo cricoaritenideo posterior es el único músculo abductor de la laringe y desempeña un papel importante en la respiración, al separar las cuerdas vocales (Figura 7A). Su inserción en los aritenoides permiten la rotación de estos sobre su propio eje, dirigiendo la apófisis muscular hacia la zona media y la vocal hacia la zona posterolateral. De esta manera se produce la separación de las cuerdas vocales y la dilatación, por tanto, de la glotis (Krohner & Ramanathan, 2007). Sin embargo, este músculo no actúa de manera aislada en este proceso, ya que la contracción continua del cricoaritenideo generaría fatiga muscular. Además de la contracción muscular, la glotis se mantiene abierta gracias a la combinación de la elasticidad natural de la laringe y el peso del árbol respiratorio. Este mecanismo pasivo permite que, una vez que la contracción cesa, las estructuras cartilaginosas se ajusten de manera eficiente, asegurando una permeabilidad constante de las vías respiratorias (Regner et al., 2012; Saran et al., 2023).

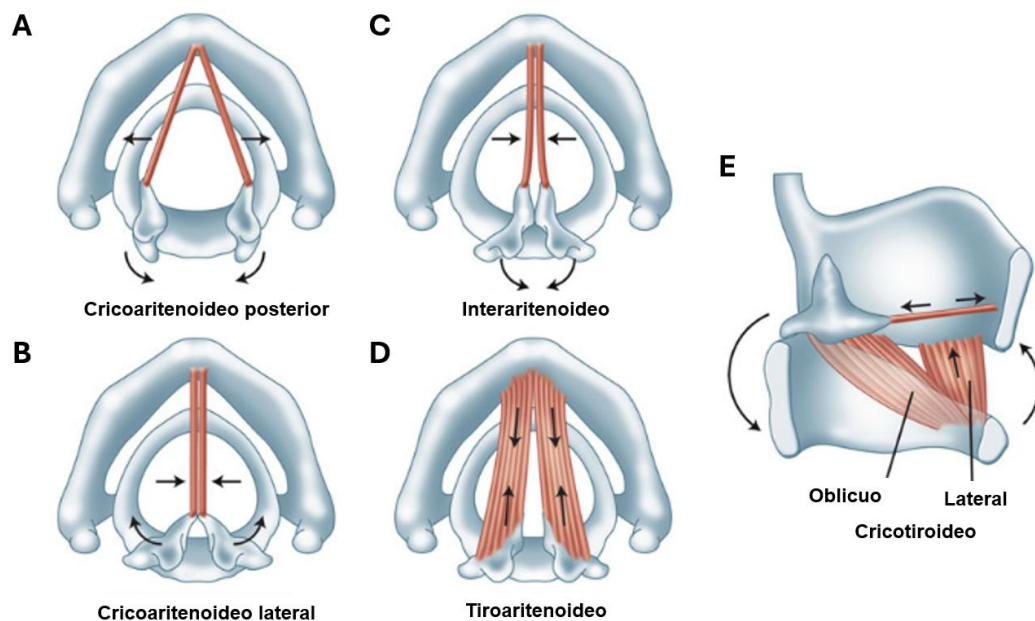
Por el contrario, el cierre de las cuerdas vocales es el resultado de la activación de un grupo de músculos aductores. El músculo cricoaritenideo lateral rota los aritenoides en una dirección inferomedial, aproximando las cuerdas vocales (Figura 7B) (Krohner & Ramanathan, 2007). Este movimiento de constricción laríngea se complementa con la activación de los músculos interaritenoides transverso y oblicuo. El primero se inserta en la cara posterior de ambos cartílagos aritenoides. Su contracción acerca estos cartílagos, cerrando la glotis. El segundo, por su parte, va desde la apófisis muscular de un cartílago aritenoides al vértice del contralateral. Este último se continúa hacia adelante y arriba con el músculo aritenoepiglótico. Ambos músculos trabajan conjuntamente para acercar los aritenoides entre sí y garantizar un cierre glótico eficaz (Figura 7C) (McCullagh et al., 2022). El músculo aritenoepiglótico es una continuación del interaritenideo oblicuo. Su función principal es la de descender las cuerdas vocales, contribuyendo a su aducción. Además, contribuye al descenso pasivo de la epiglottis (Krohner & Ramanathan, 2007).

La modulación de la tensión de los pliegues vocales, necesaria para la emisión de diferentes tonos, está bajo control de los músculos tensores y relajadores. El músculo

cricotiroideo es el músculo tensor por excelencia, al permitir la acción de la articulación cricotiroidea (Figura 7E). En concreto, su activación permite la basculación anteroinferior del tiroides sobre el cricoides o bien efectúa un movimiento posterior del cricoides y los aritenoides, tensando y elongando las cuerdas vocales. Ambos mecanismos elevan el tono de la voz al generar vibraciones de mayor frecuencia. Es el único músculo que no está insertado en los aritenoides (Krohner & Ramanathan, 2007). Por otro lado, el músculo tiroaritenosoide o músculo vocal, con inserciones en la cara interna del tiroides y la apófisis muscular de los aritenoides, actúa como músculo relajador, acortando las cuerdas vocales y disminuyendo su tensión (Figura 7D). Aunque su papel principal es acortar y relajar las cuerdas vocales, dando lugar a la emisión de sonidos graves y suaves, también contribuye a su elongación, en función de cómo se coordine con los músculos tensores (Sataloff et al., 2013; Netter, 2019).

Figura 7

Músculos intrínsecos de la laringe



Nota. Se muestran los músculos intrínsecos responsables de la posición de las cuerdas vocales. Adaptado de *Development, Anatomy, and Physiology of the Larynx*, por Wadie, M., Adam, S. I., y Sasaki, C. T. (2013), en R. Shaker, P. Belafsky, G. Postma y C. Easterling (Eds.), *Principles of Deglutition* (cap. 13). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3794-9_13

3.3.4. Inervación laríngea

La laringe está inervada por el nervio vago y sus ramificaciones, el NLS y el NLR que tienen orígenes y rutas eferentes diferentes. Estas ramificaciones son cruciales en la regulación de la función laríngea, ya que permiten tanto su percepción sensorial como su control motor. El origen de estas ramificaciones determina la especificidad funcional del grupo muscular laríngeo que inerva cada ruta eferente (Moore & Dalley, 2006; McHanwell, 2008; Belafsky & Lintzenich, 2013; Parker et al., 2016; Woodson, 2016).

El NLS es la ramificación más compleja al tener origen tanto en el nA como en el 10N. En concreto, a través de las eferencias que emergen de la región más rostral del nA, el NLS inerva la mucosa supraglótica y las motoneuronas que controlan el músculo cricotiroideo (Hiatt & Gartner, 2002). Una lesión de este nervio durante una tiroidectomía o una cricotiroidotomía provoca ronquera en la voz e incapacidad para producir sonidos agudos (Dekhou et al., 2021; Zhao et al., 2021). Además de inervación motora laríngea, en esta división del nA se han identificado neuronas parasimpáticas con función secretora encargadas de regular las glándulas submucosas de la laringe a través de vías eferentes con origen en el 10N (Pascual-Font et al., 2006; McHanwell, 2008; Pascual-Font, et al., 2011). La función sensorial es ejercida a través de fibras aferentes que se dirigen desde la laringe hacia el NTS (Pascual-Font et al., 2011).

El NLR, por su parte, solo tiene origen en la región más caudal del nA y sus eferencias inervan la mucosa infraglótica y las motoneuronas que controlan todos los músculos intrínsecos de la laringe, a excepción del cricotiroideo. En ratas, se ha demostrado que, a diferencia de lo observado en otras especies (incluido el humano), este nervio carece de aferencias procedentes de la laringe. Estos hallazgos refuerzan la idea de que existen diferencias significativas en la organización anatómica y funcional de los circuitos aferentes laríngeos entre especies, diferencia que se debe tener en cuenta al realizar estudios experimentales y en la extrapolación de los resultados. Sin embargo, parece no haber diferencias significativas en relación al control eferente (Patrickson et al., 1991; Moore & Dalley, 2006; McHanwell, 2008; Pascual-Font et al., 2011).

La inervación laríngea presenta, por tanto, interacción con estructuras bulbares que, además de controlar la actividad motora que media las funciones de fonación, respiración y deglución, participan en la regulación autonómica de la laringe como la secreción mucosa y la protección de las vías aéreas.

3.3.5. Bases biomecánicas y aerodinámicas de la laringe

La fonación y la respiración son dos procesos fisiológicos que requieren la participación de las cuerdas vocales. Las cuerdas vocales son unas estructuras situadas en el interior de la laringe a lo largo de todo el espacio glótico. Se caracterizan por ser unas bandas elásticas de tejido recubiertas de mucosa, cuya composición permite no solo regular el flujo aéreo durante la respiración, sino también la fonación (Levendoski et al., 2014; Miri, 2014).

Durante la respiración eupneica, aunque el grado de dilatación varía entre fases según el grado de contracción del músculo abductor, tanto en inspiración como en espiración la glotis permanece abierta y con forma triangular, permitiendo que el flujo de aire pase desde y hacia los pulmones. Solo durante la respiración forzada la dilatación glótica se hace mayor, ya que la activación del músculo cricoaritenideo posterior incrementa para adaptarse al aumento de la demanda ventilatoria (Stella & England, 2001; Shiba, 2010; Hutchison et al., 2015). Por el contrario, durante la fonación los músculos aductores movilizan las cuerdas vocales hacia la línea media, cerrando la glotis parcialmente. Este cierre de la glotis genera aumentos de la presión subglótica al paso del flujo de aire espirado (Sasaki et al., 1973; Noordzij & Ossoff, 2006; Finck & Lejeune, 2010; Woodson, 2016; Zhang, 2016; Riede et al., 2020; Traser et al., 2020).

La presión subglótica se corresponde con la presión de aire que se ejerce por debajo de las cuerdas vocales y se genera por acción del diafragma y los músculos espiratorios. Cuando la presión subglótica supera la resistencia laríngea separa momentáneamente los pliegues vocales y el aire espirado atraviesa la hendidura glótica a gran velocidad. Este flujo de aire genera una presión negativa (efecto Bernoulli) que moviliza las cuerdas vocales de nuevo hacia la línea media. Estos ciclos de cierre y apertura se repiten de forma continuada dando lugar a la vibración sonora (Jiang & Maytag, 2014; Zhang, 2016).

Estas bases biomecánicas y aerodinámicas de la fonación se establecieron por primera vez en la *teoría mioelástica-aerodinámica* de Van den Berg (1958), que implica una interacción entre las propiedades elásticas de las cuerdas vocales y la fuerza aerodinámica del flujo espiratorio (Švec et al., 2023). Posteriormente, Perelló (1962) estableció la *teoría mucoondulatoria*, según la cual la ondulación de las cuerdas vocales no implica un movimiento uniforme de toda la estructura al completo, sino una ondulación vertical únicamente de la mucosa de los pliegues, y en una dirección infero-superior.

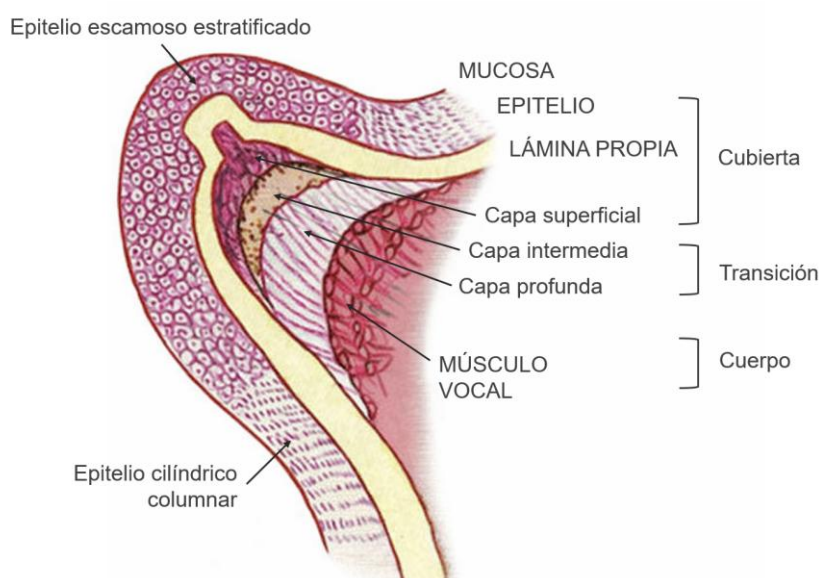
Finalmente, los aspectos dinámicos y estructurales de ambas teorías fueron integrados en la *teoría cuerpo-cubierta* propuesta por Hirano (1974). Este modelo considera que los pliegues vocales presentan múltiples capas histológicas con propiedades biomecánicas diferenciadas. Las capas más superficiales son más flexibles debido su alta

concentración en elastina y constituyen la “cubierta” que hace posible la vibración mucosa. En cambio, las capas más profundas, que incluyen el músculo vocal, presentan una mayor concentración de colágeno y forman el “cuerpo”, que aporta rigidez y estabilidad. Esta organización tisular explica la propagación de la onda mucosa en dirección infero-superior y la capacidad de las cuerdas vocales para adaptarse dinámicamente a las variaciones de tensión y presión durante la fonación (Figura 8) (Vahabzadeh-Hagh et al., 2018).

El sonido generado a nivel de glotis (tono fundamental) es modificado en las cavidades resonadoras (faringe, cavidad nasal y oral), adquiriendo resonancia y articulación. Esto proceso supone, por tanto, que haya una coordinación entre los diferentes órganos fonoarticulatorios (Hunter & Ludwigsen, 2017; Rakerd et al., 2019).

Figura 8

Capas de los pliegues vocales



Nota. Microanatomía del pliegue vocal adulto que ilustra el concepto de cuerpo-cobertura explicado por Hirano. Adaptado de *Development, Anatomy, and Physiology of the Larynx*, por Wadie, M., Adam, S. I., y Sasaki, C. T. (2013), en R. Shaker, P. Belafsky, G. Postma y C. Easterling (Eds.), *Principles of Deglutition* (cap. 13). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3794-9_13. Figura elaborada con apoyo de herramientas de inteligencia artificial.

3.3.6. Diferencias anatómicas: roedores como modelo animal

La emisión de sonidos audibles: un modelo anatómico-funcional común a humanos y roedores

Los roedores manifiestan la vocalización a través de sonidos audibles, como los chillidos, que se asocian generalmente a situaciones aversivas (Brudzynski, 2009). Se caracterizan acústicamente por tener una frecuencia inferior a 20 kHz y contener armónicos

(Park et al., 2024). Para producir sonidos audibles, los roedores hacen vibrar sus cuerdas vocales de manera similar a los humanos. Sin embargo, su capacidad para modular la tensión de las cuerdas vocales y generar una amplia y compleja gama de sonidos audibles es más limitada. Esto es debido a que, desde un punto de vista evolutivo, la laringe en humanos presenta adaptaciones anatómicas y funcionales que optimizan la producción vocal (Jürgens, 2002b; Simonyan, 2014; Simonyan & Fuertinger, 2015). La principal característica que marca esta diferencia entre especies es que la laringe humana presenta una estructura más simplificada, sin sacos laríngeos y membranas vocales, que permiten que las cuerdas vocales ondulen con mayor estabilidad (Nishimura et al., 2022).

Por otro lado, desde un punto de vista histológico, las cuerdas vocales de las ratas no presentan un ligamento vocal bien definido ni una organización por capas como en los humanos. En los roedores, la lámina propia no está dividida en tres capas bien diferenciadas (superficial, intermedia y profunda), sino que presenta una estructura más difusa. No obstante, a pesar de estas diferencias en la arquitectura histológica, en ambas especies el tejido conectivo contiene la misma composición bioquímica (elastina, colágeno y ácido hialurónico), responsables de las propiedades viscoelásticas de las cuerdas vocales (Sato, 2018a; Sato, 2018b).

Asimismo, la concentración de estos componentes varía de forma similar en roedores y humanos tanto en procesos fisiológicos (ej.: la edad) (Abdelkafy et al., 2007; Peterson et al., 2013; Branco et al., 2015; Beton et al., 2022; Friedman et al., 2024) como fisiopatológicos (Hirano et al., 2009; Yamashita et al., 2010). Además, al igual que en humanos, las cuerdas vocales en roedores presentan un porción anterior recubierta por epitelio escamoso estratificado y una porción posterior recubierta por epitelio respiratorio pseudoestratificado ciliado, aunque esta última porción es mayor en roedores. Todo esto permite que las vibraciones laríngeas se generen mediante principios biomecánicos comparables (Sato, 2018b).

Los humanos y los roedores también presentan similitudes en muchos de los cartílagos y músculos intrínsecos. De hecho, existe evidencia de que estas estructuras laríngeas se desarrollan de forma similar en ratas, ratones y humanos, lo que refuerza la validez del uso de roedores como modelo animal para el estudio de la vocalización (Alli et al., 2013). Al igual que los humanos, los roedores cuentan con tiroides, cricoides, aritenoides y epiglotis. Aunque estos animales carecen de cartílagos cuneiformes y corniculados, sí muestran cartílagos que son estructuras únicas en su especie. Estas, que han sido asociadas a la emisión de ultrasonidos, serán detalladas más adelante (Marques et al., 2007; Thomas et al., 2008; Thomas et al., 2009; Mahrt et al., 2016; Riede et al., 2017).

Por lo que respecta a la musculatura laríngea, se ha demostrado que estos animales contienen, al igual que los humanos, los músculos tiroaritenoides, cricotiroideo,

cricoaritenoides lateral y posterior. Sin embargo, carecen de músculos interaritenoides transverso y oblicuo. En su lugar, en los roedores existe un par de músculos delgados conocidos como cricoaritenoides superiores, que unen la superficie dorsal de los cartílagos aritenoides con la prominencia central del cartílago cricoides. Estos parecen estar implicados en la aducción de las cuerdas vocales (Inagi et al., 1998; Thomas et al., 2008).

La emisión de ultrasonidos: un modelo anatómico-funcional único en roedores

En la actualidad, la mayor diferencia estructural de la laringe entre humanos y roedores parece darse a nivel supraglótico. Se ha demostrado que diversas especies de roedores presentan una vía supraglótica mejorada, formada por estructuras anatómicas únicas que permiten la emisión de ultrasonidos. Los ultrasonidos son sonidos de alta frecuencia importantes para la comunicación de esta especie, sobre todo, en contextos sociales y de cortejo. Acústicamente se caracterizan por ser tonos puros con frecuencias superiores a 20 kHz (Knutson et al., 2002; Riede et al., 2017).

En concreto, se han identificado seis estructuras morfológicas clave para este proceso. Una de las principales estructuras es la bolsa ventral que actúa como resonador y modula las frecuencias de los sonidos. Además, el cartílago tiroides de los roedores presenta un borde rostro-ventral doblado y una protrusión mineralizada en su superficie medial. Estas modificaciones mejoran la resonancia y sirven como punto de apoyo para los pliegues vocales. Por último, está el cartílago alar, estructura que presenta un borde afilado que ondula al paso de aire con origen en la glotis. La frecuencia de estos sonidos es controlada por acción del músculo tiroaritenoides, que se inserta en el cartílago alar y cuya contracción parece determinar su posición respecto a la glotis. La distancia entre ambas estructuras parece determinar la frecuencia de los ultrasonidos, siendo mayor la frecuencia cuanto menor es la distancia entre ellas (Riede et al., 2017; Smith et al., 2021).

Estos estudios, centrados en la anatomía laríngea en diferentes especies de roedores, refutan modelos teóricos previos que han intentado explicar la producción de este tipo de sonidos. El primer modelo, conocido en inglés como '*hole-tone whistle model*', fue descrito por Robert en 1950 (Roberts, 1975a, 1975b; Riede, 2013). Según este, los ultrasonidos son generados después de que el flujo de aire procedente de la glotis impacte en un segundo estrechamiento, formado por la epiglotis y la base de la lengua (Riede, 2013; Henrywood et al., 2013). Sin embargo, ninguno de los estudios posteriores ha logrado identificar esta estructura (Brudzynski & Fletcher, 2010; Riede et al., 2017). Además, la epiglotis tampoco parece ser determinante en la producción de estos sonidos, pues su extirpación no suprime la emisión de ultrasonidos (Mahrt et al., 2016).

El segundo modelo, el '*modelo de impingencia plana*', defiende que el flujo de aire procedente de la glotis impacta sobre una pared interna de la laringe, en concreto, sobre una superficie plana del cartílago tiroides o probablemente de la epiglotis (Mahrt et al., 2016),

que genera un silbido autosostenido. Aunque el chorro glótico generado en la glotis y su interacción con la pared laríngea interna podría ser un mecanismo comparable en algunos aspectos a la resonancia y el control de las vocalizaciones humanas, como el silbido (Mahrt et al., 2016), la hipótesis defendida por este modelo es incompatible con la anatomía laríngea descrita en la actualidad (Riede et al., 2017).

Por lo que respecta a la implicación de las cuerdas vocales, algunos autores sugieren que las cuerdas vocales sí participan en este proceso. Histológicamente se ha demostrado que los cambios microestructurales del tejido laríngeo, en concreto, aquellos provocados por el envejecimiento, modifican las características acústicas y espectrales de los ultrasonidos (Peterson et al., 2013). Además, se ha observado que los músculos aductores de la laringe, como el cricotiroideo y el tiroaritenoido, están activos durante la emisión de ultrasonidos (Riede, 2011). Sin embargo, otros estudios apuntan a que las cuerdas vocales no son estrictamente necesarias, ya que la parte posterior de la glotis permanece abierta entre 1 y 2 mm durante la emisión de estos sonidos (Boulangier-Bertolus & Mouly, 2021).

A pesar de las diferencias específicas encontradas en la producción de ultrasonidos, las similitudes estructurales y funcionales entre la laringe de humanos y roedores, sobre todo, las relativas la histología, a la musculatura intrínseca y al mecanismo de vibración de las cuerdas vocales para la producción de sonidos audibles, apoyan el uso de los roedores como modelos animales para estudiar la actividad laríngea fonorrespiratoria. Además, a lo largo de los años son numerosos los estudios que han usado diferentes tipos de roedores para el estudio de la vocalización a nivel central (Zhang et al., 1994; Wiedenmayer et al., 2000; Sugiyama et al., 2010; Tschida et al., 2019; Michael et al., 2020; Veerakumar et al., 2023; Sharif et al., 2024), incluido las *naked-mole rats*, especie de animales que a pesar de sus condiciones extremas de adaptación parecen presentar mecanismos neuroanatómicos y funcionales de producción vocal similares (Barker et al., 2021).

3.4. Implicaciones clínicas

Las enfermedades cardiovasculares, como la hipertensión arterial y las arritmias cardíacas, presentan una elevada prevalencia en la actualidad. Aunque estos trastornos se han atribuido tradicionalmente a factores genéticos y a otros factores de riesgos conocidos, existe una creciente evidencia de que el estrés emocional y psicosocial diario puede contribuir de forma significativa a la aparición de este tipo de patologías (Esler, 2017; Fontes et al., 2023). En este contexto, se ha observado que la hiperactividad del sistema simpático no solo contribuye al desarrollo de la hipertensión, sino también a su mantenimiento a largo plazo (Simms et al., 2009; Esler, 2010; Malpas, 2010; Fisher & Paton, 2012; Briant et al., 2015).

Asimismo, otras investigaciones han demostrado que los trastornos de ansiedad se asocian con la hipertensión, lo que refuerza la relación directa entre el estado emocional y la salud cardiovascular. Esta asociación se atribuye a la activación del sistema nervioso simpático característica de los estados de ansiedad, que incluye un aumento del gasto cardíaco y de la resistencia vascular periférica (Johnson, 2019; de Silva et al., 2020). Estas respuestas son similares a las observadas en los seres humanos durante situaciones de estrés o amenaza, en las que se producen un incremento de la secreción de ACTH, junto a alteraciones cardiorrespiratorias como hipertensión, taquicardia y aumento del gasto cardíaco (Altemus et al., 2001).

Estos problemas de salud cardiovascular se han asociado con la disfunción del DMH/PeF, ya que el estrés prolongado en el tiempo puede desencadenar un aumento tanto en la actividad simpática como en la presión arterial a largo plazo (Korner, 2007). Aunque, aún se desconoce si esta disfunción tiene su origen en el DMH/PeF o en sus vías aferentes y/o eferentes, algunos autores sugieren que los receptores de serotonina 5-HT_{1A} pueden estar involucrados en este proceso, ya que la simpatoexcitación y taquicardia inducida por el DMH/PeF pueden ser inhibidas por la activación de estos receptores. Además, el estrés prolongado provoca cambios cardiovasculares similares a la ansiedad, y la activación constante de los receptores 5-HT₃ puede empeorar estas respuestas (Sévoz-Couche et al., 2013).

No obstante, el estrés no solo impacta sobre el sistema cardiovascular, sino que también tiene efectos sobre la respiración. Más concretamente, una situación de estrés o de pánico puede modificar la ventilación aumentándola. Esta respuesta de hiperventilación puede estar controlada ante una situación de lucha o huida o descontrolada ante un ataque de pánico (Suess et al., 1980; Meuret et al., 2017). Al mismo tiempo, el patrón respiratorio refleja tanto la naturaleza como la intensidad de las emociones experimentadas, ya sean positivas o negativas. Ante situaciones de miedo o ansiedad, la respiración se vuelve rápida

y superficial, mientras que durante los estados de relajación o calma la respiración suele ser más lenta y profunda. Esta relación entre emoción y respiración se hace evidente no solo en la influencia de los estados emocionales sobre el patrón respiratorio, sino también en cómo el control volitivo de la respiración puede influir en el estado emocional y reducir el estrés (Suess et al., 1980; Arch & Craske, 2006; Seppälä et al., 2014; Szulczewski, 2019).

Diversos estudios han demostrado que existe una interacción significativa entre las respuestas cardiovasculares y respiratorias, de modo que los cambios en una pueden influir en la otra. En el caso de los pacientes con apnea obstructiva del sueño, la hipoxia característica de esta enfermedad genera un aumento del tono simpático y de los niveles de noradrenalina que favorece la disfunción cardíaca (Fletcher, 2001; Caples et al., 2005; Braga et al., 2006; Zoccal et al., 2007; Zoccal et al., 2009, Dudenbostel & Calhoun, 2012). Por otro lado, estudios sobre la ansiedad en músicos, como la ansiedad por la interpretación musical, han demostrado que estos experimentan cambios fisiológicos significativos durante sus presentaciones, como aumento de la frecuencia cardíaca, la presión arterial y la alteración del tono autonómico. En estos casos, el aumento del flujo simpático y la disminución del flujo parasimpático afectan no solo al sistema cardiovascular, sino también a la respiración (Chao-Écija et al., 2023).

Por lo que respecta a la vocalización, existe una estrecha relación entre los trastornos emocionales y los trastornos de la voz. La disfonía psicógena es un ejemplo claro de cómo un desequilibrio emocional puede interferir en este proceso (Sruthi & Rahul, 2024). La disfonía psicógena es un tipo de trastorno que afecta a la voz, pero sin que exista una causa orgánica o neurológica evidente. La aparición de este trastorno está más relacionada con factores psicológicos y emocionales como la depresión, la ansiedad y el estrés (tanto crónico como agudo) y no tanto con un uso incorrecto del mecanismo vocal (Martinez & Cassol, 2015; Tezcaner et al., 2019; Clarós et al., 2019).

Otra disfonía asociada al estrés es la disfonía musculotensional. En ella, se observa un uso inadecuado de la musculatura laríngea, que lleva a un aumento de la tensión muscular y, sobre todo, una falta de relajación del músculo cricoaritenoso posterior. Este es controlado por el nA y actúa como abductor de las cuerdas vocales durante la fonación, impidiendo el cierre glótico. Además, se observa una descoordinación en la acción sinérgica y antagónica de los músculos laríngeos (Van Houtte et al., 2011; Fernández et al., 2020; Garaycochea et al., 2021).

La producción de la voz requiere un control neurofisiológico altamente integrado y preciso de la laringe. La sensibilidad de la voz ante el estrés y la expresión emocional, junto con la conexión entre los diversos mecanismos de control laríngeo y el sistema límbico, hace que la voz sea vulnerable al desarrollo de trastornos vocales (Baker, 2016). Así, las dificultades en la vocalización podrían estar relacionadas con un control respiratorio

deficiente y también con una desregulación del sistema nervioso autónomo. Dicha desregulación podría contribuir al desarrollo de disfonías relacionadas con el estrés, un trastorno común y cuya causa fisiológica aún se desconoce. Dentro de esta problemática aún no resuelta, la posible implicación del DMH/PeF en la regulación autonómica podría ser una pieza clave para comprender los mecanismos subyacentes a estas alteraciones vocales.

Aunque la comprensión de los circuitos hipotalámicos implicados en la regulación cardiorrespiratoria y en las respuestas defensivas ha avanzado de forma significativa, persisten notables lagunas en lo que respecta el papel del DMH/PeF en el control motor laríngeo. En concreto, se desconoce de qué manera esta región hipotalámica, reconocida como un centro clave de integración autonómica, respiratoria y conductual, modula la actividad de las motoneuronas laríngeas y la coordinación fina de los patrones respiratorios asociados a la vocalización.

En este contexto, el control laríngeo constituye un modelo funcional adecuado para ello, ya que requiere una integración precisa entre la actividad motora, los ajustes respiratorios y la modulación autonómica. El nA, como principal centro motor laríngeo y punto de convergencia de aferencias respiratorias, autonómicas y suprabulbares, emerge, de esta manera como un nodo integrador crítico para la expresión funcional de estas interacciones. Por tanto, estudiar la influencia del DMH/PeF sobre el nA permite abordar de manera directa y funcional los mecanismos neurales que subyacen a la integración hipotalámica del control laríngeo, respiratorio y cardiorrespiratorio.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS |

IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Estudios previos de nuestro grupo de investigación han descrito que el cPB-KF y la región A5 influyen sobre la resistencia laríngea, al modular la actividad de las motoneuronas laríngeas del nA (Lara et al., 2002). Estas mismas regiones son fundamentales para regular las respuestas cardiorrespiratorias y dependen de la actividad glutamatérgica del DMH/PeF y de la SGP (Díaz-Casares et al., 2009; Díaz-Casares et al., 2012; López-González et al., 2013; López-González et al., 2018; López-González et al., 2020; González-García et al., 2023).

Además, en investigaciones más recientes hemos demostrado que la activación de la SGPdl incrementa la expresión de c-Fos en poblaciones celulares ubicadas en las formaciones semicompacta y laxa del nA positivas para el factor de transcripción Foxp2. En este contexto, la SGPdl parece potenciar la actividad de las motoneuronas inspiratorias laríngeas al tiempo que reduce la actividad de las espiratorias. Todo ello, para facilitar la respuesta taquipnéica típica de la respuesta de defensa (González-García et al., 2024c).

Con estos estudios, hemos reforzado el uso de la técnica de “glotis aislada in situ” como herramienta fiable para registrar de forma continua y estable la presión subglótica en ratas anestesiadas y en correlación con el registro de parámetros cardiorrespiratorios y el registro neuronal unitario extracelular. Estos avances metodológicos y técnicos, junto a los resultados de los estudios previos de nuestro grupo de investigación, llevan a plantear si el DMH/PeF, debido a su estrecha relación funcional con la SGPdl, participa también en el control de la actividad laríngea.

En base al conocimiento descrito, se proponen las siguientes **hipótesis**:

HIPÓTESIS 1: la estimulación eléctrica continuada del DMH/PeF durante 1 hora incrementará la expresión del marcador de actividad neuronal c-Fos y mostrará coexpresión con el factor de transcripción Foxp2 en el nA.

HIPÓTESIS 2: con el registro unitario de la actividad extracelular del nA, mientras se estimula el DMH/PeF, se demostrará que esta región modula la actividad de las motoneuronas laríngeas ubicadas en el nA.

HIPÓTESIS 3: la activación del DMH/PeF, mediante su estimulación eléctrica y química, tendrá efectos sobre la variable presión subglótica.

En base a las hipótesis planteadas, los **objetivos** de esta tesis doctoral son los siguientes:

OBJETIVO GENERAL

Describir, en rata, la influencia que el DMH/PeF tiene sobre el nA en el control de la actividad laríngea con el propósito de identificar y ampliar el conocimiento actual sobre los mecanismos neuronales involucrados en la función respiratoria y fonatoria.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

OBJETIVO I: caracterizar la relación morfofuncional entre el DMH/PeF y el nA tras la estimulación eléctrica del DMH/PeF y mediante el análisis de la expresión y coexpresión de las proteínas c-Fos y Foxp2 en las diferentes formaciones del nA.

OBJETIVO II: caracterizar la actividad neuronal del nA mediante el registro neuronal unitario extracelular *in vivo*, comparando su patrón de disparo en reposo y tras la estimulación eléctrica del DMH/PeF.

OBJETIVO III: caracterizar el papel del DMH/PeF en la regulación de la respuesta laríngea y cardiorrespiratoria mediante estimulación eléctrica y química del DMH/PeF y registrando la presión subglótica mediante la técnica de “glotis aislada *in situ*”.

MATERIAL Y MÉTODOS

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Modelo animal

Se utilizaron un total de 43 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (OFA-SD IOPS Caw), no consanguíneas y libre de agentes patógenos (SPF, Specific-pathogen-free), de las que se excluyeron 6. Todas fueron proporcionadas por el laboratorio Charles Rivers (Barcelona, España) con una edad de 3 a 6 meses y un peso corporal que osciló entre los 300 y 350 gr.

Los animales fueron estabulados en el Centro de Experimentación Animal de la Universidad de Málaga bajo condiciones climáticas y lumínicas concretas: temperatura media de $21 \pm 1^\circ \text{C}$ y fotoperíodo de 12/12 horas luz/oscuridad. La alimentación se basó en una dieta estándar para animales experimentales (A04 Panlab) y agua descalcificada *ad libitum*.

Toda la experimentación se ha realizado conforme a la Directiva 2010/63/EU de la Unión Europea y a lo establecido en el Artículo 34 del RD 53/2013 del 1 de febrero. Este estudio ha sido aprobado por el Comité Ético para la Experimentación Animal de la Universidad de Málaga en noviembre de 2016 (57-2016-A) y de la Junta de Andalucía en abril de 2017 (30/03/2017/054). La duración total de la fase experimental del estudio ha sido de 4 años.

5.2. Protocolo quirúrgico

Anestesia del animal

Se utilizó pentobarbital sódico como anestésico. Se administró una dosis de ataque de 60 mg/kg por vía intraperitoneal (i.p.), mientras que para las dosis de mantenimiento se administró 2mg/kg por vía intravenosa (i.v.). Adicionalmente, se aplicó 100 mg/ml de lidocaína (Xilonibsa Aerosol 50 ml) de forma local en las regiones quirúrgicas para minimizar la estimulación nociceptiva provocada por las distintas manipulaciones intraoperatorias.

Para determinar el grado de anestesia y la necesidad de administrar dosis de mantenimiento se consideró la presencia/ausencia de reflejos, tales como el reflejo palpebral o de retirada de la pata trasera tras su pinzamiento. Durante los experimentos, además, se consideró como criterio la estabilidad o inestabilidad de los parámetros de frecuencia cardíaca, presión sanguínea y frecuencia respiratoria.

Rasurado del animal

Con el propósito de preparar al animal para la cirugía, se rasuró el triángulo de Scarpa de la pata trasera izquierda, la zona cervical anterior y la región parieto-occipital con ayuda de una esquiladora eléctrica. En los experimentos de registro neuronal, se rasuró de forma adicional la región dorsal del animal desde la zona cervical a la lumbar.

Canulación de vena y arteria femoral izquierda

Se palpó el pulso femoral en la zona del triángulo de Scarpa para identificar el punto de incisión. Una vez localizado, se aplicó lidocaína y se realizó una incisión cutánea, aplicando una disección roma para poder visualizar la vena y arteria femoral. Para la canulación de la vena femoral, se pasó un hilo de sutura (calibre 2/0, métrica 3) por debajo de sus secciones distal y proximal. Con la finalidad de aumentar el diámetro de la vena y el retorno venoso y, así, facilitar la canulación de la vena, se pinzó su parte proximal con pinzas hemostáticas miniaturizadas tipo bulldog (Aesculap). Tras aumentar el calibre, se anudó el hilo ubicado en la zona distal y se realizó una pequeña incisión transversal para insertar un catéter (calibre interior de 0,4 mm y calibre exterior de 0,8 mm), purgado con suero salino. Finalmente, fue fijado con hilos de sutura (calibre 2/0, métrica 3).

Para llevar a cabo la canulación de la arteria femoral, se pasaron dos hilos siguiendo el mismo procedimiento, aunque con ligeras diferencias. El hilo en la parte distal se anudó antes de aplicar la pinza hemostática, para facilitar el llenado de la arteria y aumentar su calibre. Después de colocar la pinza, se realizó una pequeña incisión en la arteria y se introdujo un catéter (calibre interior de 0,4 mm y un calibre exterior de 0,8 mm), también purgado, pero con suero heparinizado al 5%. Se fijó el catéter con hilos de sutura (calibre 2/0, métrica 3).

Finalmente, se emplearon grapas de 12 x 2,5 mm de Medicon Instruments para suturar la incisión cutánea. Luego, se conectó el catéter venoso a una llave de tres vías para la administración posterior de las dosis de mantenimiento de pentobarbital. El catéter arterial se acopló al transductor de presión para el registro de las variables de presión arterial y frecuencia cardíaca (Figura 9A).

Traqueotomía y canulación de la tráquea

Tras la aplicación de lidocaína, se realizó una incisión cutánea en la zona cervical medial anterior, siguiendo una dirección caudal, desde 1 cm por encima del cartílago cricoides hasta la inserción de los músculos esternocleidomastoideos. A continuación, para dejar al descubierto la tráquea se practicó una disección por planos musculares. Además, se aislaron los nervios laríngeos recurrentes para no lesionarlos durante todo el procedimiento. Para ello, se colocaron dos hilos de sutura (calibre 2/0, métrica 3) por debajo de la tráquea, de tal manera que los nervios quedaron por fuera del hilo.

Tras esto, se practicó una incisión transversal en la tráquea usando un termobisturí, entre los anillos traqueales siete y ocho, y se colocó una cánula metálica de 2,5 mm de diámetro interno en dirección caudal, que fue fijada a la tráquea con un hilo de sutura. Esta cánula, *a posteriori*, fue conectada a un neumotacógrafo para registrar y medir el flujo respiratorio (Figura 9A).

Disección del nervio vago

En los experimentos de registro neuronal, tras la disección y asilamiento del nervio vago se colocó un electrodo bipolar Ag/AgCl sobre dicho nervio. El electrodo fue aislado del tejido mediante la aplicación de una resina aislante de uso biomédico polivinilsiloxano (Virtual® Light Body Fast Set Wash, Ivoclar Vivadent) y con una película de laboratorio Parafilm™ M (Amcor PM996) (Figura 9B).

Técnica de “glotis aislada in situ”

Se practicó una segunda incisión en la tráquea para introducir una segunda cánula de di(2-etilhexil) ftalato (DEHP; 18G x 3/4” 1,25 x 20 mm) a la altura del tercer anillo traqueal y realizar, así, la técnica de *glotis aislada in situ*. La cánula se introdujo en una dirección rostral hasta alcanzar la altura del cartílago cricoides y se acopló a una llave de tres vías. Esta llave se conectó a dos dispositivos diferentes. Por un lado, a un controlador de caudal de aire digital de masa térmica (Bronkhorst Hi-Tec F-201CV-AGD-22-V) para asegurar el paso de un flujo de aire caliente (36-37°C) humidificado. El paso del aire se hizo en dirección ascendente hacia la glotis y a una velocidad constante que variaba entre 30 y 70 ml/min. Por otro lado, se conectó a un transductor aneroide (ADInstrument modelo FE141 ± 0,03 psi) para medir cambios en los niveles de presión subglótica (Figura 9A).

Al recibir un flujo constante de aire, cualquier cambio de presión sería indicativo de cambios en la resistencia laríngea. Finalmente, la cánula se fijó a la piel del animal con hilo de sutura (calibre 2/0, métrica 3). La lengua del animal también se fijó con hilo de sutura para evitar que posibles retracciones de la lengua inducidas por la estimulación alterasen la presión intraoral y, por tanto, la medición de la presión subglótica.

Canulación del esófago

Se usó un hilo de sutura para aislar y ligar el esófago en su parte más craneal. A continuación, se introdujo una cánula de propileno rellena de aire (0,8 mm de diámetro externo y 0,6 mm de diámetro interno) tras realizar una incisión longitudinal con termobisturí. La cánula se introdujo en dirección caudal, quedando 1 cm por encima del límite superior del esternón, y se fijó con hilo de sutura (calibre 2/0, métrica 3) en dos puntos diferentes, al esófago y a la piel del animal. Esta canulación permitió registrar, indirectamente, la presión pleural a partir de la presión esofágica.

Estereotaxia y parietostomía

El animal se colocó en posición decúbito prono en el aparato de estereotaxia (Kopf Instrument) sobre una mesa antivibratoria neumática (TMC sys 63530) y con la barra superior alineada 3,3 mm por debajo de la línea interaural (Paxinos & Watson, 2007). Se utilizaron las barras frontales del aparato para fijar al animal a nivel de boca y hocico y las barras laterales que alcanzan los conductos auditivos externos para fijar la cabeza.

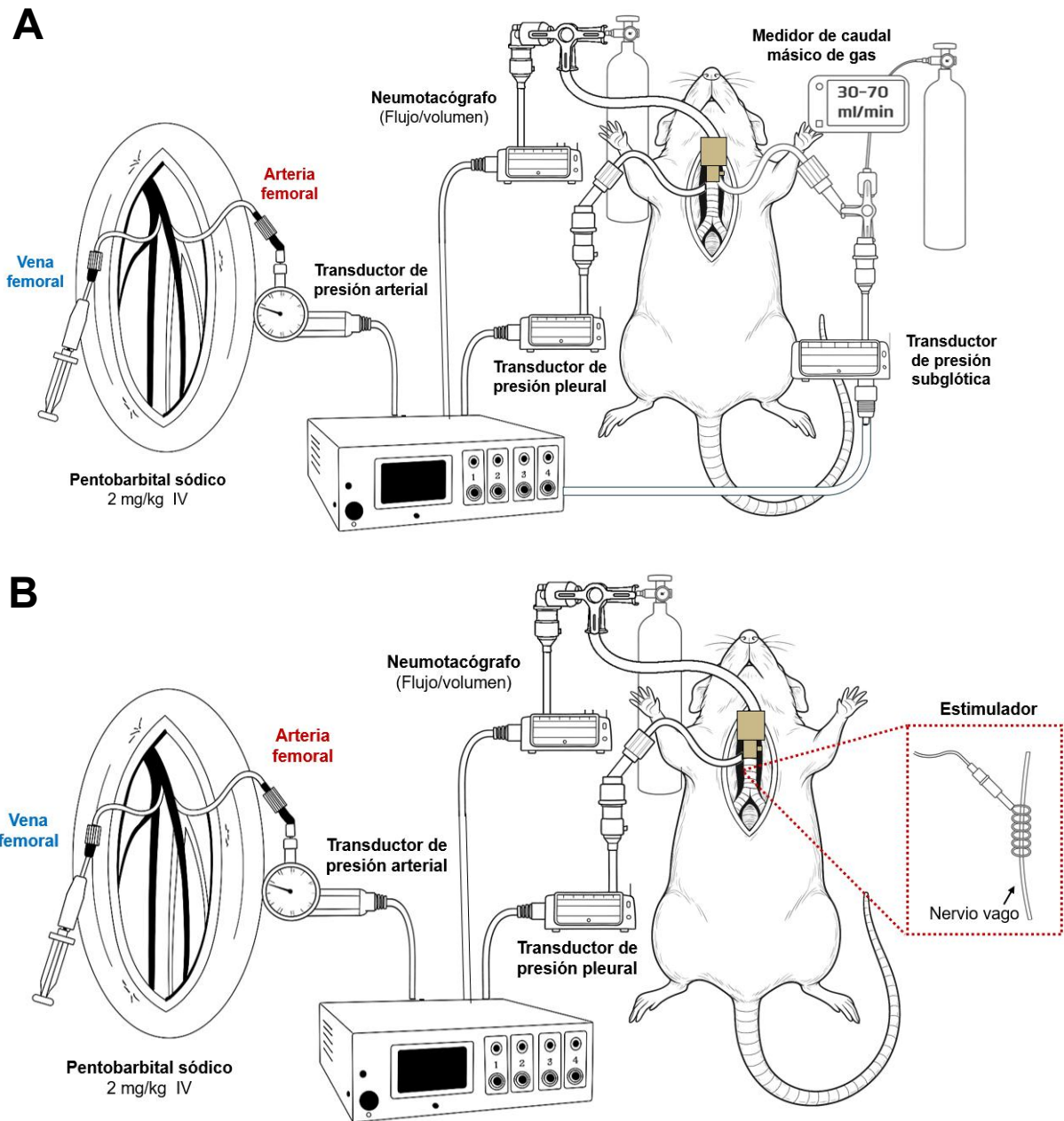
Se practicó una incisión cutánea longitudinal en la zona medial de la cabeza del animal y se aplicó una disección roma con espátula sobre la aponeurosis y los planos musculares hasta exponer la calota. Tomando como referencia lambda y bregma, se realizó una parietostomía de 4 mm de diámetro en DMH/PeF con un taladro quirúrgico (entre 2,2 mm y 3,12 mm posterior a bregma y 0,6 mm lateral a la línea media). Previo a las parietostomía, se cubrió el diploe con cera ósea para prevenir posibles hemorragias y embolias aéreas.

En los experimentos de registro neuronal, se retiró la región cerebelosa más posterior mediante aspirado para dejar al descubierto el tronco encefálico. Esto permitió visualizar el obex, que se tomó como punto de referencia para ubicar el nA.

Desde el inicio de la cirugía estereotáxica en adelante, la temperatura corporal del animal se controló ($37\pm 0,5$ °C) por medio de un sistema de manta termostática homeotérmica y una sonda rectal. También se aseguró la ventilación del animal de forma espontánea o asistida (CO₂ espiratorio al 5%). Adicionalmente, en los experimentos de registro neuronal, los ojos de los animales se cubrieron con pomada ocular (Novartis Farmacéutica, S.A.) para evitar su desecación.

Figura 9

Procedimiento quirúrgico para registro de variables



Nota. (A) Dibujo esquemático que muestra el montaje quirúrgico para el registro simultáneo de presión arterial, frecuencia cardíaca, flujo/volumen respiratorio, presión pleural y presión subglótica. Se muestran la canulación de vena y arteria femoral, la traqueotomía conectada al neumotacógrafo, la canulación esofágica y la técnica de “glotis aislada in situ”. (B) Dibujo esquemático de la disección y aislamiento del nervio vago y/o laríngeo recurrente para registro neuronal. Adaptado de material no publicado de la tesis doctoral *Mecanismos supraencefálicos involucrados en el control de la actividad laríngea*, de M. González García (2024a). Tesis doctoral disponible en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA). Figura elaborada con apoyo de herramientas de inteligencia artificial.

5.3. Estudio de inmunotinción: expresión y coexpresión de las proteínas c-Fos y Foxp2 en el nA por la estimulación eléctrica del DMH/PeF

Se llevó a cabo un bloque experimental para detectar, tras la estimulación eléctrica de DMH/PeF, cambios en la expresión de dos factores de transcripción (proteínas c-Fos y Foxp2) en el nA. Para ello, se usaron 10 animales divididos en dos grupos experimentales diferentes, estimulación (n=5) y control (n=5). El listado completo de materiales y equipos utilizados en este bloque se detallan en el Anexo I.

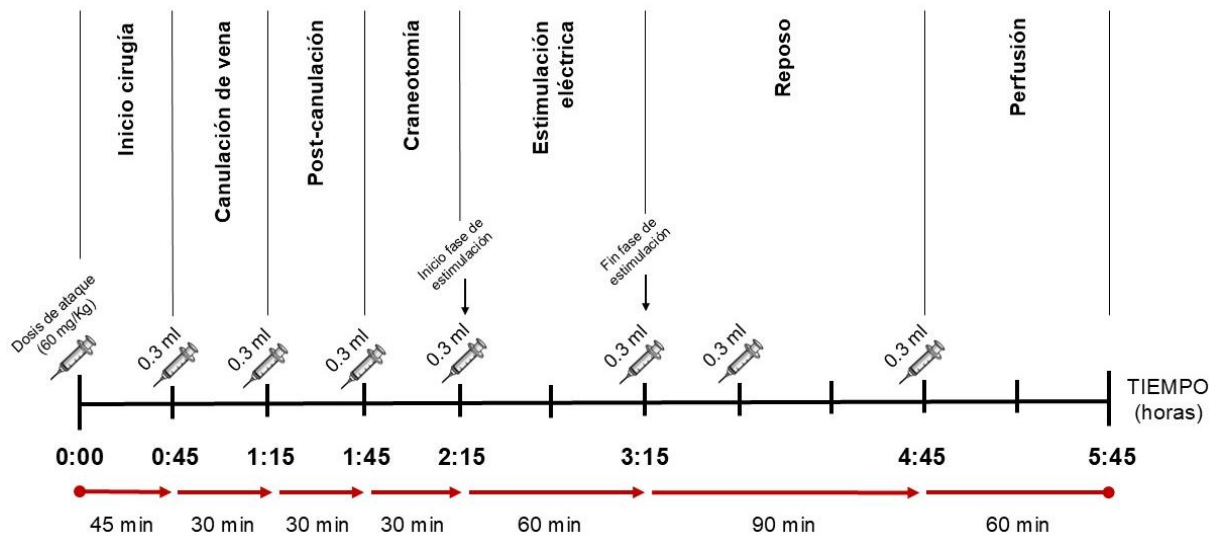
Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (dosis inicial: 60mg/kg i.p.; dosis de mantenimiento: 2 mg/kg i.v.) y la vena y la arteria femorales izquierdas se canularon conforme a lo descrito en el apartado “Canulación de vena y arteria femoral izquierda”. Para la estimulación del DMH/PeF, se realizó una parietostomía derecha y se introdujo un electrodo concéntrico bipolar (Rhodes Medical electrodes, NE-100) en el DMH/PeF (entre 2,2 mm y 2,76 mm posterior a bregma, 0,6 mm lateral a la línea media y 8,2 mm de profundidad; Paxinos & Watson, 2007). Las respuestas cardiorrespiratorias de los animales se utilizaron como criterio funcional para ajustar con precisión la posición del electrodo dentro del DMH/PeF.

Para garantizar que los cambios en c-Fos y Foxp2 se debían específicamente al estímulo aplicado y no a variaciones cardiovasculares mediadas por el sistema simpático, se administró guanetidina (10 mg/kg por i.v.). Solo los animales del grupo de estimulación recibieron estimulación eléctrica en el DMH/PeF, aplicando pulsos de 1 ms, 30-50 μ A a 100 Hz durante 5 segundos con intervalos de 60 segundos durante una hora. A continuación, se retiró el electrodo y los animales permanecieron en reposo durante 90 minutos.

Finalizado el tiempo de reposo, se realizó una perfusión vascular transcardiaca para la fijación del tejido. Para garantizar que los animales no presentaban reflejos, se inyectó previamente una nueva dosis de pentotal sódico (2mg/kg i.v.). Los pasos de este bloque experimental quedan resumidos en la figura 10, en la que se especifica las dosis de anestésico y los tiempos de administración.

Figura 10

Protocolo experimental: administración de anestesia, fases y tiempos



Nota. Diagrama temporal de las inyecciones de anestesia administradas en las diferentes fases experimentales del bloque de inmunotinción. La primera administración corresponde a la dosis de ataque (60 mg/kg), mientras que las administraciones posteriores se corresponden con dosis de mantenimiento (2mg/kg). En la parte inferior se indican los intervalos de tiempo en minutos (min) entre cada fase.

5.3.1. Procesamiento del tejido

Fijación y obtención del tejido

En cada animal se llevó a cabo una toracotomía medio esternal para exponer el contenido de la caja torácica y practicar una perfusión vascular transcárdica con una aguja estéril de 23G x 1" (0,6 mm x 25 mm). En primer lugar, se hizo circular una solución salina tamponada con fosfato (PBS 0,1M pH 7,3) a través del ventrículo izquierdo y se hizo una incisión en la aurícula derecha para permitir el drenaje. Tras la perfusión con PBS, se administró una solución fijadora de paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente. Se utilizó una bomba de perfusión peristáltica (modelo G628-1) con una velocidad de administración de 5-10 ml/min. Para finalizar, se hizo la extracción del cerebro y se postfijó, mediante inmersión, en el mismo medio de fijación durante 24 horas.

Conservación del tejido

Para garantizar una correcta infiltración del medio de inclusión y la obtención de cortes uniformes y efectivos, los cerebros se lavaron en una solución de PBS (0,1M pH 7,3) (3 lavados de 10 minutos cada uno). Los lavados se realizaron por inmersión y en agitación. Finalmente, los cerebros se conservaron en una solución de PBS azida sódica al 0,02%

(PBS-Az) a 4°C para prevenir el crecimiento microbiano y mantener la integridad del tejido hasta su uso.

Inclusión del tejido

Los cerebros se incluyeron en una solución líquida de agarosa al 3% (Sigma-Aldrich) diluida en PBS (0,1M pH 7,3) y calentada hasta su completa disolución. Posteriormente, los cerebros se colocaron en moldes metálicos, previamente enfriados, y se vertió la solución de agarosa líquida sobre estos hasta que se solidificaron por efecto del frío.

Obtención de secciones del tejido

Se obtuvieron cortes coronales (30µm) de la región del bulbo raquídeo de los cerebros, usando un vibratomo (5100mz Campdent Instrument). Los cortes se almacenaron y conservaron de forma seriada en una solución de PBS-Az al 0,02% en placas multipocillos de 24 compartimentos. Cada fila de la placa se destinó a un animal específico. Se comenzó colocando el primer corte en el primer compartimento, el segundo en el siguiente compartimento, y se continuó de esta manera hasta llenar el sexto compartimento de la fila. Después, se reinició el proceso desde el primer compartimento para los siguientes cortes. Finalmente, el tejido se conservó a 4°C hasta su uso.

5.3.2. Anticuerpos primarios

Los anticuerpos primarios utilizados en este estudio fueron anti-c-Fos, anti-Foxp2 y anti-ChAT. La proteína c-Fos es una proteína nuclear codificada por el gen *fos*, ampliamente usada como marcador para el estudio de la actividad neuronal (Sheng et al., 1990; Lara Aparicio et al., 2022). Su expresión aumenta a los 30 minutos post-despolarización y alcanza su pico máximo entre los 60 y 90 minutos (Morgan et al., 1991; Hoffman et al., 1993). Se analizó la expresión de esta proteína para investigar el papel de las motoneuronas laríngeas ubicadas en el nA, en respuesta a la estimulación eléctrica del DMH/PeF.

La proteína Foxp2, codificada por el gen *Foxp2*, es un factor de transcripción crucial en la regulación genética durante el desarrollo neuronal, sobre todo, en regiones del cerebro relacionadas con el procesamiento del lenguaje y la producción de sonidos (Stanić et al., 2018). Se evaluó la expresión de la proteína Foxp2 para determinar la presencia de grupos neuronales en el nA involucrados en la vocalización/respiración tras la estimulación eléctrica de DMH/PeF.

El doble marcaje de cada una de estas proteínas junto a la proteína ChAT se usó para identificar y caracterizar las motoneuronas colinérgicas presentes en el nA. Dado que las neuronas del nA participan en el control de funciones motoras como la fonación, la deglución y la respiración, y utilizan acetilcolina como neurotransmisor principal (Sapir et al., 2008; Cho et al.,

2020; Akunna et al., 2023; Blount et al., 2023), la detección de la expresión de ChAT fue crucial para confirmar la localización de las motoneuronas laríngeas en el nA.

La tabla 1 contiene información específica de los anticuerpos primarios utilizados. Todos ellos fueron diluidos en una solución de PBS con Tritón X-100 al 0,2% (PBS-Tx) y azida sódica al 0,02% (PBS-Tx-Az).

Tabla 1

Características de los anticuerpos primarios usados

Anticuerpos	Anti-c-Fos	Anti-Foxp2	Anti-ChAT
Especie inmunizada	Ratón	Oveja	Cabra
Especie inmunogénica	Humano	Humano	Humano
Marcaje	Nuclear	Nuclear	Citoplasmático
Casa comercial	Santa Cruz Biotechnology	RD Systems	Sigma Aldrich
Nº de catálogo	Sc-271243	AF5647	AB144P
Referencia	Staples et al., 2021	Geerling et al., 2017	Ryu et al., 2021

Nota. La selección de los anticuerpos se hizo en base a su especificidad, uso previo en tejido animal y disponibilidad comercial. Las referencias validan el uso de los anticuerpos seleccionados.

5.3.3. Protocolo de la técnica de inmunohistoquímica: doble marcaje c-Fos/ChAT y Foxp2/ChAT

Se seleccionaron cortes seriados del bulbo raquídeo espaciados cada 180 μm (≈ 20 cortes por animal) para asegurar la inclusión de secciones representativas de todo el eje rostro-caudal del nA y nRA. Todas las secciones se trabajaron en flotación, siguiendo un protocolo estándar de inmunohistoquímica doble basado en el método de avidina-biotina. La detección de los antígenos se realizó de manera secuencial. Ambos grupos experimentales (estimulación y control) se procesaron bajo las mismas condiciones.

El tejido fue pretratado con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3% durante 15 minutos para inactivar la enzima peroxidasa endógena. A continuación, los cortes se lavaron en PBS 0,1 M (3 lavados de 5 minutos) y se incubaron en el anticuerpo primario correspondiente (1:1,000 anti-c-Fos; o 1:1,000 anti-Foxp2) durante 24 horas a temperatura ambiente.

Al día siguiente, se realizaron lavados en PBS y los cortes se incubaron en sus respectivos anticuerpos secundarios biotinilados durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-IgG de ratón desarrollado en cabra (Vector Laboratories) o anti-IgG de oveja desarrollado en conejo (Vector Laboratories) (dilución 1:500 en PBS-Tx-Az).

Los cortes se lavaron de nuevo con PBS (3 veces) y se incubaron durante 1 hora en estreptavidina conjugada con peroxidasa (1:2,000; Sigma-Aldrich) diluida en PBS-Tx. Tras esto, se realizaron lavados con PBS (3 de 5 minutos) y la actividad de la peroxidasa se reveló con DAB al 0,05% (Sigma-Aldrich) y H₂O₂ al 3%. Además, se usó una concentración de 0,8 mg/ml de sulfato amónico de níquel (Carlo ERBA Reagents) para intensificar la reacción y obtener un color azul-violeta en el marcaje.

Posteriormente, para el marcaje citoplasmático de ChAT, se incubaron los cortes con el anticuerpo anti-ChAT (1:1,000) durante 24 horas, seguidos de un anticuerpo secundario anti-IgG de cabra (1:500; Thermo Fisher Scientific) desarrollado en burro durante 1 hora (dilución en PBS-Tx-Az). El revelado se realizó únicamente con DAB para obtener un marcaje color naranja-marrón. Finalmente, los cortes fueron lavados en PBS (3 veces), colocados en portaobjetos tratados con gelatina de oro (Panreac) y secados al aire durante 24 horas. Además, se deshidrataron con una serie de alcoholes de graduación ascendente, aclarados en xilol (Sigma-Aldrich) y cubiertos con el medio de montaje DPX (Sigma-Aldrich).

5.3.4. Protocolo de la técnica de inmunofluorescencia: doble marcaje c-Fos/Foxp2

Se siguió el mismo proceso de selección de cortes que el empleado en el protocolo de inmunohistoquímica (secciones cada 180 µm; ≈20 cortes por animal). Los cortes fueron procesados bajo un protocolo estándar de inmunofluorescencia indirecta y simultánea como se describe a continuación.

En primer lugar, el tejido se bloqueó con albumina de suero bovino al 4% (en inglés BSA; *Bovine Serum Albumin*) y se permeabilizó con PBS-Tx-Az durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, el tejido se incubó con los anticuerpos primarios, diluidos en la misma solución de BSA-PBS-Tx-Az (1:750 anti-c-Fos de ratón; 1:750 anti-Foxp2 de cabra) durante 48 horas a temperatura ambiente.

Transcurridos dos días, el tejido fue lavado en PBS (3 lavados de 5 minutos). Para la detección, fue incubado en anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos (1:1,000 Alexa Fluor 488, anti-ratón; 1:1,000 Alexa Fluor 594, anti-cabra) durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad (dilución en BSA-PBS-TX-Az). Se realizaron lavados en PBS (3 lavados de 5 minutos) y se llevó a cabo una contratinción nuclear con DAPI (1:10,000; Invitrogen) diluido

en PBS durante 10 minutos. Finalmente, tras un último lavado en PBS, los cortes se colocaron en portaobjetos gelatinizados y se cubrieron con un medio de montaje propio de inmunofluorescencia (Dako).

5.3.5. Análisis y cuantificación del marcaje inmunohistoquímico

Las imágenes histológicas de los cortes inmunomarcados doblemente con los anticuerpos c-Fos/ChAT y Foxp2/ChAT se adquirieron con un microscopio óptico BX61VS (Olympus), equipado con el software Olympus VS. Se emplearon objetivos de 10x, 20x y 40x. Para la cuantificación, se analizaron exclusivamente las microfotografías tomadas con un aumento de 10x.

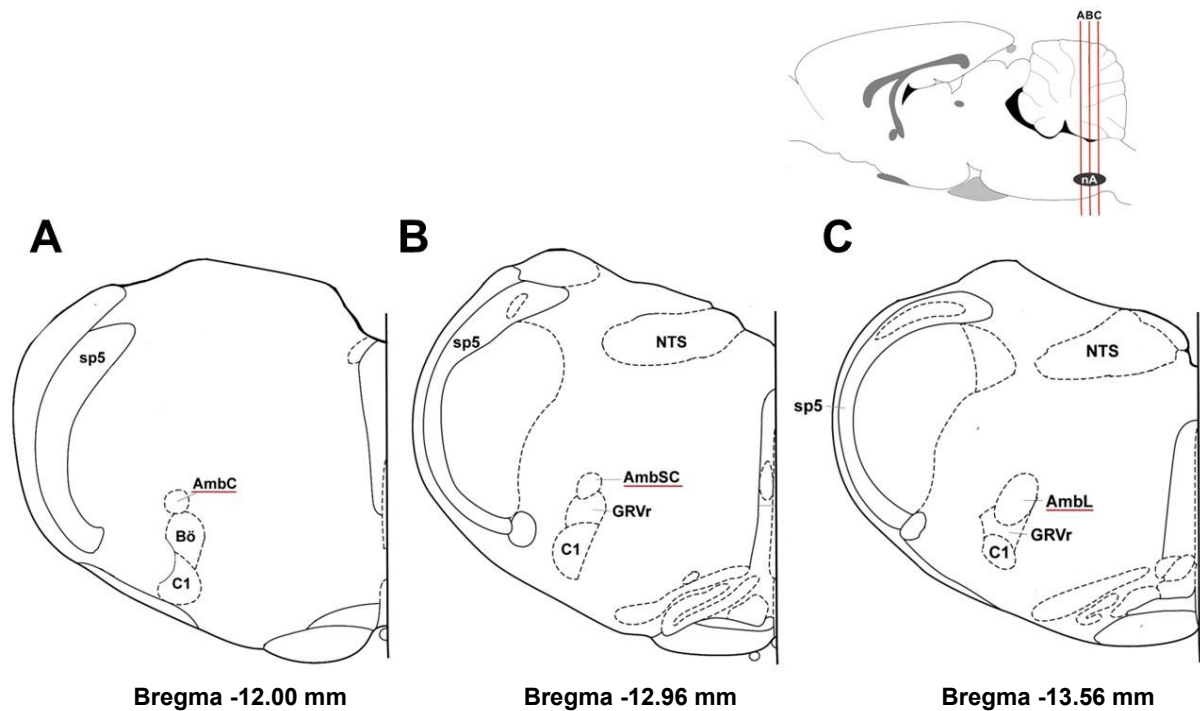
El análisis se realizó con el software ImageJ (National Institutes of Health, NHI). Las imágenes se convirtieron a escalas de grises para mejorar el contraste y facilitar la identificación del marcaje nuclear. Se llevó a cabo una cuantificación semiautomática de las células con marcaje nuclear positivo para c-Fos (c-Fos⁺) y Foxp2 (Foxp2⁺), identificadas por la coloración azul-violácea de sus núcleos.

El análisis de núcleos c-Fos⁺ y Foxp2⁺ se hizo tanto en células con marcaje positivo para ChAT como aquellas sin inmunorreactividad para este marcador. En concreto, se establecieron tres categorías de análisis celular: motoneuronas, no-motoneuronas y células totales (suma de ambas). En cada caso, se comparó el número de núcleos positivos entre los lados ipsilateral y contralateral a la estimulación.

La expresión de c-Fos y Foxp2 se analizó siguiendo la organización somatotópica del nA descrita por Pascual-Font et al. (2011) y Hernández-Morato et al. (2013). En concreto, se analizaron las tres subdivisiones del nA. Para la clasificación de los cortes en las distintas subdivisiones del nA se tomó como referencia bregma, de acuerdo con el Atlas de Paxinos y Watson (2007): formación compacta (-12,00 mm y -12,84 mm), semicompacta (-12,84 mm y -13,44 mm) y la formación laxa (-13,44 mm y -14,16 mm) (Figura 11). De forma adicional, se cuantificó la expresión nuclear de ambos marcadores en el nRA (rango de bregma entre -14.28 mm y -15.72 mm), siguiendo los mismos criterios y categorías de análisis empleados para el estudio del nA.

Figura 11

Subdivisiones del nA para el estudio de la distribución del marcaje para c-Fos y Foxp2



Nota. Representación esquemática de las subdivisiones del núcleo ambiguo (nA) establecidas para el análisis de núcleos positivos para c-Fos y Foxp2 tras la estimulación del DMH/PeF: (A) región compacta; (B) región semicompacta; y (C) región laxa (Pascual-Font et al., 2011; Hernández-Morato et al., 2013). Coordenadas de acuerdo con el atlas Paxinos y Watson (2007). Abreviaturas: AmbC: formación compacta del núcleo ambiguo; AmbSC: formación semicompacta del núcleo ambiguo; AmbL: formación laxa del núcleo ambiguo; Böt: complejo de Bötzing; C1: células C1 adrenérgicas; NTS: núcleo del tracto solitario; GRVr: grupo respiratorio ventral rostral; sp5: núcleo espinal del trigémino.

5.3.6. Análisis y cuantificación del marcaje inmunofluorescente

Las secciones doblemente marcadas con c-Fos/Foxp2 fueron analizadas mediante un microscopio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Alemania) y el software Leica LAS X LS (Leica Microsystems). Se usó el objetivo de 10x y el de 20x con inmersión en aceite. La visualización de la fluorescencia se realizó combinando los láseres de excitación de 488 nm y 568 nm, correspondientes a los fluoróforos Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 594, respectivamente. Se adquirieron imágenes considerando dos planos en el eje Z para asegurar la correcta identificación de las células inmunorreactivas en diferentes niveles focales.

Al igual que en el análisis de las secciones de microscopía óptica, se realizó una cuantificación semiautomática con el software ImageJ (NIH) tanto en lado ipsilateral como contralateral a la estimulación. Sin embargo, este análisis se hizo únicamente en las formaciones semicompacta del nA. Para el estudio de la coexpresión de las proteínas c-Fos/Foxp2 se establecieron tres categorías de células: células positivas para c-Fos y negativas para Foxp2 (c-Fos⁺/Foxp2⁻), células negativas para c-Fos y positivas para FoxP2 (c-Fos⁻/Foxp2⁺) y células con coexpresión de ambos marcadores (c-Fos⁺/Foxp2⁺).

La combinación de los canales de fluorescencia se realizó mediante el proceso de *merge* para obtener una única imagen compuesta, que permitió visualizar de manera simultánea las células solo c-Fos⁺, solo Foxp2⁺ y las que presentaban coexpresión de ambos marcadores.

5.4. Estudio neurofuncional: análisis y caracterización de la relación funcional entre el DMH/PeF y el nA

5.4.1. Caracterización de la actividad eléctrica neuronal del nA durante la estimulación del DMH/PeF

En esta serie de experimentos se registró la actividad neuronal unitaria extracelular en el nA, mientras se aplicaba estimulación eléctrica en dos regiones distintas: el DMH/PeF y/o el nervio vago derecho. Se realizó en un total de 4 animales. El objetivo fue analizar variaciones en la frecuencia de disparo y otras propiedades electrofisiológicas. El procedimiento descrito a continuación queda representado esquemáticamente en la figura 12. El material técnico y equipamiento utilizados para estos experimentos se detallan en el Anexo II.

Para la estimulación del DMH/PeF, el microelectrodo de estimulación (SNE 100, RODHES Medical Electrodes) se situó estereotáxicamente entre 2,2 mm y 2,76 mm caudal a bregma, 0,6 lateral a la línea media y 8,2 mm de profundidad desde la superficie de la calota. (Paxinos & Watson, 2007). Para verificar que la colocación del microelectrodo era adecuada, se observaron los cambios cardiorrespiratorios en el animal tras la estimulación eléctrica (30-40 μ A, 100 Hz, pulsos de 1 ms, durante 5 s) del DMH/PeF. Una vez confirmada la localización funcional, se realizó una estimulación de la zona (50-100 μ A, 1 Hz, pulsos de 0,1 ms) para llevar a cabo estudios orto y antidrómicos, así como análisis peri-post estímulo, para evaluar la modulación de la actividad neuronal unitaria desde DMH/PeF.

El nervio vago derecho fue aislado en la región cervical. Para su estimulación se empleó un electrodo bipolar Ag/AgCl fabricado con alambre de plata de 0,5 mm de diámetro (modelo ESW-F15N) y recubierto de teflón. El aislamiento de teflón se retiró para dejar al descubierto un tramo conductor de aproximadamente 2 mm en el extremo del cable, dándole forma helicoidal tipo muelle. El nervio vago se introdujo dentro de esta estructura, que sirvió de electrodo. La estimulación del nervio vago se llevó a cabo con una intensidad de 1 V, a una frecuencia de 1 Hz y un pulso de 0,1 ms (Subramanian et al., 2018).

La actividad neuronal unitaria en el nA se registró mediante el uso de electrodos de tungsteno (impedancia de 8-11 M Ω), fijados a un microposicionador electrónico con control remoto (modelo 607-W, David Kopf Instruments). El avance del microelectrodo y su contacto con el tejido cerebral se comprobó mediante cambios de impedancia observados en el osciloscopio. También se confirmó mediante control de audio, detectando variaciones en la frecuencia del sonido emitido por la penetración de este en el bulbo, y mediante el uso de un microscopio quirúrgico (modelo M-300, Leica). En concreto, el microelectrodo se introdujo en las formaciones semicompacta y laxa del nA considerando la posición del obex (entre

0,25 y 1,5 mm anterior al obex, 2 mm lateral a la línea media y a una profundidad de 2 a 2,5 mm desde la superficie) (Paxinos & Watson, 2007). Además, se colocó un electrodo de tierra (Ag/AgCl) en el tejido subcutáneo en zona lumbar. La impedancia del microelectrodo se comprobó de forma regular aplicando una señal de 1 KHz, ajustando la capacitancia del circuito hasta lograr su compensación, y verificando que los valores de impedancia en el dial del micropotenciómetro eran correctos (8-11 M Ω).

Las señales extracelulares fueron pre-amplificadas (modelo DP-311-00, ADInstruments) y sometidas a filtrado mediante un amplificador diferencial con un corte de frecuencia de 3 KHz y una atenuación de 6 dB/Oct, amplificándose en un factor 10. Estas señales fueron visualizadas en un osciloscopio de cuatro canales. Esto permitió observar *in situ* y simultáneamente potenciales de acción extracelulares (PAE), presión arterial y flujo respiratorio, así como evaluar las posibles relaciones entre ellos. Además, fue posible su almacenamiento para su estudio posterior.

Durante los registros, se limpiaba la punta del microelectrodo inyectando una corriente de 500 Hz (10 s, 0,005 mA durante 60 ms) para evitar variaciones en la impedancia debido al residuo tisular adherido. Para evitar diferencias de potencial y ruido por corrientes parásitas en el sistema y que pudiesen interferir en la precisión de las mediciones, todos los equipos de medición, soportes metálicos y conducciones de líquidos fueron apantallados. Además, se conectaron a una masa común para evitar diferencias de voltaje entre los componentes.

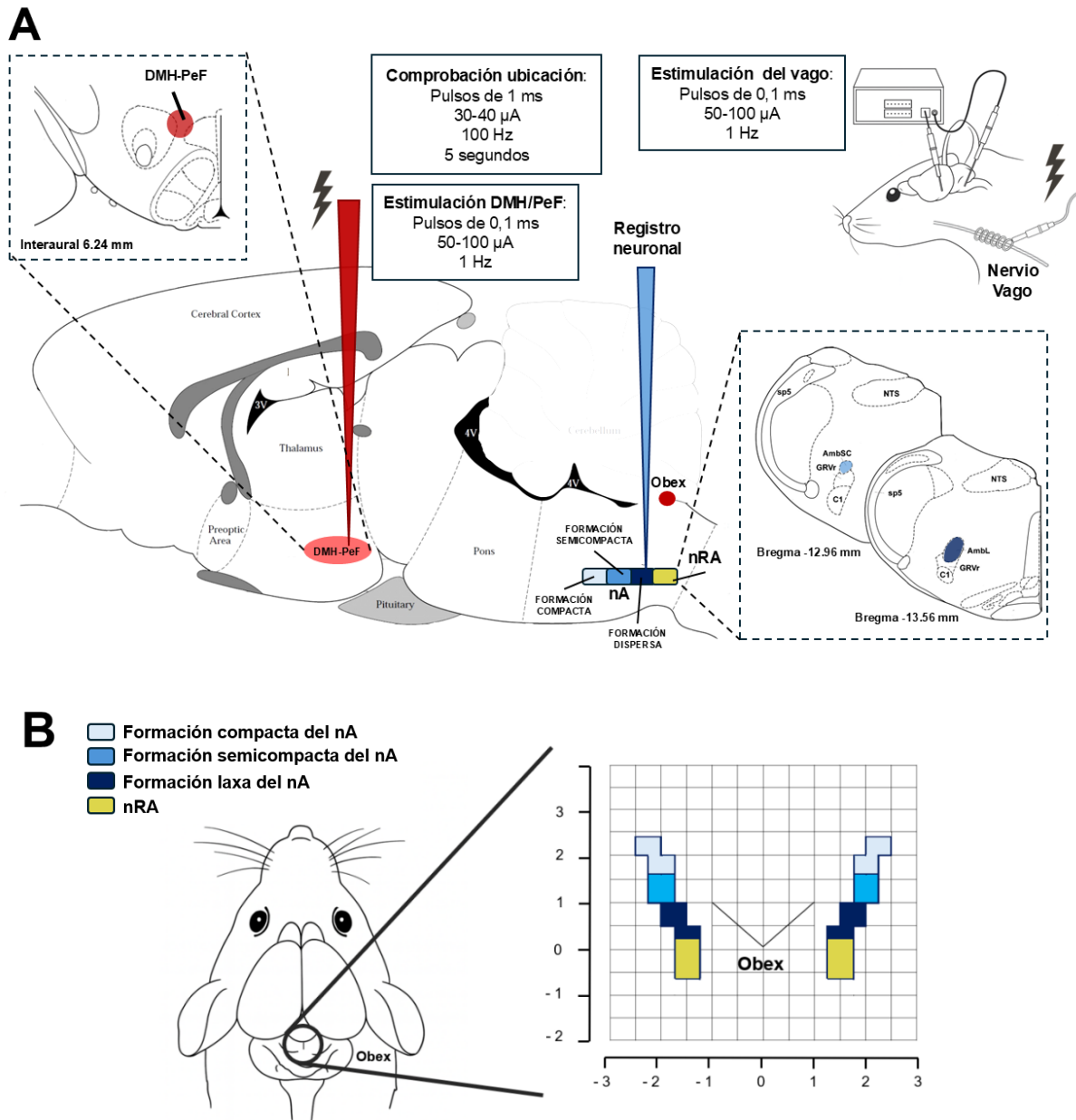
La señal preamplificada se amplificó adicionalmente con una ganancia de 10K (2%) para asegurar que la señal presentaba la suficiente intensidad para su análisis. Además, se aplicaron filtros de frecuencia para eliminar el ruido no deseado. En particular, se aplicó un filtro de alta frecuencia para eliminar señales superiores a 3 kHz y de baja frecuencia para eliminar señales por debajo de 100 Hz. Ambos filtros se aplicaron con una atenuación de 3 dB. Esto significa que las señales que estaban fuera del rango deseado experimentaron una reducción en su potencia, asegurando que solo las frecuencias relevantes, situadas entre 100 Hz y 3 kHz, se mantuvieron en la señal final, mejorando así la relación señal/ruido.

Las descargas neuronales fueron también monitoreadas a través de un amplificador de audio. Esto permitió que la actividad eléctrica de las neuronas se escuchara de forma inmediata, lo que facilitó la detección auditiva antes de visualizarla en el osciloscopio. Por tanto, durante la experimentación se tomó como referencia la actividad basal de las neuronas para optimizar la visualización de las espigas. Además, para evitar la generación de potenciales gigantes por aproximación del electrodo al soma neuronal, se controló la distancia entre ambos durante el registro.

Para verificar la relación entre la actividad unitaria de una neurona en el nA y su proyección desde el subgrupo del DMH/PeF, se utilizó un generador de corriente que enviaba pulsos de onda cuadrada a 1 Hz y 0,1 ms de duración, conectado a un electrodo de estimulación con intensidades de 0,05 a 0,5 mA. Se comprobó la impedancia de los electrodos utilizando una resistencia en serie (1k Ω) y midiendo la caída de potencial con un amplificador de alta impedancia. También se monitorizaron las corrientes de polarización en el circuito de estimulación. Al finalizar el experimento, se aplicó una corriente elevada (250 μ A durante 20 segundos) para microcoagular el tejido y confirmar la localización exacta de las neuronas registradas en el estudio histológico posterior.

Figura 12

Registro de la actividad neuronal unitaria del nA durante la estimulación del DMH/PeF



Nota. (A) Esquema representativo del montaje experimental para el registro de actividad unitaria en el nA durante la estimulación del DMH/PeF y del nervio vago derecho. Se muestran las zonas de estimulación, parámetros de estimulación y zona de registro. (B) Representación esquemática del bulbo raquídeo en vista dorsal, mostrando la localización del obex como punto de referencia para la inserción del microelectrodo en el nA. Abreviaturas: AmbSC: formación semicompacta del núcleo ambiguo; AmbL: formación laxa del núcleo ambiguo; C1: células C1 adrenérgicas; DMH/PeF: núcleo hipotalámico dorsomedial y área perifornical hipotalámica; GRVr: grupo respiratorio ventral rostral; nA: núcleo ambiguo; nRA: núcleo retroambiguo; NTS: núcleo del tracto solitario; sp5: núcleo espinal del trigémino. Figura elaborada con apoyo de herramientas de inteligencia artificial.

5.4.2. Caracterización de la respuesta de presión subglótica inducida por la estimulación eléctrica y química del DMH/PeF

Los parámetros laríngeos y cardiorrespiratorios fueron estudiados en reposo y post-estimulación eléctrica y química del DMH/PeF en 22 animales. Los valores de reposo de cada una de las variables estudiadas (frecuencia cardíaca instantánea, presión arterial, presión pleural, flujo respiratorio y presión subglótica) se tomaron como referencia para evaluar los cambios inducidos por la estimulación eléctrica y química. A continuación, se describe el procedimiento experimental seguido para el estudio de la presión subglótica en ambos tipos de estimulación. El material técnico y equipamientos usados se detallan en el Anexo II.

Caracterización de la respuesta de presión subglótica inducida por la estimulación eléctrica del DMH/PeF

En un total de 8 animales, se colocó un microelectrodo concéntrico bipolar (SNE 100, RODHES Medical Electrodes) estereotáxicamente entre 2,2 mm y 2,76 mm posterior a bregma, 0,6 mm lateral a la línea media y a una profundidad de 8,2 mm con respecto a la superficie de la calota para estimular eléctricamente DMH/PeF (Paxinos & Watson, 2007). La región fue estimulada con pulsos eléctricos de 1 ms durante 5 s, a 100 Hz y a una intensidad de 30–50 μ A. Durante la experimentación, se consideraron las respuestas de las variables cardiorrespiratorias medidas para garantizar que se estaba estimulando la región de interés. Además, se aumentó tanto la intensidad como el tiempo de estimulación (250 μ A CC durante 20 segundos) al final de cada experimento para facilitar la localización del DMH/PeF en su estudio histológico posterior.

Caracterización de la respuesta de presión subglótica inducida por la estimulación química del DMH/PeF

Se utilizaron 14 animales, que se subdividieron en grupo control (n=7) y grupo de estimulación (n=7). Las microinyecciones se hicieron siguiendo las mismas coordenadas que en la estimulación eléctrica. Se introdujo una microjeringa Hamilton (0,5 μ l; modelo Neuros 7000.5, ref. 65457-01, Hamilton Company) para realizar microinyecciones de PBS (50 nL, pH 7,4 \pm 0,1, 5 s de duración) en el grupo control. En el grupo de estimulación, se realizaron microinyecciones de glutamato (0,25 M, 50 nL, 5 s de duración). En cada animal, se definieron dosis de 50 nL de volumen que se administraron mediante una única microinyección. Cada microinyección fue controlada por una microbomba. Para localizar los puntos de microinyección en el estudio histológico posterior, el PBS y el glutamato se disolvieron en una solución de azul de Evans. La composición, concentración y la finalidad de los agentes químicos utilizados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2

Agentes químicos microinyectados para la estimulación química del DMH/PeF

Componente	Concentración	Finalidad
PBS	Solución al 0,1 M pH 7,4 ± 0,1.	Vehículo inerte para asegurar neutralidad fisiológica
Glutamato	Solución al 0,25M	Agente excitador para inducir actividad en el DMH/PeF
Azul de Evans	Dilución al 1% en PBS	Marcador histológico para localizar microinyección

5.4.3. Tratamiento histológico

Para concluir los experimentos, se administró una sobredosis de pentobarbital sódico y se practicó la decapitación del animal, ambos como métodos de eutanasia. Tras esto, se extrajo el encéfalo y tronco de encéfalo para fijarlos en una solución de formol al 5% (50 ml). Una vez fijado el tejido, se realizaron secciones de dicho tejido (80 µm) con un microtomo de congelación (Leica Instruments GmbH, Mod.1206) y se tiñeron con rojo neutro.

Las estimulaciones eléctricas y las microinyecciones químicas provocaron lesiones y tinciones con azul de Evans en el tejido, respectivamente. Ambos se tomaron como referencia para garantizar que las posiciones del microelectrodo y la microjeringa eran correctos para las estimulaciones del DMH/PeF.

5.4.4. Sistema de registro y análisis de las variables registradas

Análisis de la actividad neuronal

En los experimentos de registro neuronal se registró la Actividad Neuronal Unitaria. La actividad neuronal se monitoreó mediante el software LabChartPro, que permitió evaluar la forma, amplitud y frecuencia de los potenciales de acción. Además, se usó un osciloscopio de almacenamiento digital que permitió discriminar de manera efectiva la señal de una neurona específica, minimizando la interferencia de otras señales eléctricas. Para comprobar los efectos de la estimulación del DMH/PeF y/o el vago en la actividad neuronal se midió cuántas veces dispararon las neuronas por segundo tanto en su estado natural (reposo) como después de ser estimuladas.

En primer lugar, se analizó el periodo de latencia, que es el intervalo de tiempo transcurrido desde que se aplica un estímulo hasta que se registra el potencial de acción extracelular en la neurona. Para medirlo de manera precisa, se utilizó un osciloscopio equipado con funciones de almacenamiento digital y discriminación de ventana. El momento exacto de generación del potencial de acción se pudo identificar gracias a la capacidad del osciloscopio para captar y almacenar los datos de interés.

En el análisis de los **potenciales de acción extracelular (PAE)** registrados, se evaluaron tres componentes principales (Lorente de No, 1947; BeMent & Ranck, 1969; Lemon, 1985):

A. Potenciales extracelulares axónicos y somáticos: se compararon los PAE somáticos y axónicos en base a su forma, estabilidad y duración. El PAE somático es considerablemente más grande (50–100 veces) que el PAE axónico. Mientras que los PAE en el axón tienden a aparecer y desaparecer repentinamente con la inserción del electrodo, el PAE somático es más estable. El PAE axónico tiene una forma trifásica y carece de la inflexión que se observa entre el segmento inicial (SI) y el somato-dendrítico (SD). Cuando se aumenta la frecuencia de estimulación por encima de 200 Hz, la porción SD del PAE puede desaparecer. Además, el PAE somático tiene una mayor duración debido a la mayor capacitancia de la membrana somática.

B. Estimulación antidrómica (AD) vs. ortodrómica (OD): se determinó si los PAE registrados eran el resultado de estimulación antidrómica y no ortodrómica, utilizando varios criterios:

- Rotura del Complejo SI-SD: en la estimulación antidrómica se observa que la "rotura" del complejo entre el SI y el SD es más frecuente, especialmente a frecuencias de estimulación más altas. Esta rotura se refiere a una alteración en la forma esperada de la señal, lo que indica que el impulso viaja en la dirección opuesta a la normal, lo que es típico en la estimulación antidrómica.
- Amplitud y duración del PAE: el PAE ortodrómico (OD) tiende a tener una mayor amplitud (es decir, es más fuerte) y una duración más corta en comparación con el PAE antidrómico (AD). Un PAE OD más fuerte y breve puede ser un indicativo de la activación normal de la neurona, mientras que un PAE AD podría mostrar características distintas debido a su naturaleza inversa.
- Onda Pre-potencial Positiva: en registros cercanos al soma durante la estimulación OD, en ocasiones se detecta una onda pre-potencial positiva, que es un indicativo de la activación de sinapsis excitatorias, que ocurren en las dendritas de la neurona al mismo tiempo. La presencia de esta onda sugiere

que las sinapsis excitatorias están generando una respuesta previa al potencial de acción, lo que es más característico de la activación OD.

C. Identificación antidrómica (IA): para identificar la estimulación antidrómica, se aplicaron criterios adicionales:

- Latencia constante: el tiempo entre la estimulación y la captación del potencial AD debe ser constante. Si las latencias son menores de 100 μ s, se confirma la conexión directa al axón estimulado (retardo sináptico 0,5–1,0 ms). Para minimizar la inestabilidad del tráfico axónico, se utilizaron estímulos dobles con intervalos fijos.
- Respuesta en frecuencia: la capacidad para continuar estimulando a altas frecuencias está limitada por el periodo refractario axónico, aproximadamente entre 0,5 y 2,0 ms para el SNC. Se realizaron estímulos en pares hasta encontrar el umbral, y con estímulos de tres o cuatro pulsos supramáximos se pudo predecir cuáles se transmitirían. En respuestas transinápticas no se observan respuestas múltiples a altas frecuencias y la primera respuesta suele mostrar variabilidad.
- Prueba de colisión: se evaluó si el PAE AD puede transmitirse cuando se encuentra con el período refractario causado por un potencial de acción OD de descarga natural. Para llevar a cabo esta prueba, se empleó un generador de pulsos controlado por un generador de rampa, que envía estímulos AD en el momento en que se detecta un PAE. El intervalo mínimo necesario para evitar la colisión se calcula con la fórmula: $t = 2T + PR$, donde (t) es el intervalo mínimo, (T) es el tiempo de conducción desde el sitio de estimulación al soma, y (PR) es el periodo refractario del axón. Se debe considerar también un tiempo adicional durante la estimulación antidrómica para descargar la capacitancia de la membrana axónica, denominado "u", que se estima en aproximadamente 0,2 ms.

Para identificar de manera precisa la naturaleza unitaria de la actividad neuronal fue fundamental seguir ciertos criterios. Primero, se buscó obtener registros de PAE cercanos al soma de la neurona (sin rozarla), ya que permitió captar espigas de mayor amplitud en comparación con los registros obtenidos de otras unidades neuronales cercanas. Esta diferencia en amplitud se utilizó inicialmente para medir la frecuencia de los PAE. Al analizar el número de espigas de mayor amplitud dadas en un periodo de tiempo determinado, se pudo calcular la frecuencia de disparo de la neurona.

Esta diferenciación se consiguió gracias a un discriminador de ventana, dispositivo que permitió identificar y diferenciar los PAE en función de su amplitud y polaridad. Estableciendo un rango de amplitudes, el discriminador aseguró que solo los PAE que

cumplían con criterios específicos fueron registrados, mientras que se descartaban las señales no deseadas. También distinguió entre las polaridades, lo que proporcionó información adicional sobre la actividad sináptica.

Por otro lado, se utilizó un generador de impulsos de onda cuadrada para traducir los PAE en impulsos TTL (Transistor-Transistor Logic). Este proceso fue fundamental para facilitar el análisis y procesamiento en sistemas digitales de las señales obtenidas. Para verificar esta conversión, los impulsos TTL generados se mostraban en un segundo canal del osciloscopio con posibilidad de pausar la imagen. Todo ello, permitió la comparación de una actividad sincrónica entre los PAE y los impulsos TTL.

Tras la caracterización de las propiedades electrofisiológicas de la actividad unitaria de las neuronas del nA durante la descarga espontánea e inducida por la estimulación del DMH/PeF, se elaboraron histogramas periestímulo para confirmar la presencia de excitaciones e inhibiciones, así como la posible modulación cardiorrespiratoria de estas neuronas. En función de la actividad y la localización anatómica, los patrones de descarga de las neuronas se clasificaron en seis grupos funcionales diferentes: neuronas inspiratorias crecientes, neuronas inspiratorias decrecientes, neuronas espiratorias E1, neuronas espiratorias E2, neuronas cardiovasculares y neuronas sin modulación cardiorrespiratoria (s/m). Para el análisis y caracterización de la actividad neuronal se consideraron las explicaciones en tiempo real que se grabaron durante los experimentos, así como las grabaciones de las señales neuronales que se digitalizaron y almacenaron en cintas VHS.

Análisis de las variables laríngeas y cardiorrespiratorias

Las variables registradas en los experimentos de estimulación eléctrica y química fueron: ECG, presión arterial, flujo respiratorio, presión pleural y presión subglótica. Con la medición de estas variables se pudo calcular la frecuencia cardíaca instantánea, presión arterial (sistólica/diastólica y media), la frecuencia respiratoria instantánea y el tiempo inspiratorio/espiratorio.

Las señales de las variables registradas, una vez obtenidas y amplificadas, fueron enviadas a un panel de conexiones múltiples para ser transmitidas a un sistema de almacenamiento digital (Neurocorder de Neuro-Data, modelo DR-890) y a un convertidor analógico-digital multiplexado (PowerLab 8/30). La frecuencia de muestreo utilizada fue de 11 KHz, con un rango de trabajo de ± 8 voltios. Finalmente, cada variable fue almacenada en un PC para ser analizadas usando el software LabChartPro (PowerLab System, ADInstruments®/ LabChart Software, versión 8.0, Sydney, Australia).

En la estimulación eléctrica, las variables fueron registradas y analizadas durante un periodo de 5 segundos en tres momentos diferentes: antes de la microestimulación eléctrica

(reposo del animal), durante la microestimulación (5 segundos de duración) y 4 minutos después de la microestimulación (recuperación). En cada uno de los periodos analizados, se consideró la media de la respuesta cardiorrespiratoria y laríngea obtenida en dicho periodo. En el caso de la estimulación química, las variables también fueron registradas y analizadas de la misma manera en los mismos periodos clave que en la estimulación eléctrica. En este caso, en el periodo de estimulación, para el análisis de los cambios cardiorrespiratorios y laríngeos, se tuvo en cuenta exclusivamente el momento en el que la respuesta presentaba un valor máximo. Asimismo, el periodo de tiempo en el que las variables registradas volvían a los niveles de reposo tras la estimulación con glutamato presentó una media de unos 30 minutos.

5.5. Análisis estadístico

El análisis y procesamiento de los datos se realizó adaptando las pruebas estadísticas a las características de cada variable experimental. Se utilizaron los programas IBM® SPSS® Statistics (versión 28.0.1.1) y GraphPad Prism 9.

5.5.1. Análisis estadístico del estudio de inmunotinción

En los bloques de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia se incluyeron dos grupos independientes de animales: estimulación (n=5) y control (n=5). En cada grupo, se comprobó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Tras esto, se aplicó la prueba t de Student para muestras relacionadas para comparar la expresión de las proteínas c-Fos y Foxp2 entre los lados ipsilateral y contralateral. Para las comparaciones inter-grupo (reposo vs. estimulación) se empleó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para muestras independientes. Los datos se expresaron como media \pm SEM y se consideraron significativos valores de $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$. Solo se consideraron los animales cuya histología confirmaba que los microelectrodos se localizaban en el DMH/PeF.

5.5.2. Análisis estadístico del estudio neurofuncional

En los bloques de registro neuronal y estimulación eléctrica, se evaluó en primer lugar la normalidad de las variables mediante la prueba de Shapiro-Wilk, para adecuar los datos a una distribución normal. Una vez confirmada la normalidad, se aplicó la prueba t de Student para muestras relacionadas, dado que en ambos casos el diseño experimental adoptado fue intra-grupo o de medidas repetidas (mediciones tomadas en los mismos animales bajo diferentes condiciones experimentales). Esta prueba permitió comparar las variables registradas antes y durante la estimulación eléctrica de DMH/PeF (presión subglótica, presión arterial, ECG, tiempos respiratorios, etc.), así como analizar los cambios en la actividad neuronal unitaria bajo las diferentes condiciones de estimulación (DMH/PeF, nervio vago o sin estimulación).

En el caso del bloque de estimulación química, se incluyeron dos grupos independientes de animales: un grupo control estimulado con PBS (n=7) y un grupo experimental estimulado con glutamato (n=7). En ambos grupos, las variables fisiológicas fueron registradas en reposo y tras la aplicación de la estimulación química. Por tanto, la normalidad de los datos también se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Cuando se confirmó la normalidad, se utilizó la prueba t de Student para muestras relacionadas para comparar las mediciones intra-grupo (reposo vs. estimulación). Para las comparaciones entre grupos (PBS vs. glutamato), dado que en este caso el diseño fue inter-grupo, se empleó la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney para muestras independientes.

Al igual que el estudio de inmunotinción, todos los datos se expresaron como media \pm SEM y las comparaciones se realizaron considerando valores de significancia estadística de $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$. Además, para garantizar la calidad del análisis de los datos, solo se consideraron aquellos animales cuya histología confirmaba la correcta localización de los microelectrodos y microinyecciones. Asimismo, se consideraron los animales que mostraron actividad neuronal estable durante la experimentación.

VI. RESULTADOS

6.1. Interacción DMH/PeF y nA: experimentos c-Fos/Foxp2/ChAT-ir

Con el objetivo de analizar las posibles interacciones anatomofuncionales entre el DMH/PeF y las motoneuronas laríngeas del nA en rata, se estudió bilateralmente la inmunoreactividad de las proteínas c-Fos y Foxp2 (c-Fos-ir y Foxp2-ir) junto a la inmunorreactividad de ChAT (ChAT-ir) en tinciones dobles y a lo largo de todo el eje rostro-caudal del nA y el nRA bajo la estimulación eléctrica del DMH/PeF (n=10). En este análisis, dividimos el nA en tres dominios diferentes (compacto, semicompacto y laxo), considerando que las motoneuronas laríngeas se ubican en estas dos últimas formaciones. Además, también incorporamos el nRA. Después de identificar las subdivisiones con mayor expresión de c-Fos, realizamos la cuantificación bilateral de células con coexpresión de c-Fos-ir/Foxp2-ir, tanto en ratas estimuladas como control. La cuantificación nuclear se hizo en 3 categorías celulares diferentes: motoneuronas, no-motoneuronas y número de células totales.

En conjunto, los resultados de este bloque experimental mostraron que la estimulación eléctrica del DMH/PeF induce un aumento significativo (con predominio en lado ipsilateral) de la expresión de c-Fos en el nA (especialmente en su formación semicompacta) y en el nRA, con un destacado reclutamiento de neuronas Foxp2⁺ en dicha formación. En cambio, la expresión global de Foxp2 no mostró cambios significativos entre ambos grupos de animales experimentales.

6.1.1. Distribución de neuronas c-Fos-ir y su colocalización con ChAT

Animales control: ausencia de estimulación eléctrica del DMH/PeF

En los animales control (n=5), en los que se colocó el electrodo sin llegar a estimular, la inmunorreactividad para c-Fos fue baja en todas las subdivisiones del nA y nRA, pero mostró una ligera asimetría ipsilateral-contralateral en todas los dominios del nA y en el nRA. Al comparar la inmunorreactividad de c-Fos entre ambos lados y en cada una de las poblaciones celulares establecidas, se detectó un predominio ipsilateral significativo similar en los grupos celulares de no-motoneuronas y células totales de las formaciones laxa ($p < 0,05$), semicompacta ($p < 0,05$) y compacta ($p < 0,05$). El incremento ipsilateral en estos grupos celulares fue más marcado en el nRA ($p < 0,01$) (Tabla 3; Figuras 13 y 14).

Animales estimulados: estimulación eléctrica del DMH/PeF

En los animales estimulados eléctricamente (n=5), la expresión de c-Fos aumentó notablemente en el lado ipsilateral en todas las subdivisiones del nA y nRA, pero con ciertas diferencias según el grupo celular (Figuras 13 y 14). Mientras que en las formaciones laxa y semicompacta del nA se detectó un predominio ipsilateral de c-Fos en todos los grupos celulares analizados (motoneuronas $p < 0,05$; no-motoneuronas $p < 0,01$; y células totales $p < 0,01$), en la formación compacta y en el nRA estas diferencias solo fueron significativas

en no-motoneuronas ($p < 0,05$) y en células totales (formación compacta $p < 0,05$; nRA $p < 0,01$) (Tabla 3; Figuras 15, 17A y 18).

Animales control vs. animales estimulados

Al comparar la magnitud de las diferencias (valores Δ) en la lateralidad entre grupos de animales (control vs. estimulados) se observaron diferencias significativas en la expresión de c-Fos en varios dominios del nA y en el nRA (Tabla 3; Figuras 13 y 14). El cambio más marcado se observó en los valores Δ de las motoneuronas ($p < 0,001$), no-motoneuronas ($p < 0,05$) y células totales ($p < 0,001$) ubicadas en la formación semicompacta. En el nRA también se detectaron cambios significativos en los valores Δ de motoneuronas ($p < 0,05$), no-motoneuronas ($p < 0,001$) y células totales ($p < 0,001$). En el caso de la formación laxa se observaron incrementos menos pronunciados, pero significativos en el grupo de motoneuronas ($p < 0,05$), no-motoneuronas ($p < 0,05$) y células totales ($p < 0,05$).

Estas diferencias en los valores entre el grupo control y animales estimulados sugieren que la activación del DMH/PeF promueve un patrón ipsilateral de reclutamiento neuronal dentro de la red motora laríngea. Este reclutamiento parece producirse, principalmente, en poblaciones neuronales localizadas en la formación semicompacta del nA y en el nRA. También parece tener un efecto ipsilateral consistente sobre poblaciones neuronales de las formaciones laxa y compacta, aunque de forma selectiva y menos marcada.

6.1.2. Distribución de neuronas Foxp2-ir y su colocación con ChAT

Animales control: ausencia de estimulación eléctrica del DMH/PeF

En el grupo de animales control ($n=5$) se observó una distribución de células Foxp2-ir bilateral, aunque con predominio moderado de esta expresión en el lado ipsilateral a la posición del electrodo en, prácticamente, todas las formaciones del nA y nRA. Este patrón se mantuvo en cada uno de los grupos celulares analizados (motoneuronas, no-motoneuronas y nº total de células). Al comparar la inmunorreactividad de Foxp2 entre ambos lados y en cada una de las poblaciones celulares, se detectaron diferencias ipsilateral-contralateral estadísticamente significativas en la formación dispersa (población total, $p < 0,05$), en la formación semicompacta (neuronas no-motoneuronas y nº total, $p < 0,05$) y en el nRA (neuronas no-motoneuronas y nº total, $p < 0,05$). La inmunorreactividad para Foxp2 en motoneuronas fue mínima o inexistente a ambos lados del nA y nRA (Tabla 3; Figuras 13 y 14).

Animales estimulados: estimulación eléctrica del DMH/PeF

En el grupo de animales estimulados ($n=5$), el patrón de expresión de este marcador se mantuvo similar al grupo control. Al comparar la distribución de células Foxp2-ir en ambos lados y entre todos los grupos celulares analizados, se observó un perfil de expresión

bilateral, con un ligero predominio ipsilateral en la formación semicompacta (neuronas no-motoneuronas y nº total, $p < 0,05$) y en el nRA (neuronas no-motoneuronas y nº total, $p < 0,05$) (Tabla 3; Figuras 13, 14, 16, 17B y 18).

Animales control vs. animales estimulados

Al comparar la magnitud de las diferencias (valores Δ) entre el número de células inmunomarcadas en el lado ipsilateral y contralateral de todas las subdivisiones del nA y nRA y en cada uno de los grupos celulares establecidos, no se encontraron diferencias significativas tras la estimulación del DMH/PeF (Tabla 3; Figuras 13 y 14).

Tabla 3

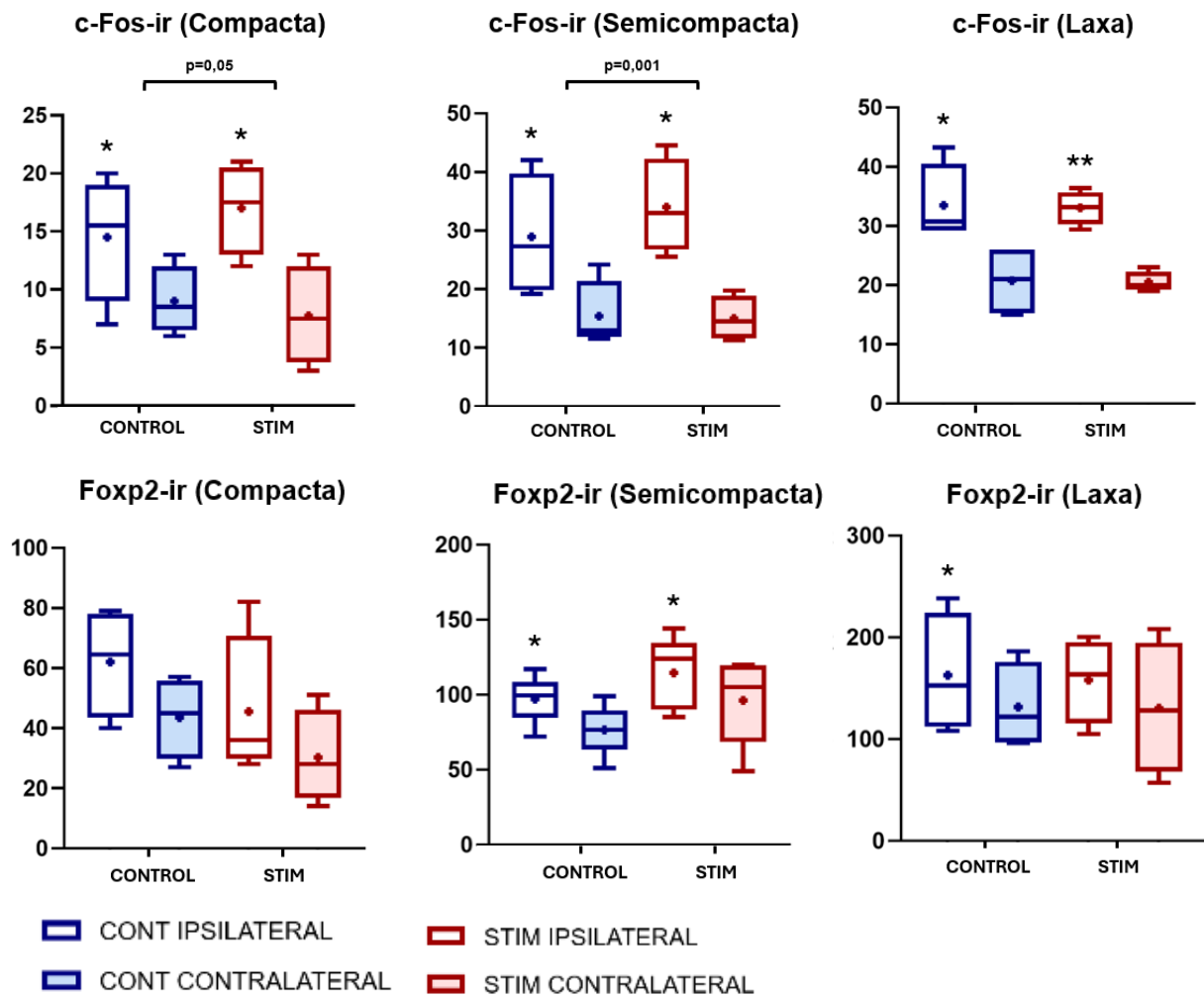
Cuantificación relativa y distribución de células inmunorreactivas para c-Fos y Foxp2 (c-Fos-ir y Foxp2-ir) dentro del nA y nRA en animales no estimulados (control) y en animales con estimulación eléctrica del DMH-PeF (estimulados). El nA se dividió en sus tres formaciones clásicas (laxa, semicompacta y compacta) y también se analizaron los lados ipsilateral y contralateral.

Análisis por inmunohistoquímica (c-Fos/ChAT y Foxp2/ChAT)													
		CONTROL (n=5)						ESTIMULADOS (n=5)					
		IPSILATERAL			CONTRALATERAL			IPSILATERAL			CONTRALATERAL		
		Moto	No-Moto	Total	Moto	No-Moto	Total	Moto	No-Moto	Total	Moto	No-Moto	Total
FORMACIÓN LAXA	c-Fos-ir	0,5 ± 0,25	33 ± 3,44*	33,49 ± 3,32*	0 ± 0	20,75 ± 3,04	20,75 ± 3,04	0,8 ± 0,22*	32,25 ± 1,65**	33,05 ± 1,44**	0 ± 0	20,5 ± 0,87	20,5 ± 0,87
	Foxp2-ir	2,91 ± 1,47	160 ± 30,15	162,91 ± 29,66*	1,25 ± 0,63	130,41 ± 21,56	131,66 ± 21,43	1,57 ± 0,65	156,6 ± 20,2	158,13 ± 20,83	0,32 ± 0,23	130 ± 32,94	130,32 ± 32,8
	Δ c-Fos-ir	0,49 ± 0,25	12,25 ± 3,47	12,74 ± 3,23				0,8 ± 0,22†	11,75 ± 1,55	12,55 ± 1,39			
	Δ Foxp2-ir	1,66 ± 0,84	29,59 ± 9,48	31,25 ± 8,94				1,25 ± 0,72	26,56 ± 22,19	27,81 ± 21,82			
FORMACIÓN SEMICOMPACTA	c-Fos-ir	1,65 ± 0,21	27,3 ± 5,1*	28,95 ± 5,29*	0,57 ± 0,24	14,83 ± 2,92	15,39 ± 2,95	5 ± 0,72**	29 ± 3,74**	34 ± 4,05**	0 ± 0	15 ± 1,9	15 ± 1,9
	Foxp2-ir	0 ± 0	97,14 ± 7,21*	97,14 ± 7,21*	0 ± 0	76,58 ± 7,64	76,58 ± 7,64	2 ± 0,71	112,6 ± 10,56*	114,6 ± 10,77*	0,75 ± 2,25	95,5 ± 12,98	96,25 ± 13,17
	Δ c-Fos-ir	1,09 ± 0,37	12,48 ± 2,85	13,56 ± 3,2				5 ± 0,72†††	14 ± 1,85†	19 ± 2,18†††			
	Δ Foxp2-ir	0 ± 0	20,56 ± 5,74	20,56 ± 5,74				1,25 ± 0,55†	17,1 ± 6,26	18,35 ± 2,88			
FORMACIÓN COMPACTA	c-Fos-ir	0 ± 0	14,5 ± 2,72*	14,5 ± 2,72*	0 ± 0	9 ± 1,47	9 ± 1,47	0 ± 0	17 ± 1,96*	17 ± 1,96*	0 ± 0	7,75 ± 2,14	7,75 ± 2,14
	Foxp2-ir	0,25 ± 0,25	61,76 ± 9,36	62 ± 9,15	0 ± 0	43,5 ± 6,81	43,5 ± 6,81	0 ± 0	45,5 ± 12,32	45,5 ± 12,32	0 ± 0	30,25 ± 7,76	30,25 ± 7,76
	Δ c-Fos-ir	0 ± 0	5,5 ± 1,55	5,5 ± 1,55				0 ± 0	9,25 ± 2,29†	9,25 ± 2,29†			
	Δ Foxp2-ir	0,25 ± 0,25	18,25 ± 5,85	18,5 ± 5,61				0 ± 0	15,25 ± 6,56	15,25 ± 6,56			
nRA	c-Fos-ir	0 ± 0	26,58 ± 1,91**	26,58 ± 1,91**	0 ± 0	19,2 ± 1,24	19,2 ± 1,24	0,42 ± 0,19	40,1 ± 4,88*	40,52 ± 4,91**	0 ± 0	24,1 ± 3,28	24,1 ± 3,28
	Foxp2-ir	0,39 ± 0,22	95,45 ± 11,67*	95,84 ± 11,49*	0 ± 0	67,57 ± 7,86	67,57 ± 7,86	0,25 ± 0,25	96,5 ± 26,06*	96,75 ± 26,3*	0 ± 0	76 ± 29,73	76 ± 29,76
	Δ c-Fos-ir	0 ± 0	7,38 ± 1,2	7,38 ± 1,2				0,42 ± 0,19†	16 ± 3,62†††	16,42 ± 3,54†††			
	Δ Foxp2-ir	0,39 ± 0,22	27,88 ± 5,39	28,27 ± 5,17				0,25 ± 0,25	20,5 ± 5,19	20,75 ± 4,99			

Nota. Los datos se expresan como media ± SEM (control: n=5; estimulado: n=5). Los asteriscos (*) indican diferencias entre los lados ipsilateral y contralateral en animales control o estimulados (*p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001). Las cruces (†) indican diferencias entre los valores de Δ de los grupos control y estimulado († p 0,05; †† p<0,01; ††† p<0,001). Δ = valores medios ipsilateral - contralateral (dentro de cada grupo). Moto=motoneuronas que colocalizan c-Fos/Foxp2 con ChAT; No-Moto=células no-motoneuronas.

Figura 13

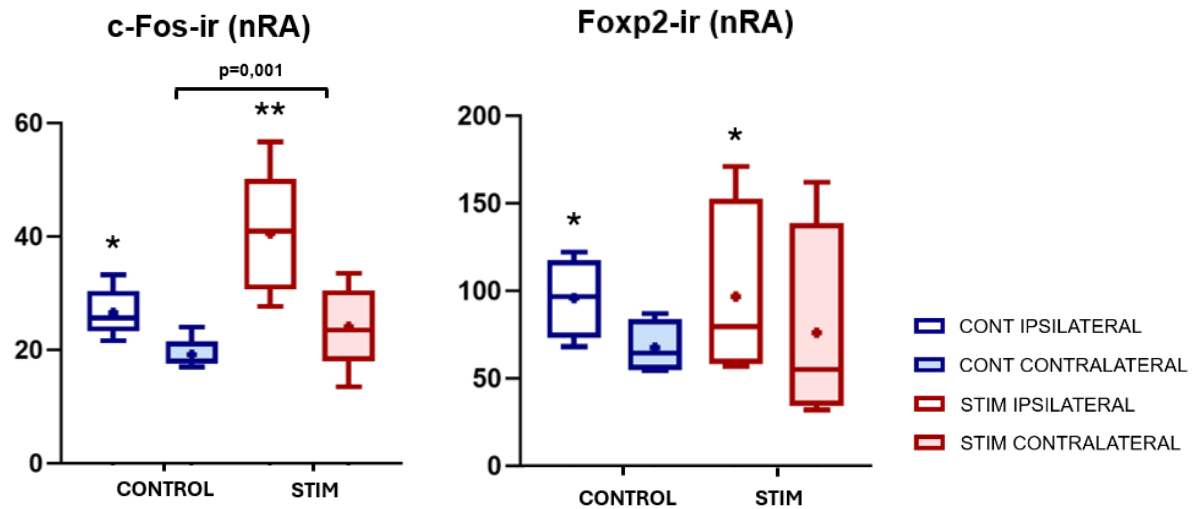
Gráficos de cajas y bigotes que muestran el cambio delta significativo en el número de células inmunomarcadas (grupo células totales) para c-Fos-ir y Foxp2-ir



Nota. Se comparan lados ipsilateral y contralateral en animales control (control) y animales estimulados (stim) en el DMH/PeF en las tres formaciones del nA. Las condiciones experimentales se indican mediante el color y el tipo de relleno: reposo ipsilateral (caja azul, sin relleno), reposo contralateral (caja azul, rellena), estimulación ipsilateral (caja roja, sin relleno) y estimulación contralateral (caja roja, rellena) (control: n=5; estimulado: n=5). *p<0,05; **p<0,01; y ***p<0,001 reposo vs. estimulación.

Figura 14

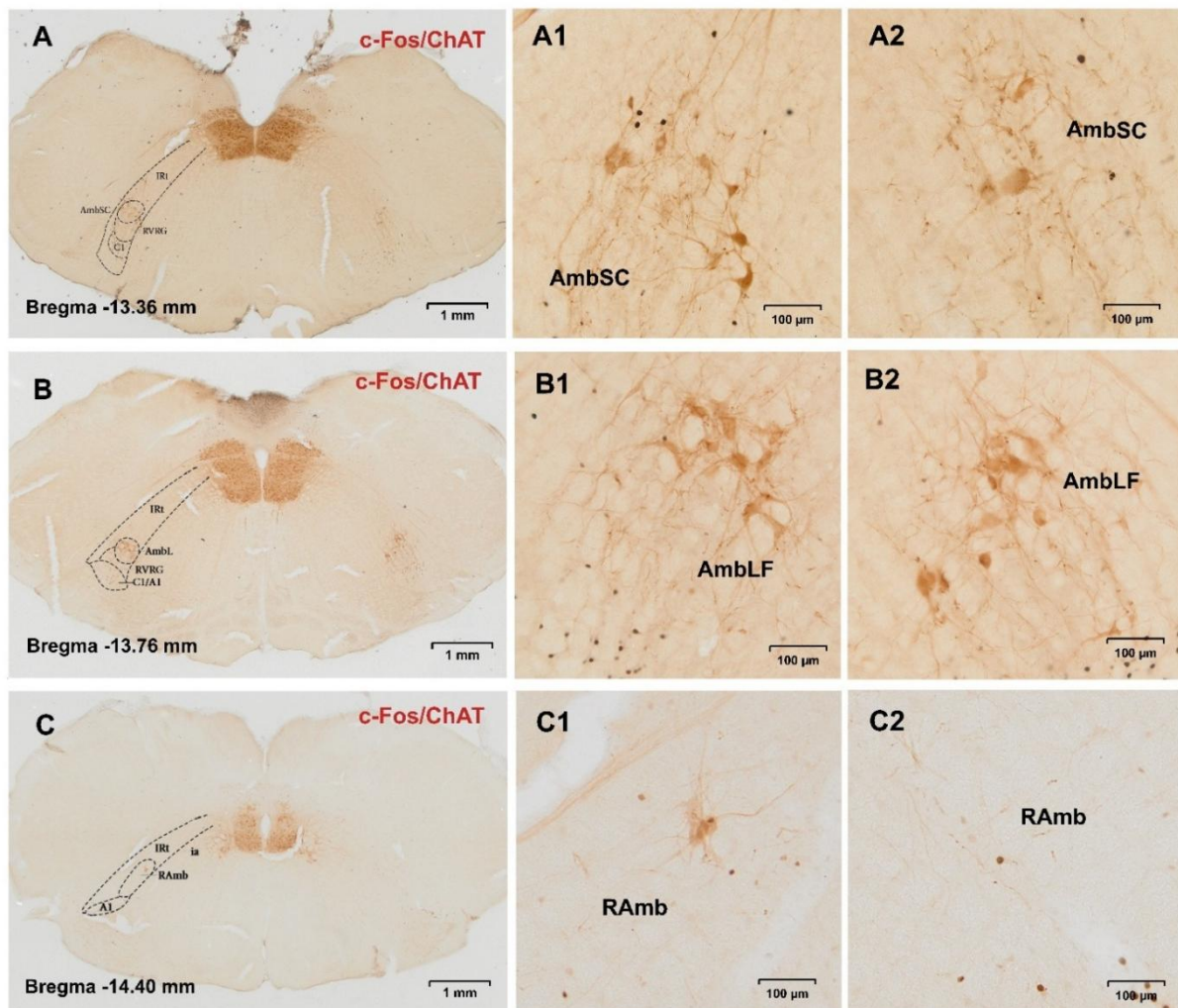
Gráficos de cajas y bigotes que muestran el cambio delta significativo en el número de células inmunomarcadas (grupo células totales) para c-Fos-ir y Foxp2-ir



Nota. Se comparan lados ipsilateral y contralateral en animales control (control) y animales estimulados (stim) en el DMH/PeF en el nRA. Las condiciones experimentales se indican mediante el color y el tipo de relleno: reposo ipsilateral (caja azul, sin relleno), reposo contralateral (caja azul, rellena), estimulación ipsilateral (caja roja, sin relleno) y estimulación contralateral (caja roja, rellena) (control: n = 5; estimulado: n = 5). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; y *** $p < 0,001$ reposo vs. estimulación.

Figura 15

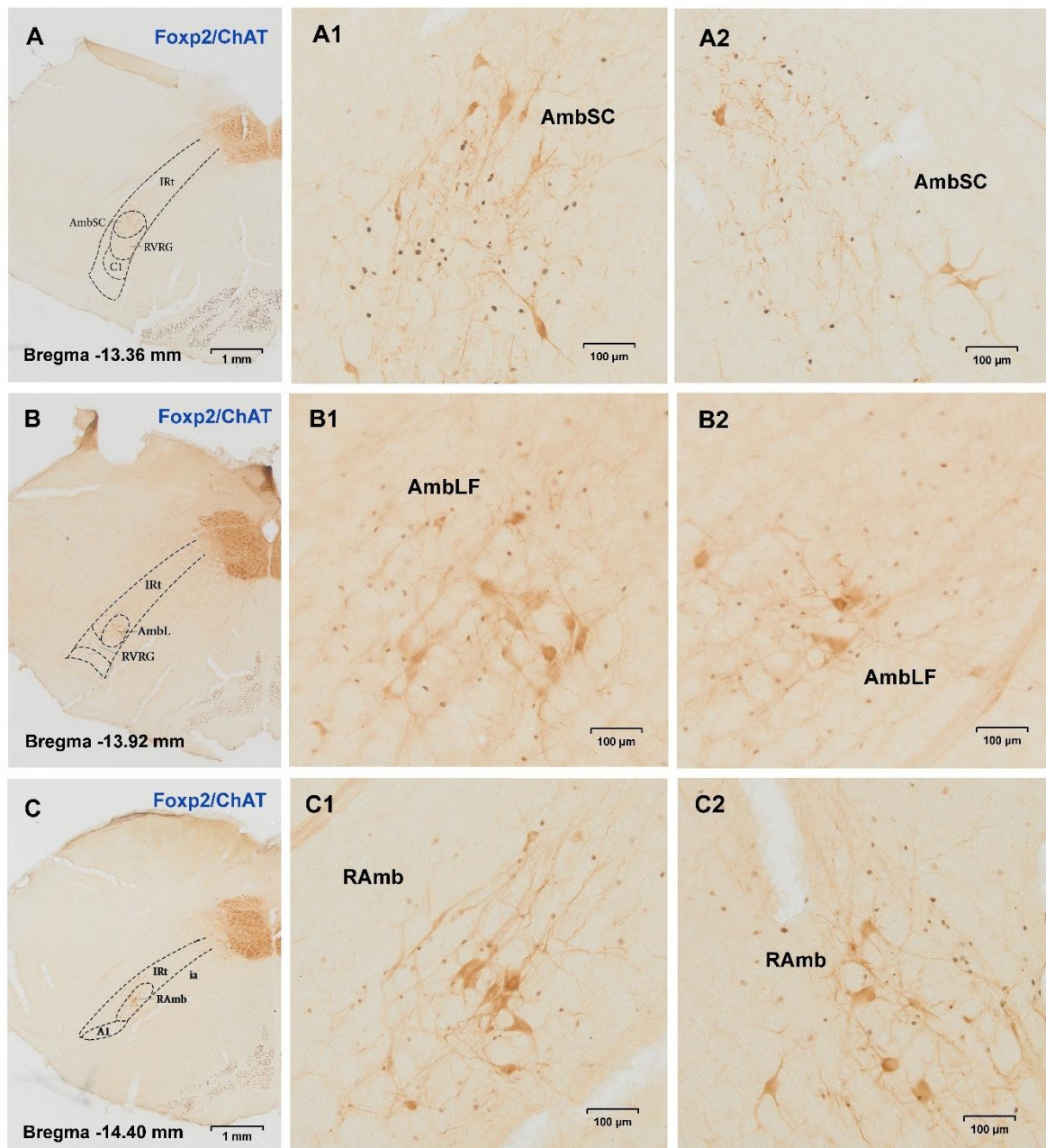
Activación neuronal en el nA y nRA tras la estimulación eléctrica del DMH/PeF



Nota. (A–C) Secciones coronales que muestran, a bajo aumento, doble marcaje de c-Fos/ChAT en distintos niveles del nA y en el nRA. (A1, B1, C1) Imágenes a mayor aumento (20x) que muestran la distribución de la expresión de c-Fos en el lado ipsilateral a la estimulación eléctrica de DMH/PeF. (A2, B2, C2) Imágenes a mayor aumento (20x) que muestran la distribución de la expresión de c-Fos en el lado contralateral a la estimulación eléctrica de DMH/PeF. Abreviaturas: A1: grupo catecolaminérgico A1; AmbLF: formación laxa del núcleo ambiguo; AmbSC: formación semicompacta del núcleo ambiguo; C1: células C1 adrenérgicas; IRt: núcleo reticular intermedio; RAmb: núcleo retroambiguo; RVRG: grupo respiratorio ventral rostral.

Figura 16

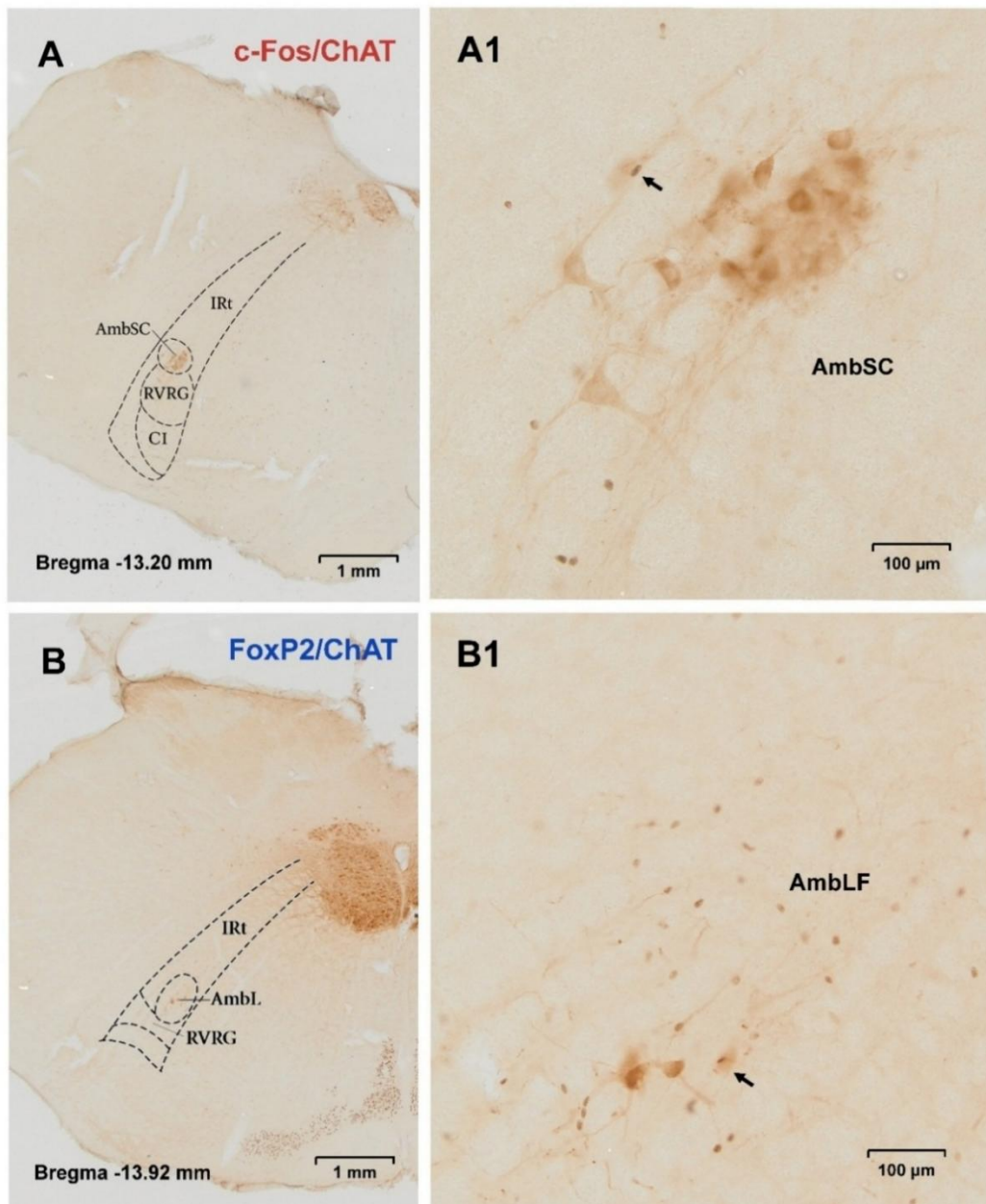
Expresión de *Foxp2* en las distintas formaciones del nA y nRA tras estimulación del DMH/PeF



Nota. (A–C) Secciones coronales que muestran, a bajo aumento, doble marcaje de *Foxp2*/ChAT en distintas formaciones del nA y en el nRA. (A1, B1, C1) Imágenes a mayor aumento (20x) que muestran la distribución de la expresión de *Foxp2* en el lado ipsilateral a la estimulación eléctrica de DMH/PeF. (A2, B2, C2) Imágenes a mayor aumento (20x) que muestran la distribución de la expresión de *Foxp2* en el lado contralateral a la estimulación eléctrica de DMH/PeF. Abreviaturas: A1: grupo catecolaminérgico A1; AmbLF: formación laxa del núcleo ambiguo; AmbSC: formación semicompacta del núcleo ambiguo; C1: células C1 adrenérgicas; IRt: núcleo reticular intermedio; RAmb: núcleo retroambiguo; RVRG: grupo respiratorio ventral rostral.

Figura 17

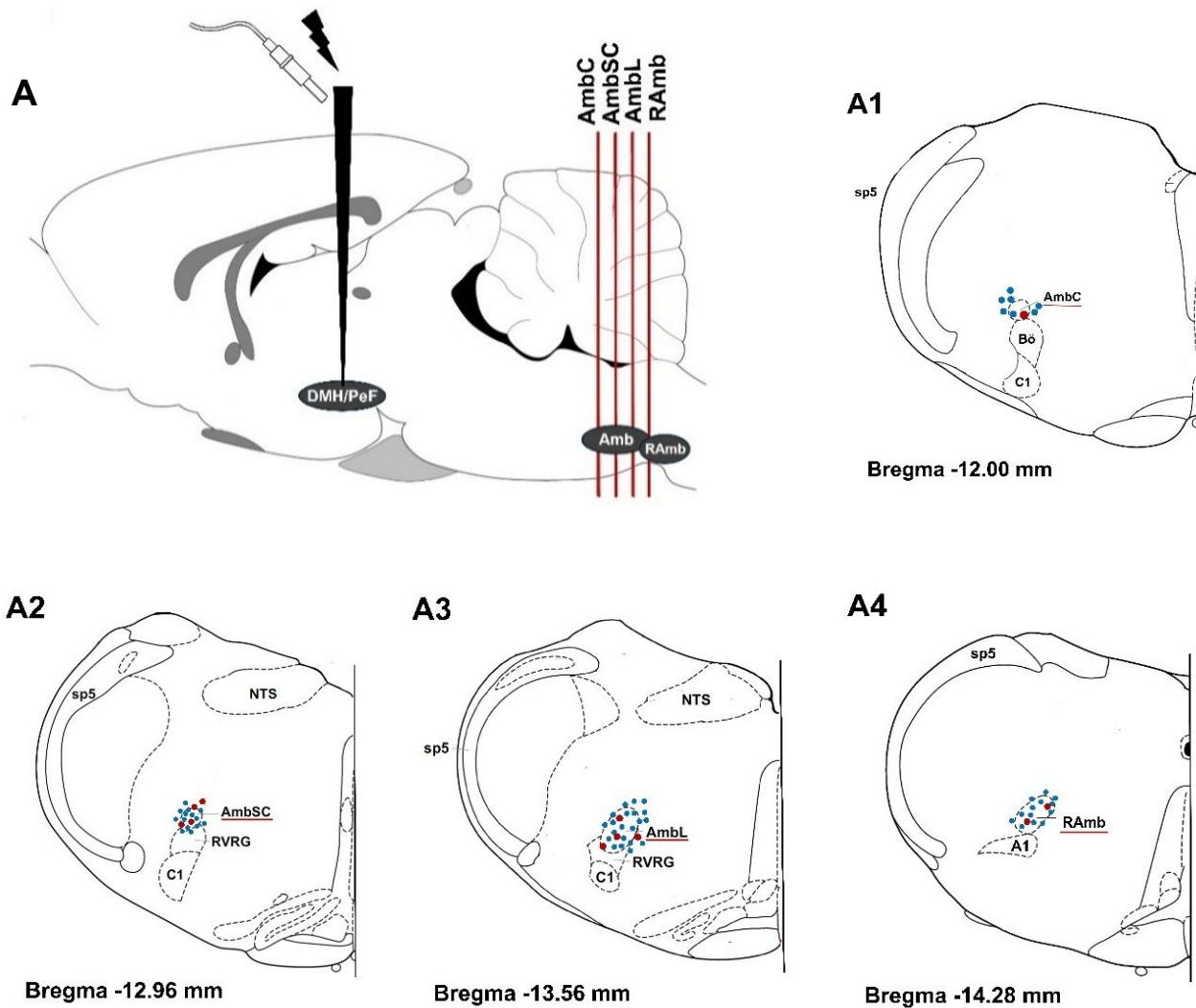
Expresión diferencial de células motoneuronas y no-motoneuronas positivas para *c-Fos* y *Foxp2* en el nA



Nota. (A, B) Secciones coronales a bajo aumento para la localización del nA. (A1) Imagen a mayor aumento de la formación semicompacta, que muestra expresión de *c-Fos/ChAT* tanto en motoneuronas (flecha) como no-motoneuronas. (B1) Imagen a mayor aumento de la formación laxa que muestra expresión de *Foxp2/ChAT* tanto en motoneuronas (flecha) como no-motoneuronas. Abreviaturas: AmbLF: formación laxa del núcleo ambiguo; AmbSC: formación semicompacta del núcleo ambiguo; C1: células C1 adrenérgicas; IRt: núcleo reticular intermedio; RAmb: núcleo retroambiguo; RVRG: grupo respiratorio ventral rostral.

Figura 18

Distribución diferencial de células totales positivas para c-Fos y Foxp2 en el nA y nRA



Nota. (A) Diagrama esquemático de un corte sagital que muestra la localización aproximada de los niveles rostrocaudales analizados a lo largo del nA y nRA (líneas rojas) tras la estimulación eléctrica de DMH/PeF. (A1-A4) Diagramas esquemáticos a diferentes niveles rostrocaudales que representan la distribución aproximada de las neuronas marcadas con c-Fos (rojo) o Foxp2 (azul) en el AmbC, AmbSC y AmbL. Los puntos rojos indican células positivas para c-Fos, mientras que los puntos azules indican células positivas para Foxp2. Abreviaturas: AmbC: núcleo ambiguo (formación compacta); AmbSC: núcleo ambiguo (formación semicompacta); AmbL: núcleo ambiguo (formación laxa); Bö: Bötzing; C1/A1: células adrenérgicas/noradrenérgicas; IRT: núcleo reticular intermedio; RVRG: grupo respiratorio ventral rostral.

6.1.3. Coexpresión de c-Fos-ir y Foxp2-ir

Se analizó la coexpresión de las proteínas c-Fos-ir/Foxp2-ir en la región semicompacta del nA, ya que fue la región donde se produjeron los mayores cambios en la expresión de c-Fos tras la estimulación eléctrica del DMH/PeF.

Animales control: ausencia de estimulación eléctrica del DMH/PeF

En los animales control (n=5), en los que se colocó el electrodo, pero sin estimulación eléctrica se identificó una expresión de Foxp2 de $105,22 \pm 8,34$ en el lado ipsilateral frente a un total de $88,23 \pm 9,33$ células marcadas en el lado contralateral, no habiendo diferencias significativas entre ellos. También se identificaron células c-Fos⁺/Foxp2⁻ tanto en los lados ipsilateral como contralateral ($3,56 \pm 1,30$ y $1,65 \pm 1,85$ células respectivamente).

Por lo que respecta a la coexpresión, en el lado ipsilateral, el 19,36% de células positivas para Foxp2 presentaron coexpresión con c-Fos ($20,38 \pm 3,11$ células). En el lado contralateral, la coexpresión de células positivas para c-Fos y Foxp2 fue de 17,21% ($15,18 \pm 2,30$ células) (Tabla 4).

Animales estimulados: estimulación eléctrica del DMH/PeF

En el grupo de animales que recibió estimulación eléctrica (n=5), la técnica de inmunofluorescencia reveló expresión de Foxp2 tanto en el lado ipsilateral ($121,35 \pm 9,26$ células) como contralateral ($107,18 \pm 12,72$ células), no existiendo diferencias significativas entre ellos. También se identificaron células c-Fos⁺/Foxp2⁻, con un total de $6,23 \pm 2,56$ células en el lado ipsilateral y $2,32 \pm 1,87$ células en el lado contralateral a la estimulación.

Adicionalmente, se identificó coexpresión de ambos marcadores, observándose $34,66 \pm 4,89$ células c-Fos⁺/Foxp2⁺ en el lado ipsilateral y $19,54 \pm 2,21$ células c-Fos⁺/Foxp2⁺ en el lado contralateral, existiendo diferencias significativas entre ambos datos ($p < 0,05$). La proporción de células doblemente marcadas fue de 28,57% y 18,23% respectivamente (Tabla 4; Figura 19).

Animales control vs. animales estímulo

Al comparar la magnitud de las diferencias (valores Δ) de animales control y estímulo se observaron diferencias significativas ($p = 0,008$) en la coexpresión de células positivas para c-Fos y Foxp2 entre los lados ipsilateral y contralateral (Tabla 4).

Tabla 4

Coexpresión c-Fos/Foxp2 en células totales de la formación semicompacta del nA

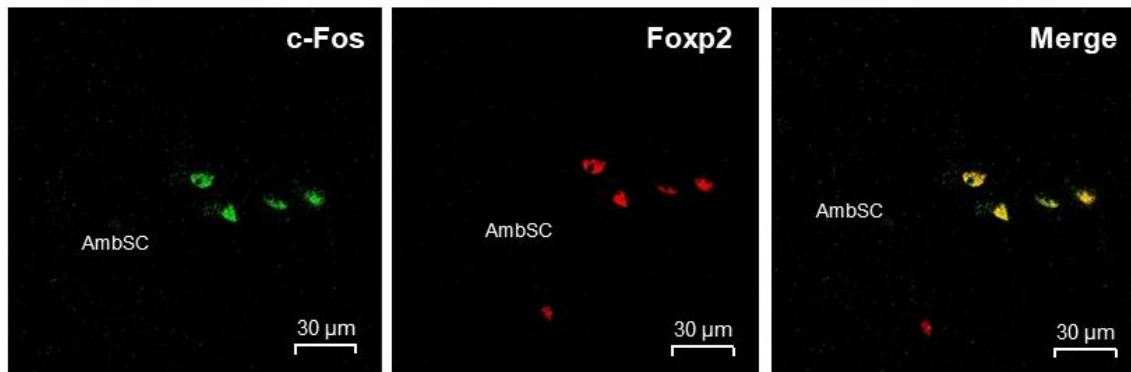
Análisis por inmunofluorescencia (coexpresión c-Fos/Foxp2)				
FORMACIÓN SEMICOMPACTA	CONTROL (n=5)		ESTIMULADOS (n=5)	
	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral
c-Fos ⁻ / Foxp2 ⁺	105,22 ± 8,34	88,23 ± 9,33	121,35 ± 9,26	107,18 ± 12,72
c-Fos ⁺ / Foxp2 ⁻	3,56 ± 1,30	1,65 ± 1,85	6,23* ± 2,56	2,32 ± 1,87
c-Fos ⁺ / Foxp2 ⁺	20,38 ± 3,11	15,18 ± 2,30	34,66* ± 4,89	19,54 ± 2,21
% c-Fos ⁺ / Foxp2 ⁺	19,36 %	17,21 %	28,57 %	18,23 %
Δ c-Fos ⁺ / Foxp2 ⁺	5,20		15,12 ^{††}	

Nota. Los valores representan la cuantificación y distribución de células totales negativas para c-Fos y positivas para Foxp2 (c-Fos⁻/Foxp2⁺), positivas para c-Fos y negativas para Foxp2 (c-Fos⁺/Foxp2⁻) y positivas para c-Fos y Foxp2 (c-Fos⁺/Foxp2⁺) en la formación semicompacta del nA tanto en animales no estimulados (control; n=5) como en animales con estimulación eléctrica del DMH/PeF (estimulados: n=5) (media ± SEM). También se analizan los lados ipsilateral y contralateral. Los valores de coexpresión (c-Fos⁺/Foxp2⁺) se expresan en porcentaje. Los valores Δ corresponden a la diferencia entre valores ipsilaterales y contralaterales para la coexpresión c-Fos⁺/Foxp2⁺. Los asterisco (*) indican diferencias entre los lados ipsilateral y contralateral en animales control o estimulados (*p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001). Las cruces (†) indican diferencias entre los valores de Δ de los grupos control y estimulado († p<0,05; †† p<0,01; ††† p<0,001).

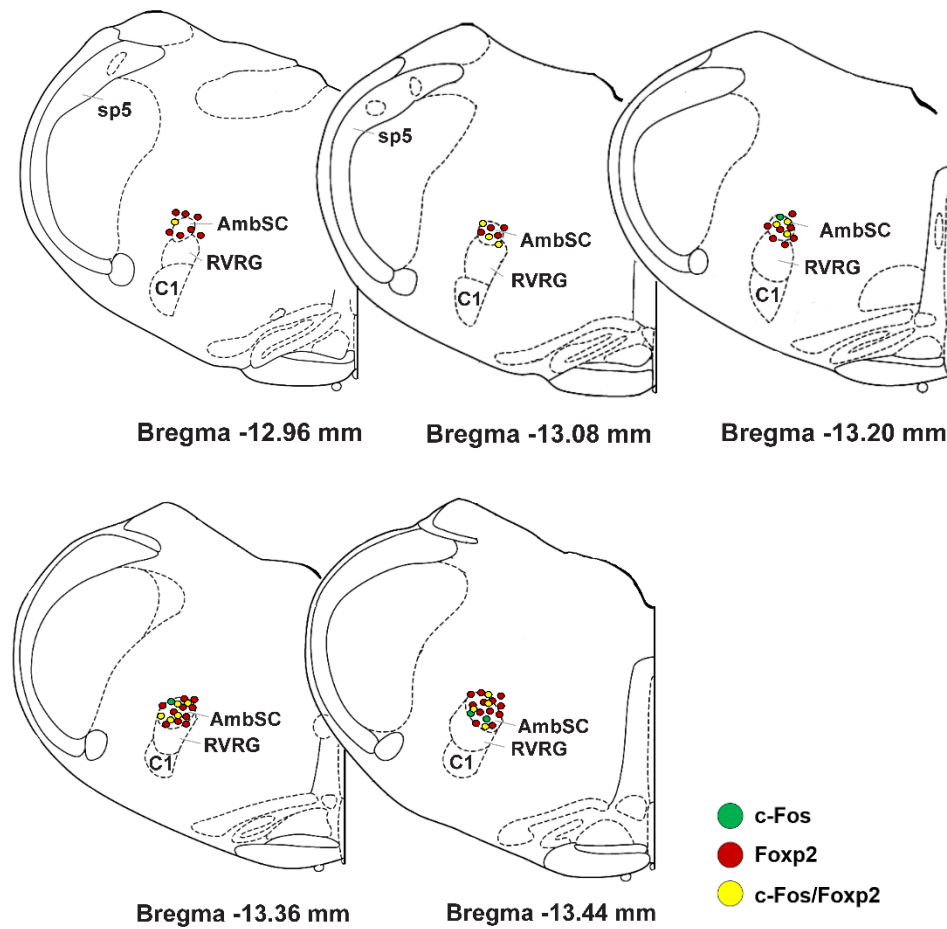
Figura 19

Expresión y coexpresión c-Fos/Foxp2 en la formación semicompacta del nA

A



B



Nota. (A) Microfotografías del AmbSC que muestran la inmunorreactividad para c-Fos (verde) y Foxp2 (rojo), así como su colocalización (*merge*, amarillo) en el lado ipsilateral tras la estimulación eléctrica en el DMH/PeF. (B) Diagramas esquemáticos a diferentes niveles rostrocaudales que representan la distribución aproximada de las neuronas c-Fos⁺/Foxp2⁻ (verde), c-Fos⁻/Foxp2⁺ (rojo) y c-Fos⁺/Foxp2⁺ (amarillo) dentro del AmbSC. Cada punto de color equivale dos neuronas. Abreviaturas: AmbSC: formación semicompacta del nA; C1: células C1 adrenérgicas del RVRG; RVRG: grupo respiratorio ventral rostral.

6.2. Interacción DMH/PeF y nA: experimentos de registro neuronal

Para determinar las posibles interacciones anatomofuncionales entre DMH/PeF y el nA, también se hicieron registros unitarios extracelulares en el nA y regiones adyacentes durante la estimulación eléctrica del DMH/PeF en un total de 4 ratas. El registro se hizo considerando las áreas del nA que mayor expresión de c-Fos mostraron con la estimulación del DMH/PeF. En concreto, se hizo un barrido desde -12,90 a -13,50 y desde -13,50 a 14,20 posterior a bregma y desde 1,25 a 2,25 lateral a la línea media, abarcando la formación semicompacta y laxa (Tabla 5).

Se registró la actividad eléctrica unitaria extracelular *in vivo* de un total de 78 neuronas, localizadas en el nA y en regiones adyacentes durante la estimulación del DMH/PeF. Se registraron neuronas con patrones de descarga diferenciadas, que se clasificaron, según su actividad y localización, en los seis grupos funcionales siguientes: neuronas inspiratorias crecientes, neuronas inspiratorias decrecientes, neuronas espiratorias E1, neuronas espiratorias E2, neuronas cardiovasculares y neuronas sin modulación cardiorrespiratoria (s/m). En cada grupo neuronal se analizó la profundidad y posición media del grupo, y las frecuencias de descarga (en reposo, tras la estimulación de DMH/PeF y tras la estimulación del vago). También se estudiaron los cambios en el patrón de descarga (aumentos y disminuciones), así como las activaciones e inhibiciones.

El conjunto de resultados de este bloque mostró que la estimulación del DMH/PeF y/o su coestimulación con el nervio vago moduló de forma selectiva la actividad neuronal en el nA y regiones adyacentes, con efectos más consistentes sobre las neuronas inspiratorias laríngeas decrecientes. El análisis realizado en cada grupo neuronal se expone a continuación.

A. Neuronas inspiratorias decrecientes

Se registraron 8 neuronas inspiratorias (10,26%) con una profundidad media de $2154,88 \pm 92,83$ micras y una posición anteroposterior de $+0,50 \pm 0,095$ mm anterior al obex y $1,84 \pm 0,094$ mm lateral a la línea media. Histológicamente estas neuronas se localizaron en el nA, concretamente en la formación dispersa (Figura 20). Su frecuencia de descarga en reposo fue de $2,95 \pm 2,66$ Hz, mientras que su frecuencia de descarga ante la estimulación del DMH/PeF (1 Hz) fue de $2,81 \pm 2,58$ Hz, y frente a la estimulación del vago (1 Hz) fue de $4,86 \pm 2,14$ Hz ($p < 0,05$) (Tabla 5).

Respecto a la frecuencia de descarga espontánea, 2 de las neuronas fueron silentes (0 Hz); 4 presentaron frecuencia entre 0-0,5 Hz; y 2 por encima de 1 Hz. Por otro lado, en ninguna de las neuronas registradas se observaron aumentos o disminuciones de la frecuencia de descarga ante la estimulación del DMH/PeF. Frente a la estimulación del vago; 4 neuronas aumentaron su frecuencia de descarga (entre 2-5 Hz de aumento); y 4 no la

modificaron. En 3 de estas neuronas (37,5%), en las que la estimulación vagal generó activación entre los 35-60 ms, al aplicar conjuntamente la estimulación del DMH/PeF y vago se produjo una facilitación de las mismas, incrementando la zona de activación a 30-70 ms (aumentando una media de cuatro veces su descarga con respecto a la que mostraban ante la estimulación del vago) (Figura 21).

B. Neuronas inspiratorias crecientes

Se registraron 10 neuronas inspiratorias decrecientes (12,82%) que presentaron una profundidad media de $2537,20 \pm 93,03 \mu\text{m}$ y una posición anteroposterior de $+0,95 \pm 0,170$ mm anterior al obex y $1,78 \pm 0,079$ mm lateral a la línea media. El estudio histológico reveló que dichas neuronas se localizaban en el GRVr (Figura 20). Su frecuencia de descarga en reposo fue de $13,81 \pm 1,90$ Hz. Su frecuencia de descarga ante la estimulación de la DMH/PeF fue de $13,26 \pm 1,81$ Hz, y frente a la estimulación del vago fue de $13,82 \pm 2,20$ Hz. No se encontraron diferencias significativas al comparar los cambios de frecuencia ante las distintas estimulaciones (Tabla 5).

En cuanto a la frecuencia de descarga espontánea, 2 de esas neuronas estuvieron entre 5 y 10 Hz; otras 4 neuronas entre 10 y 15 Hz; 1 neurona osciló entre 15 y 20 Hz; y, en otras 2 neuronas la frecuencia de descarga espontánea se situó entre 20 y 25 Hz. A su vez, en 3 neuronas (30%) se observó una disminución de la frecuencia de descarga ante la estimulación de la DMH/PeF (entre 2 y 3 Hz); y en 7 neuronas no se detectaron cambios. Frente a la estimulación del nervio vago, 4 neuronas disminuyeron su frecuencia de descarga; 3 neuronas aumentaron su frecuencia; y 3 neuronas no la modificaron.

C. Neuronas espiratorias E1

Se registraron 5 neuronas espiratorias E1 (6,41%) que mostraron una profundidad media de $2306,60 \pm 85,86 \mu\text{m}$ y una posición anteroposterior de $+0,6 \pm 0,170$ mm anterior a obex y $1,65 \pm 0,061$ mm lateral a la línea media (Figura 20). Su frecuencia media de descarga en reposo fue de $11,36 \pm 6,23$ Hz. Su frecuencia media de descarga ante la estimulación de la DMH/PeF fue de $13,85 \pm 6,24$ Hz, y frente a la estimulación del vago fue de $11,28 \pm 6,17$ Hz. Aunque la localización histológica media se correspondía con la formación dispersa del nA, 2 de las 5 neuronas se registraron en la formación semicompacta del nA. No se observaron diferencias significativas cuando se compararon los cambios de frecuencia ante las distintas estimulaciones (Tabla 5).

Atendiendo a la frecuencia de descarga espontánea, en 3 neuronas fue menor de 10 Hz; 1 neurona se situó entre 10 y 20 Hz; y 1 neurona entre 20 y 30 Hz. Con relación a los cambios de frecuencia, en 2 neuronas (40%) se observó un aumento de la frecuencia de descarga ante la estimulación de la DMH/PeF (2 Hz de aumento); y en una de ellas se registró una excitación entre los 150-300 ms tras las estimulación del DMH/PeF (Figura

22A). En el resto (3) no se observaron cambios. Frente a la estimulación del vago, 2 neuronas disminuyeron su frecuencia de descarga; 1 la aumentaba y 2 no la modificaron.

Cuando se utilizaron dos factores de corrección, el primero dependiente de la posición aproximada del electrodo de estimulación en el DMH/PeF y el segundo dependiente del tamaño del animal y de la posición del electrodo de registro en las dos regiones de registro dentro del nA, se calculó una distancia aproximada entre ambas zonas de estudio de 10,50–11,76 mm. En el caso de la neurona que sufrió una excitación entre 150-300 ms, se pudo calcular una velocidad de conducción de entre 0,04 y 0,08 m/s, lo que podría ser indicativo de una respuesta polisináptica.

D. Neuronas espiratorias E2

Se registraron 5 neuronas espiratorias E2 (6,41%) que presentaron una profundidad media de $2343,20 \pm 75,51$ micras y una posición anteroposterior de $+0,65 \pm 0,260$ mm anterior a obex y $1,70 \pm 0,145$ mm lateral a la línea media. Histológicamente, estas neuronas se localizaron en la formación dispersa del nA (Figura 20). Su frecuencia media de descarga en reposo fue de $15,02 \pm 6,89$ Hz. Su frecuencia de descarga ante la estimulación de la DMH/PeF fue de $16,47 \pm 7,05$ ($p < 0.05$) y frente a la estimulación del vago fue de $13,21 \pm 7,33$ (Tabla 5).

Por lo que respecta a la frecuencia de descarga espontánea, 3 neuronas presentaron una frecuencia menor de 10 Hz; 1 neurona tuvo una frecuencia de entre 10 y 20 Hz; y otra neurona entre 30 y 40 Hz. Asimismo, en 2 neuronas (40%) se observó un aumento de la frecuencia de descarga ante la estimulación de la DMH/PeF (entre 2 y 3 Hz); y en 3 no se observaron cambios. Frente a la estimulación del vago, 2 neuronas disminuyeron su frecuencia de descarga (entre 3 y 8 Hz); y 3 no la modificaban.

E. Neuronas cardiovasculares

Se registraron 37 neuronas con un perfil claramente cardiovascular (47,44%) que presentaron una profundidad media de $2913,03 \pm 97,64$ μ m y una posición anteroposterior de $+0,88 \pm 0,060$ mm anterior a obex y $1,85 \pm 0,024$ mm lateral a la línea media. Histológicamente, estas neuronas se localizaron en el C1/A1 (CVL) (Figura 20). Su frecuencia media de descarga en reposo fue de $16,45 \pm 2,81$ Hz. Su frecuencia de descarga ante la estimulación de la DMH/PeF fue de $18,63 \pm 3,01$ Hz ($p < 0.01$) y frente a la estimulación del vago fue de $16,51 \pm 2,91$ Hz (Tabla 5).

En cuanto a la frecuencia de descarga espontánea, 18 neuronas presentaron una frecuencia menor de 10 Hz; 9 neuronas se encontraron entre 10 y 20 Hz; 6 neuronas entre 20-30 Hz; y 4 neuronas mostraron una frecuencia de descarga espontánea mayor a 30 Hz. Por otro lado, en 4 neuronas se observó una disminución de la frecuencia de descarga ante

la estimulación de la DMH/PeF (entre 2 y 6 Hz), en 14 se registró un aumento de la frecuencia (entre 2 y 14 Hz); y en 19 no se observaron cambios. Frente a la estimulación del vago, 10 neuronas disminuyeron su frecuencia de descarga (entre 3 y 9 Hz); 9 aumentaron su descarga (entre 2 y 12 Hz); y 18 no la modificaban.

Este grupo neuronal se vio especialmente afectado por la estimulación de la DMH/PeF (1 Hz) (Figura 23). De 37 de las neuronas, 19 modificaban su actividad (51,3%). En 1 de los casos se observó una excitación entre 50-250 ms. Se pudo calcular una velocidad de conducción de axón de entre 0,05 y 0,23 m/s.

F. Neuronas sin modulación cardiorrespiratoria

Se registraron 13 neuronas sin un perfil claramente definido (16,66%) que presentaban una profundidad media de $2950,91 \pm 97,64 \mu\text{m}$ y una posición anteroposterior de $+0,65 \pm 0,092 \text{ mm}$ anterior a obex y $1,77 \pm 0,071 \text{ mm}$ lateral a la línea media (Figura 20). La frecuencia media de descarga en reposo fue de $14,02 \pm 6,75 \text{ Hz}$. Su frecuencia de descarga ante la estimulación del DMH/PeF fue de $14,44 \pm 6,70$, y frente a la estimulación del vago fue de $14,82 \pm 6,88$. No se observaron diferencias significativas al comparar los cambios de frecuencia ante las distintas estimulaciones (Tabla 5).

En relación con la frecuencia de descarga espontánea, 9 neuronas presentaron una frecuencia menor de 10 Hz; 3 neuronas tuvieron una frecuencia entre 20 y 30 Hz; y 1 de ellas una frecuencia mayor a 30 Hz. Por otro lado, en 2 neuronas se detectó una disminución de la frecuencia de descarga ante la estimulación del DMH/PeF (5 Hz); en 1 se registró un aumento de la frecuencia (15 Hz); y en 10 no se observaron cambios. Por tanto, la estimulación del DMH/PeF modificó la actividad del 23,1% de estas neuronas. Frente a la estimulación del nervio vago, 3 neuronas disminuyeron su frecuencia de descarga (entre 2 y 4 Hz); 2 aumentaron su descarga (entre 2 y 12 Hz); y 8 no la modificaron. En 1 de los casos se observó una activación a los 10-30 ms con máximo a los 12, 22 y 30 ms, calculando una velocidad de conducción de axón de 0,58 – 1,18 m/s (Figura 22B).

Animales excluidos del estudio

En este bloque experimental se registró la pérdida de dos animales por parada cardiorrespiratoria durante el procedimiento quirúrgico. No fueron incluidos en el análisis estadístico.

Tabla 5

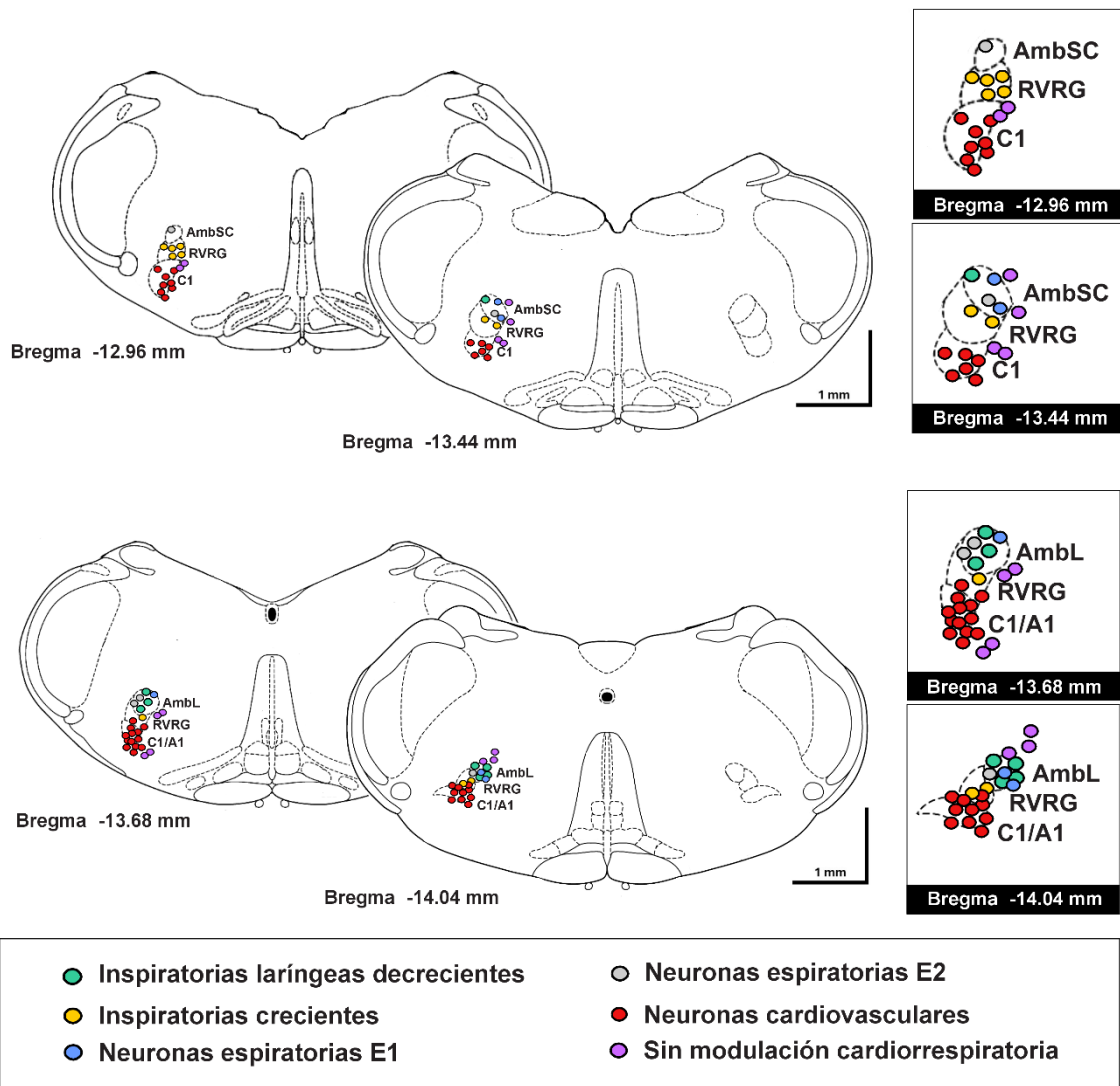
Resumen de los resultados del registro extracelular unitario en el nA y regiones circundantes durante la estimulación de DMH/PeF

Análisis registro neuronal (n=4)							
	n	PROF (μ m)	POSICIÓN (mm)	FREC. REP (Hz)	FREC. DMH/PeF (Hz)	FREC. VAGO (Hz)	MODIF ACTIV (%)
INSPIRATORIAS DECRECIENTES	8	2154,88 \pm 92,83	0,5 \pm 0,095 ant 1,84 \pm 0,094 lat	2,95 \pm 2,66	2,81 \pm 2,58	4,86 \pm 2,14*	37,5
INSPIRATORIAS CRECIENTES	10	2537,20 \pm 93,03	0,95 \pm 0,170 ant 1,78 \pm 0,079 lat	13,81 \pm 1,90	13,26 \pm 1,81	13,82 \pm 2,20	30
ESPIRATORIAS E1	5	2306,60 \pm 85,86	0,6 \pm 0,170 ant 1,65 \pm 0,061 lat	11,36 \pm 6,23	13,85 \pm 6,24	11,28 \pm 6,17	40
ESPIRATORIAS E2	5	2343,20 \pm 75,51	0,65 \pm 0,260 ant 1,70 \pm 0,145 lat	15,02 \pm 6,89	16,47 \pm 7,05*	13,21 \pm 7,33	40
CARDIOVASCULAR	37	2913,03 \pm 97,64	0,88 \pm 0,060 ant 1,85 \pm 0,024 lat	16,45 \pm 2,81	18,63 \pm 3,01**	16,51 \pm 2,91	51,3
S/M	13	2950,91 \pm 97,64	0,65 \pm 0,092 ant 1,77 \pm 0,071 lat	14,02 \pm 6,75	14,44 \pm 6,70	14,82 \pm 6,88	23,1

Nota. Los datos se expresan como la media \pm SEM (n=4). Los asteriscos marcan las diferencias entre los lados ipsilateral y contralateral en los animales control y estimulados (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). Las cruces muestran las diferencias entre las amplitudes de las diferencias (valores Δ) entre los animales control y estimulados (\dagger p< 0,05).

Figura 20

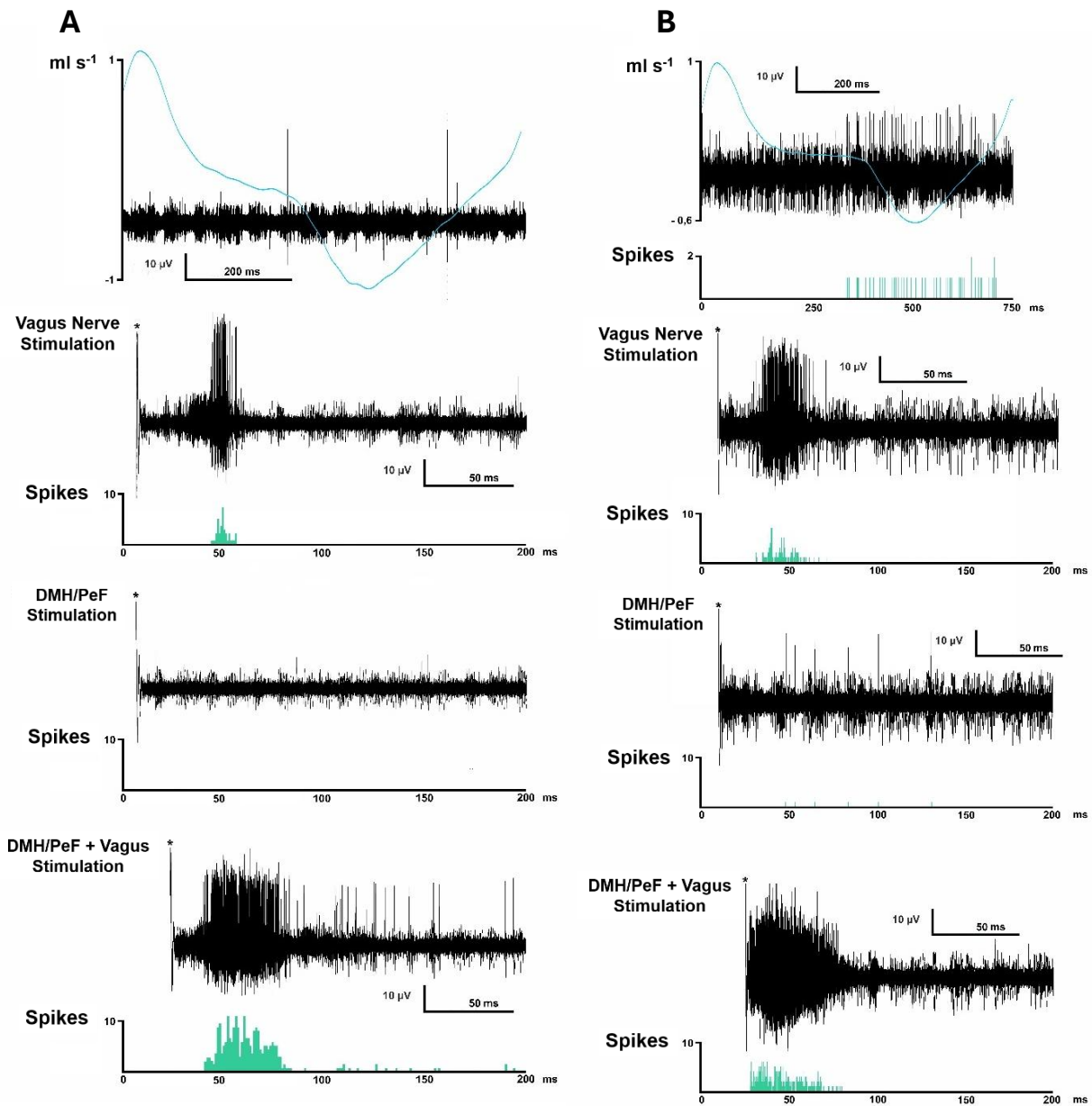
Distribución de neuronas registradas en el nA y regiones adyacentes



Nota. Diagramas esquemáticos de cortes coronales de cerebro de rata que muestran la posición aproximada de los 6 grupos neuronales establecidos y determinados por registro unitario extracelular (78 neuronas en total). Se representan las posiciones dentro de las formaciones semicompacta (AmbSC) y laxa (AmbL) del nA, así como dentro del grupo respiratorio ventral rostral (RVRG) y grupo de células adrenérgicas y catecolaminérgicas (C1/A1).

Figura 21

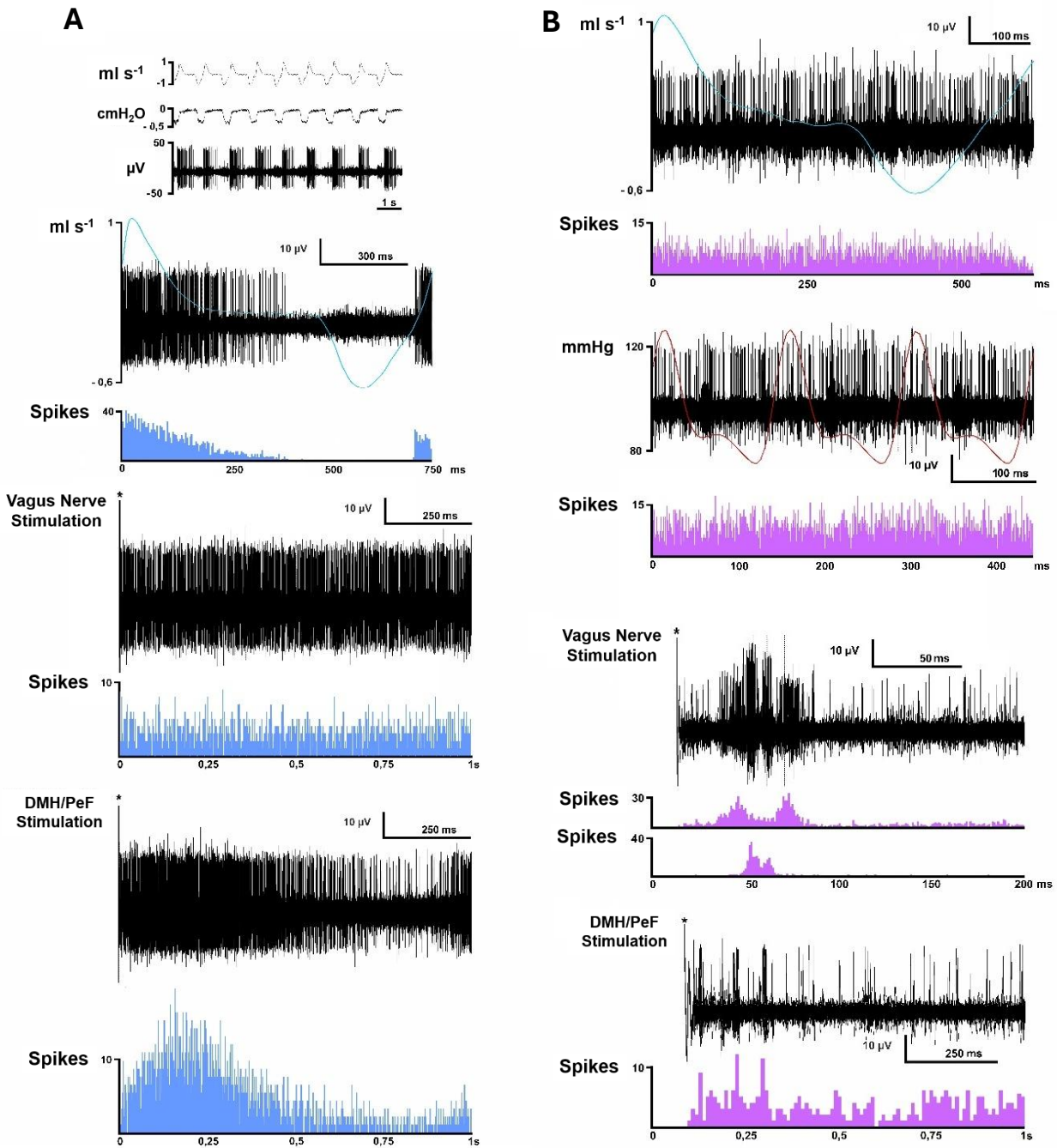
Registro de dos motoneuronas inspiratorias laríngeas decrecientes



Nota. De arriba abajo se muestran: registros representativos de la descarga neuronal superpuesta a la línea media de flujo respiratorio (azul; A y B); histograma peri-estímulo de la descarga neuronal frente al flujo (reposo) (sólo en B); superposiciones de 60 barridos frente a la estimulación del nervio vago, estimulación del DMH/PeF y estimulación conjunta del DMH/PeF y el nervio vago. Debajo de cada una de estas estimulaciones se representan sus respectivos histogramas peri-estímulos.

Figura 22

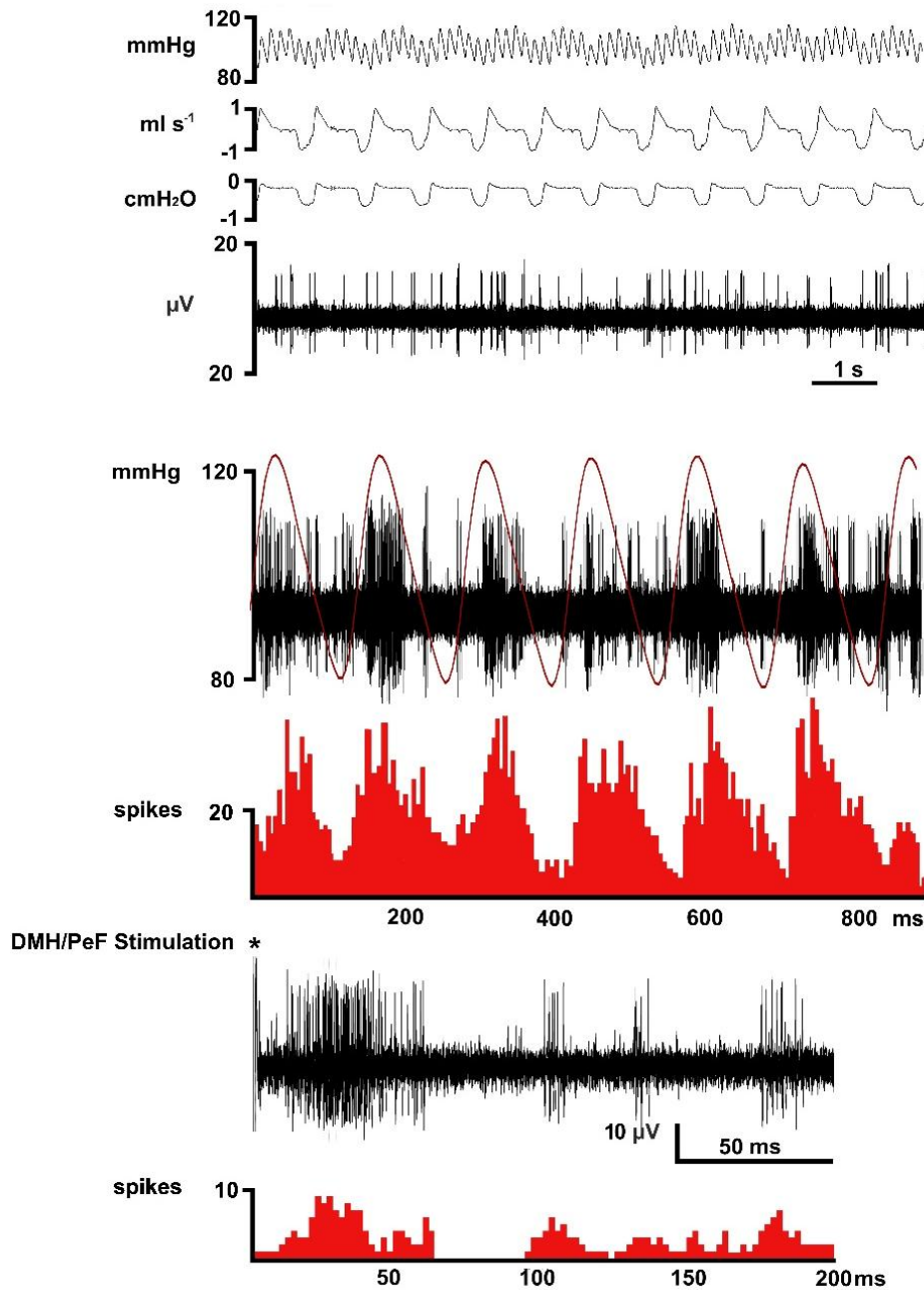
Registro de neurona espiratoria E1 y neurona sin modulación cardiorrespiratoria



Nota. De arriba abajo se muestran: barrido de 10 s del registro de flujo respiratorio, presión pleural y descarga neuronal (sólo A); superposición de 60 barridos de la descarga neuronal superpuesta a la línea media de flujo respiratorio (azul) y presión arterial (rojo) (B) e histograma peri-estímulo de la descarga neuronal (reposo); superposición de 60 barridos (A) y 40 barridos (B) frente a la estimulación del nervio vago, DMH/PeF y los histogramas peri-estímulos (60 y 240 barridos) de dichas estimulaciones.

Figura 23

Registro de neurona con modulación cardiovascular



Nota. De arriba abajo se muestra: barrido de 10 s del registro de presión arterial, flujo respiratorio, presión pleural y descarga neuronal; superposición de 10 barridos de la descarga neuronal superpuesta a la línea media de presión arterial (rojo) y el histograma peri-estímulo de la descarga neuronal durante 120 segundos (reposo); superposición de 20 barridos frente a la estimulación del DMH/PeF y su respectivo histograma peri-estímulo (240 barridos).

6.3. Interacción DMH/PeF y nA: experimentos de estimulación eléctrica/química y presión subglótica

Una vez establecida la relación anatomofuncional entre DMH/PeF y el nA, se realizó un bloque experimental de estimulación eléctrica y química en el DMH/PeF con el objetivo de caracterizar los cambios cardiorrespiratorios y de resistencia laríngea producidos por la activación del DMH/PeF.

En conjunto, los resultados de este bloque experimental mostraron que tanto la activación eléctrica como química del DMH/PeF induce una respuesta cardiorrespiratoria simpatoexcitadora asociada a un aumento de la frecuencia respiratoria y de la presión arterial, junto con una marcada disminución de la resistencia laríngea.

6.3.1. Estimulación eléctrica del DMH/PeF y medición de presión subglótica

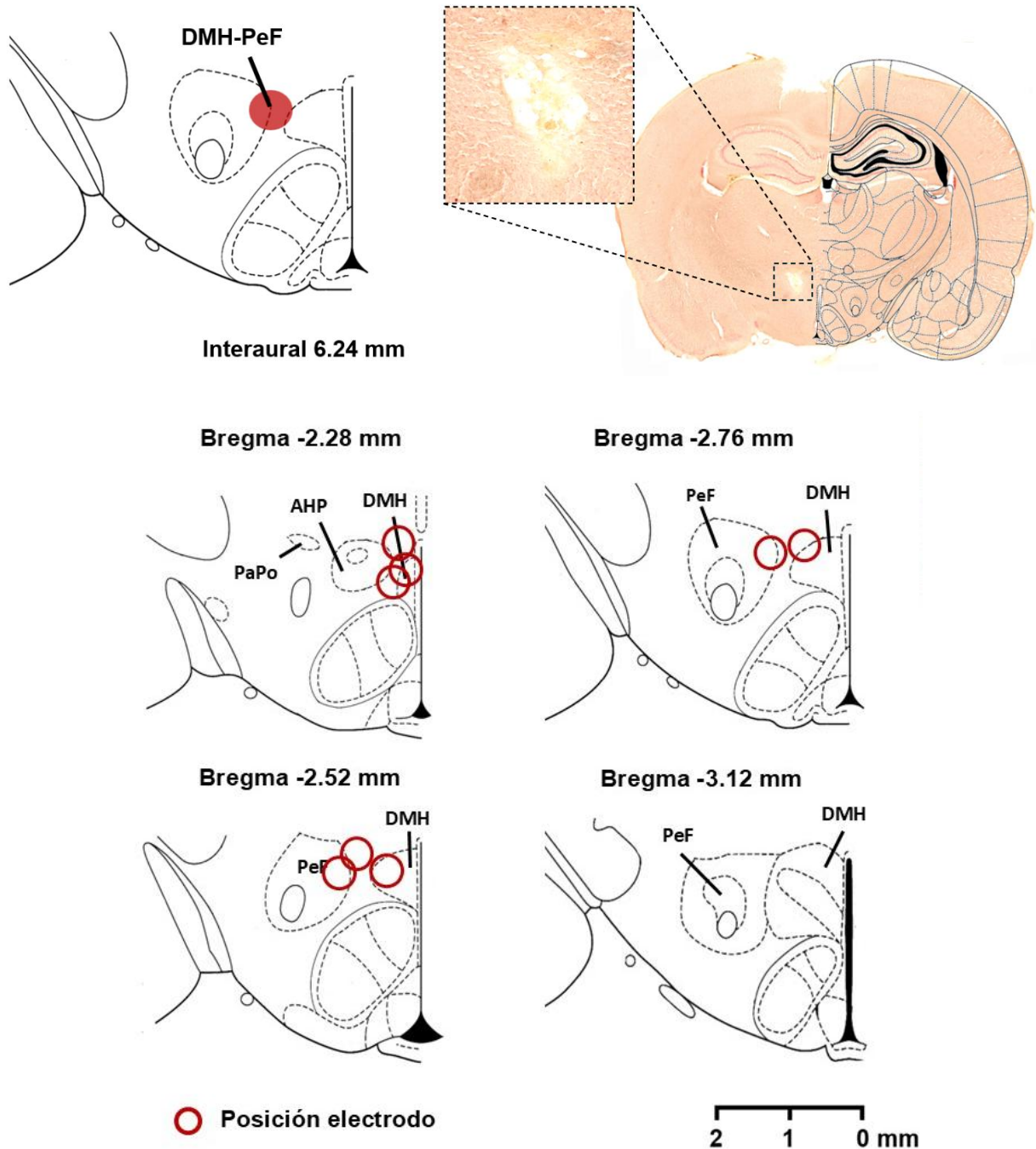
En ratas con respiración espontánea (n=8), la estimulación eléctrica del DMH/PeF provocó cambios notables en la función cardiorrespiratoria y en la resistencia de laríngea (Figura 24). La estimulación del DMH/PeF provocó un aumento significativo de la frecuencia respiratoria (+58%; $p < 0,01$), debido a la reducción del tiempo espiratorio (-37%; $p < 0,001$) e inspiratorio (-20%; $p < 0,01$). Además, la presión pleural inspiratoria aumentó de forma significativa (+121%; $p < 0,01$), mientras que la resistencia laríngea disminuyó de forma considerable (-77%; $p < 0,001$). Junto a estos cambios respiratorios se dio una respuesta presora (+28%; $p < 0,001$) y de taquicardia (+7%; $p < 0,001$). Todos los parámetros volvieron a los valores basales durante la recuperación (Figuras 24-27; Tabla 6).

Animales excluidos del estudio

En los experimentos de estimulación eléctrica se registró la pérdida de dos animales por parada cardiorrespiratoria intraoperatoria. No fueron incluidos en el análisis estadístico.

Figura 24

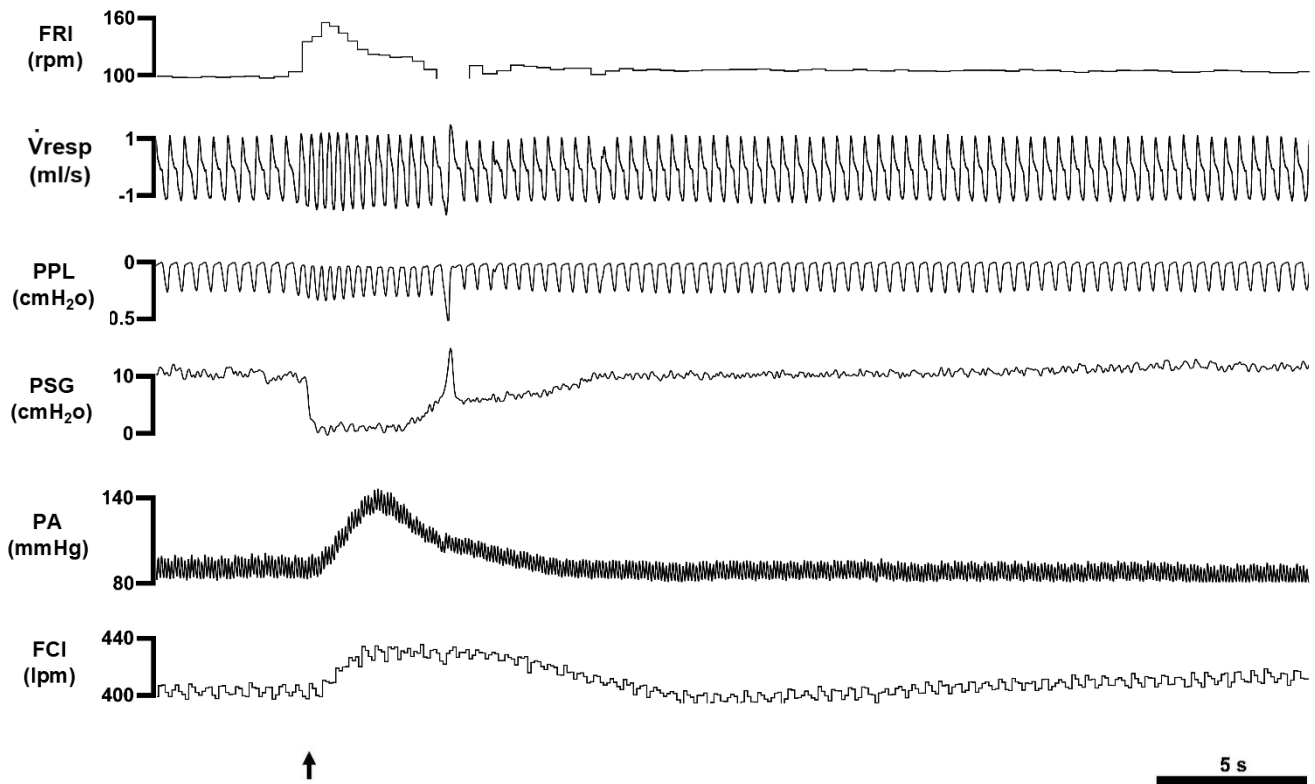
Mapeo de las posiciones anatómicas de estimulación eléctrica en el DMH/PeF



Nota. Diagramas esquemáticos de secciones coronales de DMH/PeF que muestran la distribución de las posiciones anatómicas estimuladas eléctricamente a lo largo de todo el eje rostro-caudal del DMH/PeF. Abreviaturas: AHP: área hipotalámica anterior, parte posterior; DMH: núcleo dorsomedial hipotalámico; PaPo: núcleo hipotalámico paraventricular, parte posterior; PeF: área perifornical hipotalámica.

Figura 25

Estimulación eléctrica del DMH/PeF



Nota. Efectos de la estimulación eléctrica de DMH/PeF sobre la actividad cardiorrespiratoria y laríngea en rata con respiración espontánea antes, durante y 30 segundos después de la estimulación. La flecha indica el inicio de la estimulación (5 s). De arriba abajo se representan los registros de frecuencia respiratoria instantánea (FRI), flujo respiratorio (\dot{V}_{resp}), presión pleural (PPL), presión subglótica (PSG), presión arterial (PA) y frecuencia cardíaca instantánea (FCI).

Tabla 6

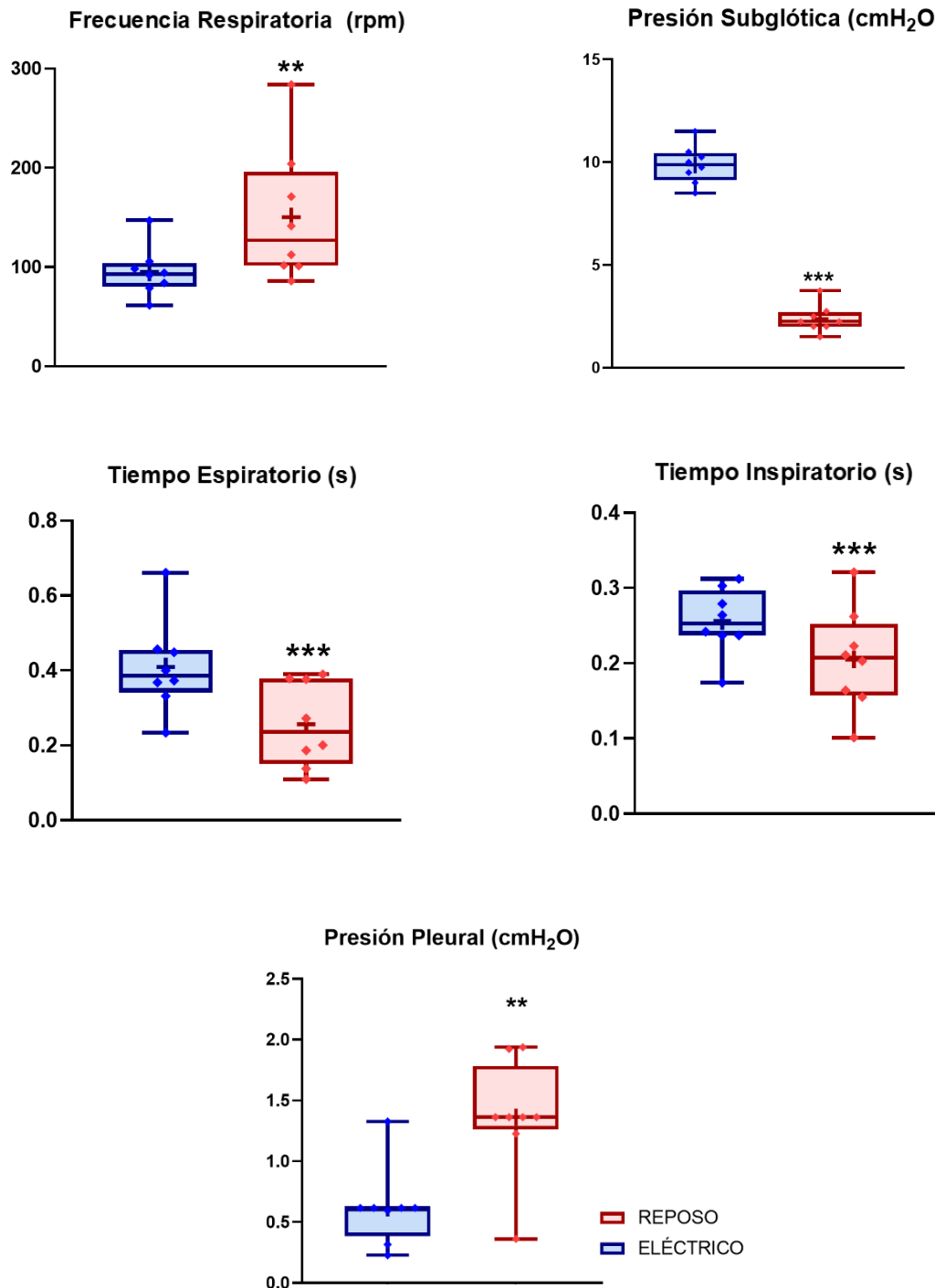
Cambios cardiorrespiratorios inducidos por la estimulación eléctrica en el DMH/PeF

Estimulación eléctrica del DMH/PeF			
DMH/PeF (n=8)	Reposo	Estimulación	Recuperación
TI (s)	0,256 ± 0,016	0,205 ± 0,024**	0,251 ± 0,015
TE (s)	0,409 ± 0,044	0,256 ± 0,040***	0,403 ± 0,042
FRI (rpm)	95 ± 9	150 ± 24**	97 ± 9
PPL (cmH ₂ O)	0,617 ± 0,115	1,363 ± 0,172**	0,623 ± 0,132
PSG (cmH ₂ O)	9,8 ± 0,3	2,3 ± 0,2***	9,7 ± 0,3
PA (mmHg)	93 ± 4	119 ± 4***	96 ± 4
FCI (lpm)	433 ± 19	462 ± 20***	432 ± 18

Nota. Los parámetros laríngeos y cardiorrespiratorios medidos antes (reposo), durante (estimulación) y 4 minutos después de la estimulación eléctrica en DMH/PeF (recuperación). Los datos se expresan como media ± SEM (n=8). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 y comparando estimulación frente a reposo. Abreviaturas: tiempo inspiratorio (TI), tiempo espiratorio (TE), frecuencia respiratoria instantánea (FR), presión pleural (PPL), presión subglótica (PSG), presión arterial (PA) y frecuencia cardiaca instantánea (FCI).

Figura 26

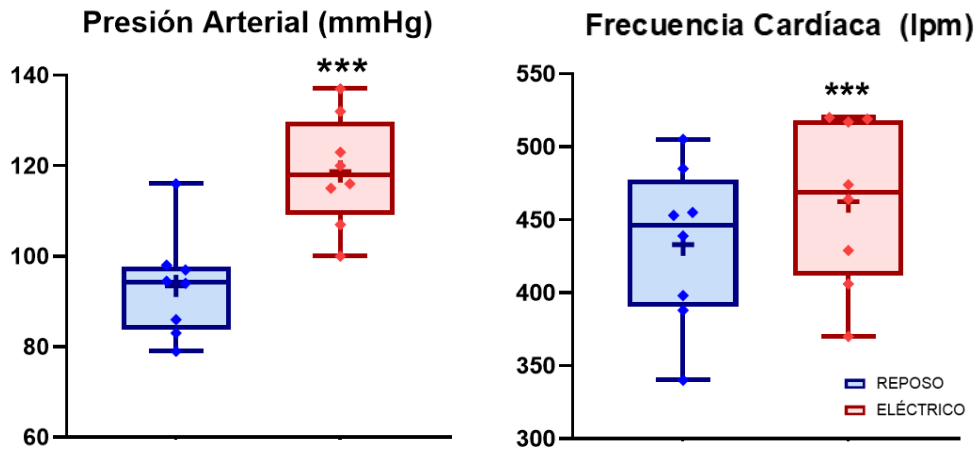
Efecto de la estimulación eléctrica en el DMH/PeF en la respuesta respiratoria y resistencia laríngea



Nota. Diagramas de caja (boxplots) que muestran las variables respiratorias y laríngeas en reposo (azul) y durante la estimulación eléctrica (rojo). Cada caja representa medidas obtenidas de los mismos animales (n=8).

Figura 27

Efecto de la estimulación eléctrica en el DMH/PeF en la respuesta cardiovascular



Nota. Diagramas de caja (boxplots) que muestran las variables cardiovasculares en reposo (azul) y durante la estimulación eléctrica (rojo). Cada caja representa medidas obtenidas de los mismos animales (n = 8).

6.3.2. Estimulación química del DMH/PeF y medición de presión subglótica

En ratas con respiración espontánea (n=14), se determinó la respuesta cardiorrespiratoria y laríngea después de la estimulación química del DMH/PeF con PBS (Grupo Control; n=7) y glutamato (Grupo Estímulo; n=7).

Grupo Control: microinyecciones de PBS en DMH/PeF

Tras el registro de los parámetros cardiorrespiratorios y laríngeos durante 30 segundos en reposo para tomar valores basales, la microinyección de PBS (pH 7,4 ± 0,1) con azul de Evans 1% (50 nl) en el DMH/PeF no indujo cambios estadísticamente significativos tras la microestimulación (Tabla 7; Figuras 30 y 31). En relación con los valores de reposo, tampoco se observaron cambios en estos parámetros pasados 30 minutos de la microinyección. El análisis histológico confirmó que todas las microinyecciones se localizaron dentro de DMH/PeF, sin extenderse a regiones adyacentes (Figura 28).

Animales excluidos del estudio

Se registró la pérdida de dos animales, ya que los análisis histológicos revelaron que las microinyecciones de PBS no se realizaron en el DMH/PeF. No se identificaron cambios cardiorrespiratorios ni laríngeos. No se incluyeron en el análisis estadístico.

Grupo Estímulo: microinyecciones de glutamato en DMH/PeF

La respuesta en reposo de cada animal se evaluó durante los 5 segundos previos a la microinyección de glutamato en el DMH/PeF (n=7). Tras la microinyección de glutamato, los primeros cambios en los parámetros cardiorrespiratorios y laríngeos se observaron entre los primeros 30 segundos y el primer minuto tras la microinyección. Esta respuesta simpatoexcitadora persistió aproximadamente entre 2 minutos y 7 minutos, y tras 30 minutos todas las variables regresaron a los valores basales.

La estimulación química del DMH/PeF con glutamato provocó una caída significativa de la resistencia laríngea (-28%; p<0,01) y un aumento de la frecuencia respiratoria (+30%; p < 0,001) acompañado de reducciones en los tiempos inspiratorio (-19%; p<0,001) y espiratorio (-25%; p<0,001). Se observó también una respuesta presora (+11%; p<0,001), junto con un aumento de la frecuencia cardíaca (+20%; p<0,001). No se observaron cambios significativos en la presión pleural (Tabla 8; Figuras 29-31). El análisis histológico confirmó que todas las microinyecciones se localizaron dentro de DMH/PeF, sin extenderse a regiones adyacentes (Figura 28).

Animales excluidos del estudio

Solo se registró la pérdida de un animal, debido a que el análisis histológico reveló que la microinyección de glutamato no se realizó en el DMH/PeF. La microinyección se

mostró muy lateralizada, fuera de la extensión de la región de interés. El análisis de las variables fisiológicas mostró una leve disminución de la presión arterial, frecuencia cardíaca y frecuencia respiratoria. No se observaron cambios en las mediciones de presión subglótica. No se incluyeron en el análisis estadístico.

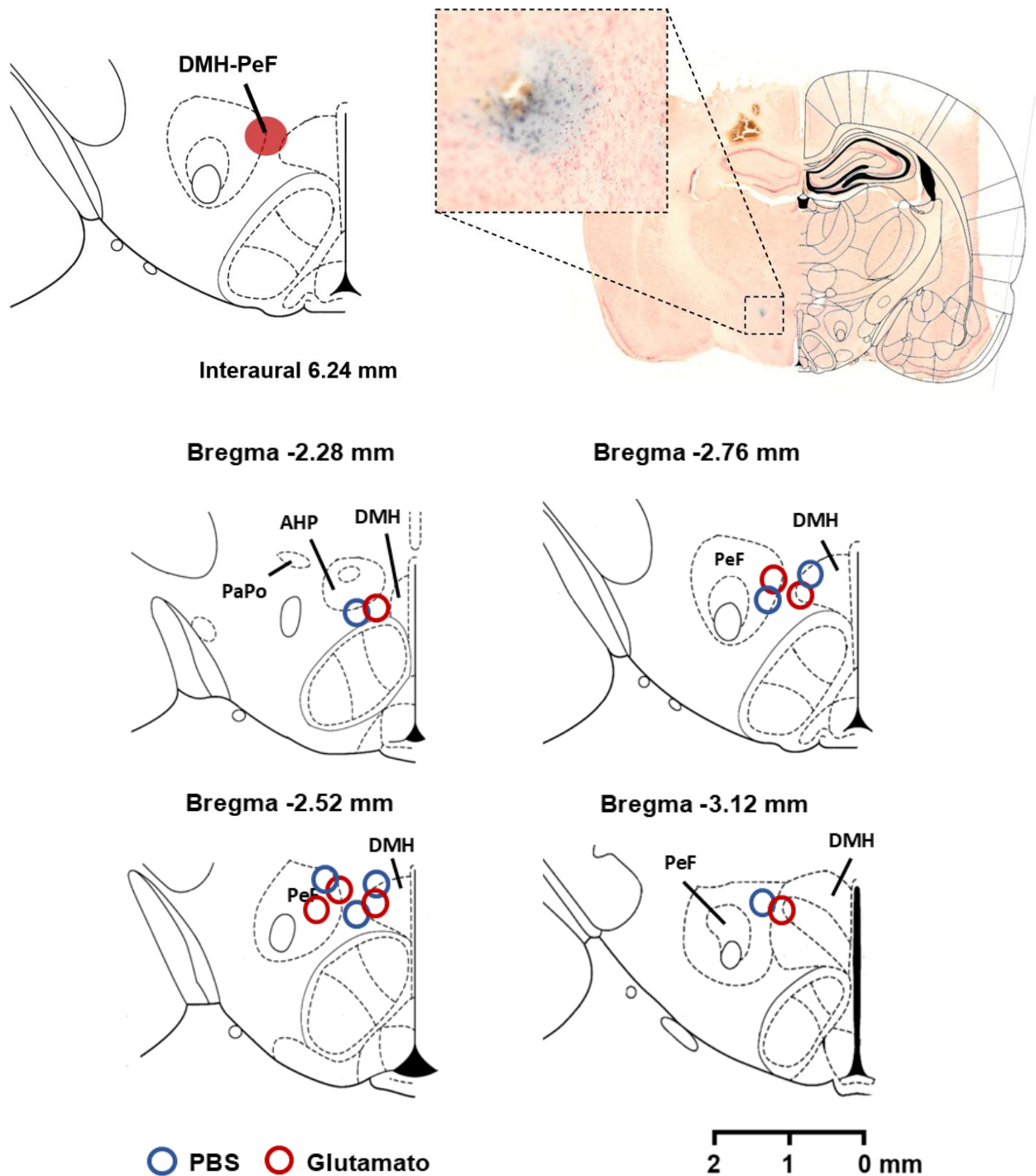
Microinyecciones de PBS vs microinyecciones de glutamato en DMH/PeF

La comparación de la amplitud de las diferencias en las respuestas laríngeas y cardiorrespiratorias entre el grupo control y estímulo revelaron una diferencia altamente significativa ($p < 0,001$) entre ambos grupos. De esta manera, se confirmó que los cambios observados en los parámetros del grupo estímulo eran debidos a la microinyección de glutamato.

En concreto, se identificaron diferencias estadísticamente significativas en la amplitud de las variables tiempo inspiratorio ($-0,010 \pm 0,04$ a $-0,056 \pm 0,006$ s; $p=0,001$), tiempo espiratorio ($0,00 \pm 0,013$ a $-0,121 \pm 0,021$ s; $p=0,001$), frecuencia respiratoria ($1 \pm 0,9$ a $23 \pm 3,3$ resp min; $p=0,001$), presión subglótica ($0,04 \pm 0,04$ a $-2,04 \pm 0,49$ cmH₂O; $p=0,001$), presión arterial ($-1,14 \pm 0,91$ a $11,43 \pm 1,45$ mmHg; $p=0,001$) y frecuencia cardíaca ($-1 \pm 0,98$ a $75,57 \pm 14,52$ lat min; $p=0,001$). En contraste, no se observaron diferencias significativas en la presión pleural entre los grupos analizados ($0,01 \pm 0,004$ a $0,117 \pm 0,052$ cmH₂O; $p=0,209$) (Tabla 9; Figuras 30 y 31).

Figura 28

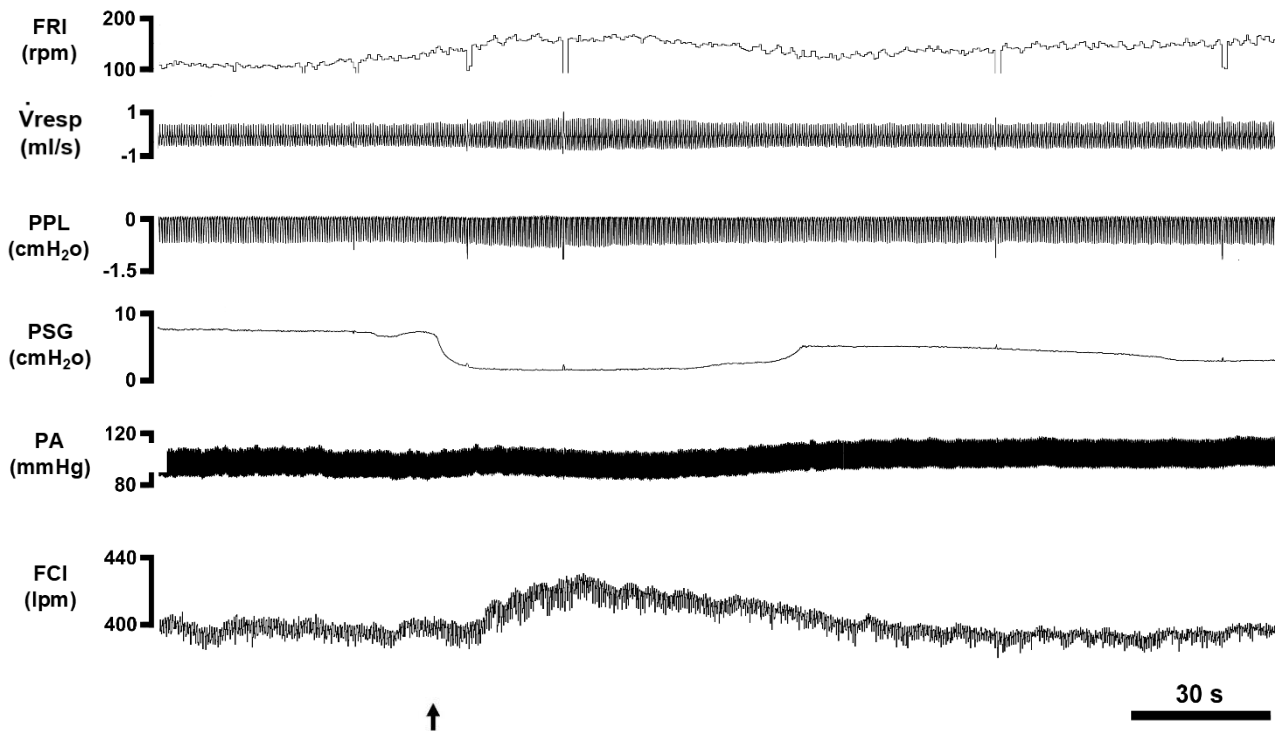
Mapeo de las posiciones anatómicas de estimulación química en el DMH/PeF



Nota. Diagramas esquemáticos de secciones coronales del DMH/PeF que muestran la distribución de las posiciones anatómicas estimuladas mediante microinyección química con PBS (círculo azul) y con glutamato (círculo rojo) a lo largo de todo el eje rostro-caudal de DMH/PeF. Abreviaturas: AHP: área hipotalámica anterior, parte posterior; DMH: núcleo dorsomedial hipotalámico; PaPo: núcleo hipotalámico paraventricular, parte posterior; PeF: área perifornical hipotalámica.

Figura 29

Estimulación química del DMH/PeF



Nota. Efectos de la microinyección de glutamato en el DMH/PeF sobre la actividad cardiorrespiratoria y laríngea en rata con respiración espontánea antes, durante y 4 minutos después de la microinyección. La flecha indica el inicio de la microinyección de glutamato (5 s). De arriba abajo se representan los registros de frecuencia respiratoria instantánea (FRI), flujo respiratorio (\dot{V}_{resp}), presión pleural (PPL), presión subglótica (PSG), presión arterial (PA) y frecuencia cardiaca instantánea (FCI).

Tabla 7

Cambios cardiorrespiratorios inducidos por la microinyección de PBS en el DMH/PeF

Microinyecciones de PBS en el DMH/PeF			
DMH/PeF (n=7)	Reposo	Microinyección	Recuperación
TI (s)	0,300 ± 0,008	0,290 ± 0,008	0,290 ± 0,008
TE (s)	0,450 ± 0,008	0,450 ± 0,008	0,450 ± 0,008
FRI (rpm)	80 ± 2,16	81 ± 2,01	81 ± 2,09
PPL (cmH ₂ O)	1,126 ± 0,019	1,136 ± 0,018	1,134 ± 0,018
PSG (cmH ₂ O)	7,41 ± 0,6	7,45 ± 0,6	7,45 ± 0,7
PA (mmHg)	106 ± 1,1	104,8 ± 1,7	105,7 ± 1,6
FCI (lpm)	378 ± 8,5	377 ± 8,9	377 ± 8,8

Nota. Los parámetros laríngeos y cardiorrespiratorios medidos antes (reposo), durante (microinyección PBS) y 30 minutos después de la estimulación química en DMH/PeF (recuperación). Los datos se expresan como media ± SEM (n=7). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 y comparando estimulación frente a reposo. Abreviaturas: tiempo inspiratorio (TI), tiempo espiratorio (TE), frecuencia respiratoria instantánea (FRI), presión pleural (PPL), presión subglótica (PSG), presión arterial (PA) y frecuencia cardíaca instantánea (FCI).

Tabla 8

Cambios cardiorrespiratorios inducidos por la microinyección de glutamato en el DMH/PeF

Microinyecciones de glutamato en el DMH/PeF			
DMH/PeF (n=7)	Reposo	Microinyección	Recuperación
TI (s)	0,219 ± 0,01	0,235 ± 0,008***	0,220 ± 0,03
TE (s)	0,485 ± 0,02	0,364 ± 0,01***	0,480 ± 0,02
FRI (rpm)	77,43 ± 3,19	100,28 ± 4***	79,3 ± 3,2
PPL (cmH ₂ O)	1,15 ± 0,09	1,27 ± 0,09	1,14 ± 0,09
PSG (cmH ₂ O)	7,18 ± 0,47	5,2 ± 0,73**	7,19 ± 0,44
PA (mmHg)	105,4 ± 2	116,8 ± 2,8***	107,3 ± 2
FCI (lpm)	375,4 ± 10,8	448,8 ± 14,62**	377,2 ± 9,8

Nota. Los parámetros laríngeos y cardiorrespiratorios medidos antes (reposo), durante (microinyección glutamato) y 30 minutos después de la estimulación química en DMH/PeF (recuperación). Los datos se expresan como media ± SEM (n=7). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 y comparando estimulación frente a reposo. Abreviaturas: tiempo inspiratorio (TI), tiempo espiratorio (TE), frecuencia respiratoria instantánea (FRI), presión pleural (PPL), presión subglótica (PSG), presión arterial (PA) y frecuencia cardiaca instantánea (FCI).

Tabla 9

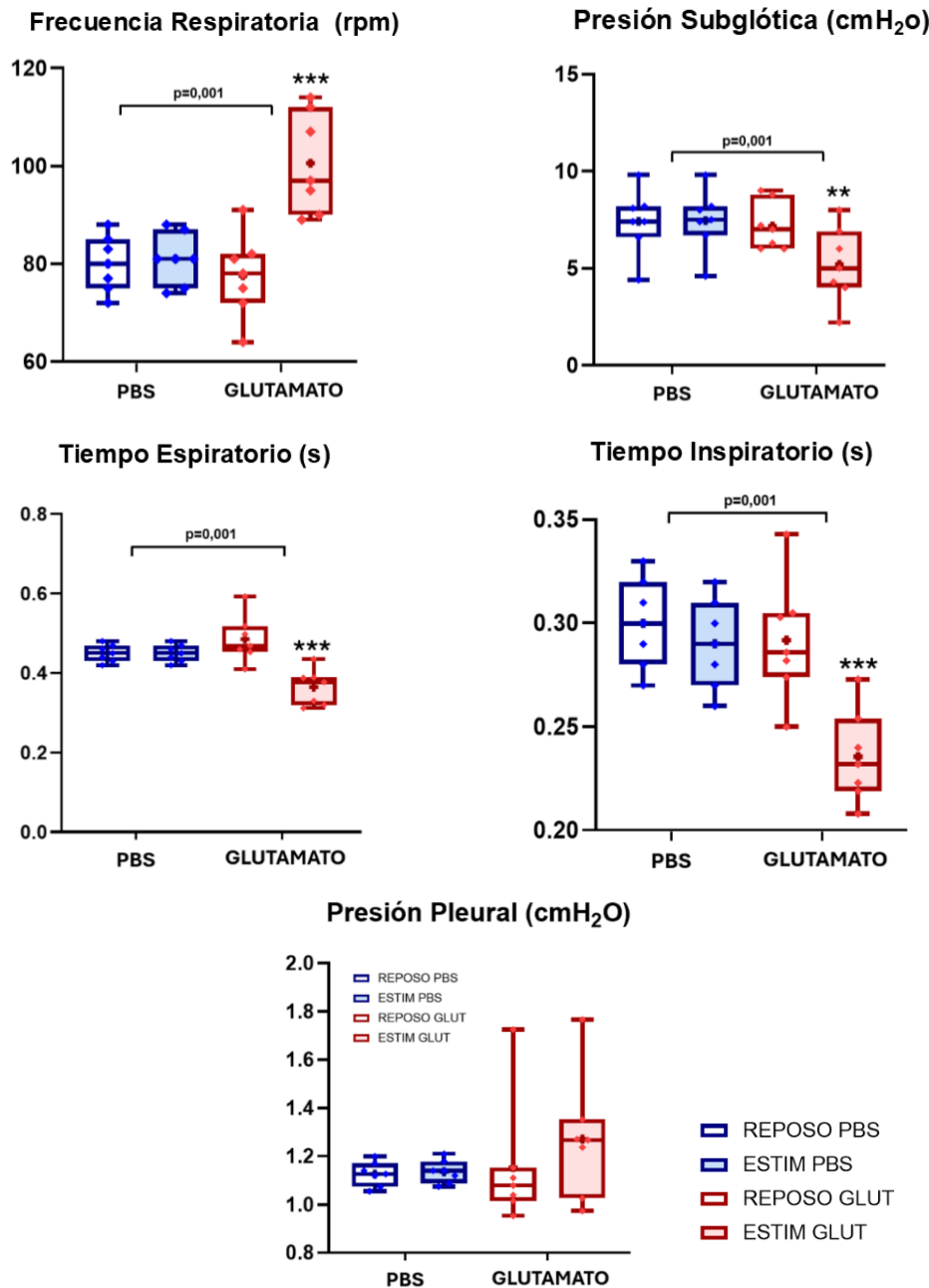
Análisis comparativo de los efectos de PBS y glutamato en el DMH/PeF

Amplitud de las diferencias PBS vs. Glutamato			
DMH/PeF (n=14)	PBS	Glutamato	Delta
TI (s)	-0,010 ± 0,04	-0,056 ± 0,006	p = 0,001
TE (s)	0,00 ± 0,013	-0,121 ± 0,021	p = 0,001
FRI (rpm)	1 ± 0,9	23 ± 3,3	p = 0,001
PPL (cmH ₂ O)	0,01 ± 0,004	0,117 ± 0,052	p = 0,209
PSG (cmH ₂ O)	0,04 ± 0,04	-2,04 ± 0,49	p = 0,001
PA (mmHg)	-1,143 ± 0,911	11,43 ± 1,45	p = 0,001
FCI (lpm)	-1 ± 0,98	75,57	p = 0,001

Nota. Los parámetros laríngeos y cardiorrespiratorios registrados tras microinyecciones de PBS y glutamato en DMH/PeF. Se muestra la amplitud del cambio inducido por cada tratamiento, expresada como media ± SEM (n=14). La columna "Delta" representa la comparación estadística entre ambas condiciones (glutamato vs. PBS). Abreviaturas: tiempo inspiratorio (TI), tiempo espiratorio (TE), frecuencia respiratoria instantánea (FRI), presión pleural (PPL), presión subglótica (PSG), presión arterial (PA) y frecuencia cardíaca instantánea (FCI).

Figura 30

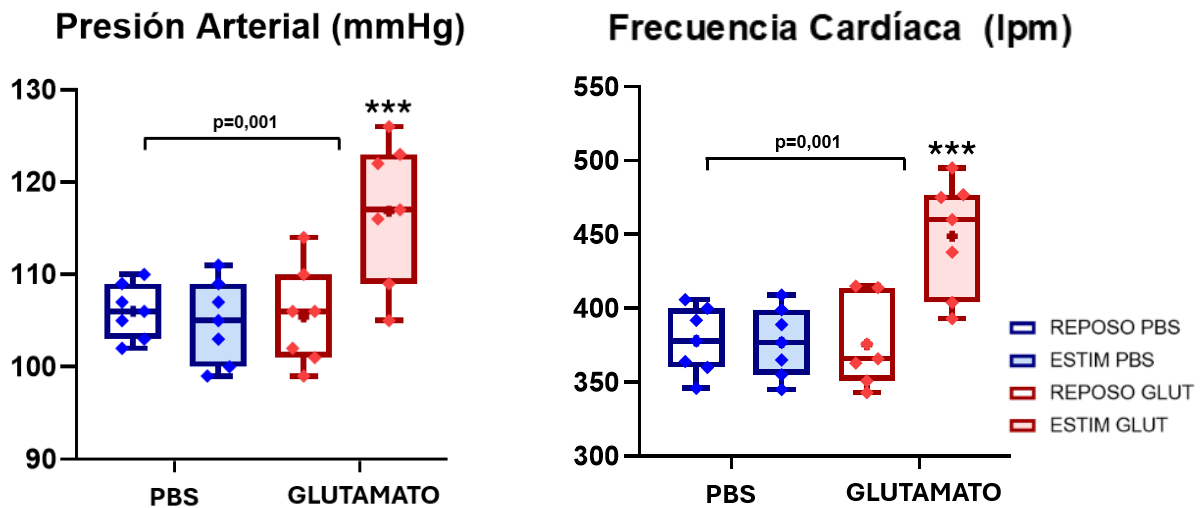
Efecto de la estimulación química en el DMH/PeF en la respuesta respiratoria y resistencia laríngea



Nota. Diagramas de caja (boxplots) que muestran los valores registrados en reposo y durante la estimulación (ESTIM) con PBS o glutamato, en las variables respiratorias y laríngea (n=14). Las condiciones experimentales se representan según color y tipo de relleno: reposo con PBS (caja azul sin relleno), estimulación con PBS (caja azul rellena), reposo con glutamato (caja roja sin relleno) y estimulación con glutamato (caja roja rellena). Se comparan grupos control y glutamato en condiciones de reposo y estimulación (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

Figura 31

Efecto de la estimulación química en el DMH/PeF sobre la respuesta cardiovascular



Nota. Diagramas de caja (boxplots) que muestran los valores registrados en reposo y durante la estimulación (ESTIM) con PBS o glutamato, en las variables presión arterial (izquierda) y frecuencia cardíaca (derecha) (n=14). Las condiciones experimentales se representan según color y tipo de relleno: reposo con PBS (caja azul sin relleno), estimulación con PBS (caja azul rellena), reposo con glutamato (caja roja sin relleno) y estimulación con glutamato (caja roja rellena). Se comparan grupos control y glutamato en condiciones de reposo y estimulación (**p<0,001).



VII. DISCUSIÓN

En esta tesis doctoral se revela, por primera vez, el papel modulador que el DMH/PeF tiene sobre la actividad del nA en el control central de la función laríngea, aportando una comprensión más profunda de los mecanismos neurofisiológicos subyacentes implicados en esta función.

Para tal fin, en una primera fase de este estudio, se caracterizó, en rata, la interacción morfofuncional entre estas dos regiones, analizando la expresión de las proteínas c-Fos y Foxp2 en las neuronas de las distintas subdivisiones del nA tras la microestimulación eléctrica del DMH/PeF. En una segunda fase, se realizó el estudio electrofisiológico de la actividad neuronal del nA durante su descarga tanto espontánea como después de la microestimulación eléctrica del DMH/PeF. Finalmente, en una tercera fase, se caracterizó la respuesta laríngea y cardiorrespiratoria tras la estimulación eléctrica y química del DMH/PeF. Esta caracterización se hizo utilizando la variable de presión subglótica como medida de la resistencia laríngea y como indicador de los cambios en la actividad laríngea. Dicha variable se midió mediante la aplicación de la técnica de “glotis aislada in situ”, la cual ha sido implementada con éxito por parte de nuestro grupo de investigación en diferentes estudios (González-Barón et al., 1978, 1979a, 1979b, 1980; 1981; 1989; Lara et al., 1993; Lara et al., 2002; Dawid-Milner et al., 1993; González-García et al., 2024c).

Los resultados obtenidos en cada uno de los bloques experimentales ponen de manifiesto que, bajo nuestras condiciones experimentales, el DMH/PeF modula la actividad de grupos de neuronas localizadas dentro de la formación laxa y semicompacta del nA. De esta manera, parece influir en los músculos laríngeos intrínsecos de la vía aérea superior, durante los cambios cardiorrespiratorios concomitantes inducidos por la estimulación eléctrica o química del DMH/PeF.

7.1. Consideraciones generales

El DMH/PeF se encarga del control autonómico y de la respuesta de defensa (Silva-Carvalho et al., 1993; Dawid-Milner et al., 1995; DiMicco et al., 2002; Cao et al., 2004; Horiuchi et al., 2004; McDowall et al., 2006; Díaz-Casares et al., 2009; Fortuna et al., 2009; Díaz-Casares et al., 2012; López-González et al., 2013; Bondarenko et al., 2015; Sabetghadam et al., 2017; López-González et al., 2018; Brasil et al., 2020; Narai et al., 2024; Zahner et al., 2024), mientras que el nA es la vía motora principal para la actividad cardiorrespiratoria y la laríngea (Spyer, 1981; Machado & Brody, 1988; Spyer & Gilbey, 1988; Neff et al., 1998; Dergacheva et al., 2010; Brailoiu et al., 2017; Akunna & Abah, 2023; Jalil et al., 2023; Krohn et al., 2023; González-García et al., 2024b). Una posible interacción funcional entre ambas estructuras sugiere que el DMH/PeF, además de formar parte de redes neuronales implicadas en la función cardiorrespiratoria asociada al estrés, podría formar parte también de redes que integran la actividad laríngea en condiciones de estrés/amenaza. Este posible papel del DMH/PeF en la actividad laríngea se ve reforzado por su conectividad con la SGPdI, región muy vinculada a la función cardiorrespiratoria y a la vocalización (Bandler et al., 2000; Benarroch, 2012; Dampney et al., 2013; Deng et al., 2016; Holstege & Subramanian, 2016).

El estudio de estos circuitos no solo podría explicar patologías de gran relevancia asociadas al estrés crónico y a la disfunción autonómica como la hipertensión, las arritmias y los trastornos de ansiedad (Simms et al., 2009; Esler, 2010; Malpas, 2010; Fisher & Paton, 2012; Briant et al., 2015; Esler, 2017; Johnson, 2019; de Silva et al., 2020; Fontes et al., 2023), sino también las disfonías asociadas al estrés, cuya fisiopatología o mecanismos centrales aún se desconocen. A pesar de este desconocimiento, la evidencia disponible sugiere que el desarrollo de este tipo de patología vocal se encuentra estrechamente vinculado a estados emocionales que alteran tanto el patrón respiratorio como la actividad laríngea (Martinez & Cassol, 2015; Tezcaner et al., 2019; Clarós et al., 2019; Fernández et al., 2020; Sruthi & Rahul, 2024).

Por todo ello, el presente trabajo se planificó para estudiar de forma conjunta el componente emocional, la respiración y la vocalización. Así, se analizó la influencia del DMH/PeF sobre la actividad respiratoria y laríngea a nivel central y periférico de forma concomitante a una respuesta de defensa. En los siguientes apartados, se discuten los resultados obtenidos en cada uno de los bloques experimentales, en coherencia con la metodología empleada y lo descrito en la literatura científica.

7.2. Consideraciones metodológicas: modelo animal, cirugía y técnicas experimentales

La metodología de este estudio se estableció en base a la literatura científica y a estudios previos de nuestro grupo de investigación, con el objetivo de aumentar la fiabilidad de los resultados obtenidos. Con respecto al modelo animal, se utilizaron exclusivamente ratas macho no consanguíneas del tipo Sprague-Dawley (SPF), para reducir la variabilidad experimental, ya que los parámetros cardiovasculares y autonómicos presentan mayor estabilidad en machos que en hembras por la ausencia de fluctuaciones hormonales asociadas al ciclo estral (Dearing et al., 2022). No obstante, esta elección limita la extrapolación de los resultados a hembras y debe considerarse con cautela. Todas las ratas estuvieron bajo un control ambiental estricto para garantizar la trazabilidad de los protocolos usados. Se trata de una cepa ampliamente utilizada en investigación básica y en el estudio de enfermedades cardiorrespiratorias, así como de la ansiedad, el estrés y la vocalización, debido a su similitud fisiológica con humanos (Davidson et al., 2010; Manduca et al., 2014; Riede et al., 2020; Akbar et al., 2024; Arandjelović et al., 2024; Puzovic et al., 2025; Yue et al., 2025).

Otra limitación asociada a este modelo animal tiene que ver con el reducido tamaño de su laringe, que dificulta y limita su manipulación en las diferentes técnicas quirúrgicas (Fernandes et al., 2022). A pesar de ello, las ratas y ratones han sido ampliamente utilizados no solo para el estudio central de la laringe, sino también para su estudio periférico, ya que presentan similitud anatómica e histológica con la laringe humana (Inagi et al., 1998; Thomas et al., 2008; Alli et al., 2013; Sato, 2018b; Lenell et al., 2021). Además, los roedores muestran una biomecánica de movimiento de las cuerdas vocales comparable a la de los humanos, lo que refuerza la fiabilidad del uso de estos animales para la medición de parámetros como la presión subglótica (Sato, 2018b).

Por lo que respecta a la anestesia, se intentó administrar concentraciones de pentobarbital sódico que proporcionaran estabilidad y una duración compatible con los tiempos de la cirugía y todo el proceso experimental. Asimismo, la aplicación de lidocaína local redujo los efectos de la estimulación nociceptiva, que incrementó la fiabilidad de los parámetros medidos. La estabilidad del animal se aseguró también gracias a la monitorización a tiempo real de reflejos, de la temperatura corporal y de los parámetros cardiorrespiratorios. Esto fue posible gracias a que los experimentos se realizaron *in vivo* en ratas anestesiadas y con respiración espontánea, lo que permitió preservar las condiciones fisiológicas del animal y registrar de forma simultánea las variables de interés (frecuencia cardíaca, presión arterial, frecuencia respiratoria y presión pleural). Todo se hizo de acuerdo con los protocolos empleados en trabajos previos de nuestro grupo (Díaz-Casares et al.,

2009; Díaz-Casares et al., 2012; López-González et al., 2013; López-González et al., 2018; López-González et al., 2020; González-García et al., 2023; González-García et al., 2024c).

En el caso de los estudios de inmunotinción, los anticuerpos anti-c-Fos, anti-Foxp2 y anti-ChAT se seleccionaron considerando la especificidad y previa validación en tejido cerebral de rata con el objetivo de garantizar la fiabilidad del marcaje (Geerling et al., 2017; Ryu et al., 2021; Staples et al., 2021). Además, se realizaron pruebas antes de procesar el tejido para validar la funcionalidad tanto de los anticuerpos primarios como secundarios. Para la validez de los primarios, se utilizó como control positivo cortes de estriado (caudado-putamen y/o núcleo accumbens) procedentes de animales *naïve*, ya que esta región presenta expresión basal detectable de c-Fos y Foxp2 (Takahashi et al., 2003; Robins et al., 2020; Kuo et al., 2023). Asimismo, se realizaron controles negativos sin anticuerpos primarios para descartar posibles uniones inespecíficas por parte de los anticuerpos secundarios. El uso de ChAT de forma complementaria facilitó la identificación de las motoneuronas laríngeas, con lo que se pudo garantizar que el marcaje nuclear se daba a nivel del nA (Blount et al., 2023).

Los tiempos de estimulación, reposo y sacrificio se establecieron considerando los momentos de menor y mayor expresión de c-Fos (marcador de actividad neuronal), según lo descrito en la literatura científica (Morgan et al., 1991; Hoffman et al., 1993). Para reducir la variabilidad en la inmunorreactividad, los tiempos de fijación con paraformaldehído al 4% fueron iguales en todos los cerebros estudiados. De forma adicional, se hizo un muestreo sistemático a lo largo del eje rostro-caudal para garantizar un análisis representativo de cada una de las subdivisiones del nA y del nRA (Pascual-Font et al., 2011; Hernández-Morato et al., 2013; González-García et al., 2024c).

Por lo que respecta al registro extracelular de actividad unitaria en el nA, el registro y el análisis se hicieron siguiendo las recomendaciones descritas en manuales clásicos de registro neuronal (Lorente de No, 1947; BeMent & Ranck, 1969; Lemon, 1985) y aplicados en estudios previos por parte de nuestro grupo de investigación (López-González et al., 2013; López-González et al., 2020; González-García, 2024a). En concreto, se optó por el uso de electrodos de alta impedancia y técnicas de apantallamiento que optimizaron la relación señal/ruido. También se aplicaron métodos de verificación funcional e histológica que garantizaron una correcta localización de los electrodos.

En los estudios de estimulación eléctrica y química del DMH/PeF, el uso de ratas anestesiadas con respiración espontánea permitió estudiar de manera individual e integrada los efectos de esta estimulación sobre las variables cardiorrespiratorias y de presión subglótica. Estas condiciones permitieron aplicar la técnica de “glotis aislada in situ”, una técnica que se ha aplicado de forma muy limitada, inicialmente en gato (González-Barón et al., 1980; González-Barón et al., 1981; Dawid-Milner et al., 1993; Lara et al., 1993) y perro

(González-Barón et al., 1978; González-Barón et al., 1979a, b) y, *a posteriori*, en rata (Lara et al., 2002; González-García et al., 2024c).

Como puede comprobarse, nuestro equipo de investigación fue pionero a la hora de la implementación de esta técnica en los años 80, 90 e inicio de los 2000, confirmando la validez de esta técnica. Recientemente, hemos podido actualizar la técnica quirúrgica, incorporando también equipamiento específico, lo que ha incrementado notablemente su fiabilidad. Por un lado, el controlador de caudal másico de gas (modelo Hi-Tec F-201CV-AGD-22-V, Bronkhorst) junto al transductor aneroide (ADInstrument modelo FE141, $\pm 0,03$ psi) de alta sensibilidad, que aseguraron un flujo de aire constante y fisiológico a través de la glotis. Por otro lado, el convertidor analógico-digital modelo ML870 Powerlab 8/30 (ADInstruments) y el software LabChartPro (PowerLab System, ADInstrumentsR/ LabChart Software, versión 8.0, Sydney, Australia), que permitieron la obtención de medidas estables y reproducibles de la presión subglótica como índice indirecto de la resistencia laríngea. Además, esta variable se pudo registrar y analizar de forma simultánea a la actividad cardiorrespiratoria y neuronal (González-García, 2024a; González-García et al., 2024c).

La presión subglótica ha sido medida por otros autores como Riede et al. (2013) mediante doble canulación traqueal en animales conscientes. A pesar de que nuestra técnica de “glotis aislada *in situ*” solo mide presión subglótica en animales anestesiados, el aislamiento de las vías respiratorias y la administración de un flujo de aire humidificado constante en dirección rostral aseguró que los cambios en la presión subglótica no se debían a la contracción o relajación de los músculos respiratorios. Asimismo, la fijación de boca y lengua evitó retracciones que alterasen la medición de la presión subglótica.

La estimulación eléctrica del DMH/PeF se hizo de acuerdo con las recomendaciones clásicas descritas en la literatura (Hilton, 1982; Hilton & Redfern, 1986). Sin embargo, la intensidad de la estimulación se disminuyó ligeramente para disminuir el volumen de tejido afectado por la corriente eléctrica, pero manteniendo la respuesta cardiorrespiratoria típica del DMH/PeF (1 ms, 100 Hz, 30-40 μ A durante 5 s). En el caso de la estimulación química, para las microinyecciones de glutamato se ajustaron los volúmenes y concentraciones según las recomendaciones clásicas. En concreto, se administraron 50 nl (entre 10 y 100 nmol), para asegurar cambios cardiorrespiratorios medibles al mismo tiempo que se garantizaba una difusión controlada a nivel espacial de la microinyección (Goodchild et al., 1982; Lipski et al., 1988). Gracias a estas medidas y al uso de un sistema de bomba microinyectora (modelo micro4TM) se pudo controlar tanto los volúmenes como la localización de las microinyecciones.

Al final de cada bloque experimental, la correcta localización del electrodo y la microjeringa se comprobó histológicamente, tomando como referencia las lesiones provocadas por la corriente eléctrica o la tinción con azul de Evans. Todas estas decisiones

metodológicas apoyan la validez de los resultados obtenidos en este estudio, los cuales se discuten en los siguientes apartados.

7.3. Interacción DMH/PeF y nA: experimentos c-Fos/Foxp2/ChAT-ir

Según la hipótesis planteada en este bloque experimental, se esperaba que la estimulación durante 1 hora (una vez por minuto) del DMH/PeF incrementaría la expresión del marcador de actividad neuronal c-Fos y mostraría coexpresión con el factor de transcripción Foxp2 en el nA. Por ello, este bloque experimental tuvo como objetivo caracterizar la relación morfofuncional entre el DMH/PeF y el nA tras la estimulación eléctrica del DMH/PeF y mediante el análisis de la expresión de las proteínas c-Fos y Foxp2 en las diferentes formaciones del nA. Los resultados obtenidos en los estudios de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia no solo respaldan la hipótesis de partida, sino que además revelan cambios significativos en el nRA. Todos estos hallazgos son discutidos a continuación.

7.3.1. Expresión de c-Fos y su colocalización con ChAT

Según los resultados obtenidos en este bloque experimental, la estimulación eléctrica del DMH/PeF produjo un incremento significativo de la expresión de c-Fos topográficamente estructurada a lo largo de todo el eje rostro-caudal del nA, que es coherente con su conocida organización somatotópica (Bieger & Hopkins, 1987; Pascual-Font et al., 2011; Hernández-Morato et al., 2013). Más concretamente, el patrón de respuesta registrado mostró que la influencia de esta región hipotalámica sobre el nA no es homogénea, sino que su efecto sobre su diferentes formaciones (compacta, semicompacta y laxa) es variable.

Una vez bloqueados todos los efectos cardiovasculares simpáticos mediante la administración de guanetidina, se observó un aumento del marcaje de c-Fos que fue predominante en el lado ipsilateral, tanto en el grupo control como en el grupo estimulado eléctricamente, a lo largo de todo el eje longitudinal del nA, así como en el nRA. Sin embargo, tras comparar las diferencias existentes entre el lado ipsilateral y contralateral de ambos grupos experimentales, aparecieron diferencias significativas en la expresión de c-Fos, principalmente, en la formación semicompacta, compacta y en el nRA. En concreto, la formación semicompacta mostró una activación muy marcada en todos los grupos celulares analizados (motoneuronas, no-motoneuronas y células totales), mientras que el aumento en la actividad dentro de la formación compacta se limitó a las no-motoneuronas y células totales. La formación laxa sólo mostró un incremento leve en las motoneuronas. Estas diferencias significativas existentes entre el grupo estimulado y el control sugieren que existen proyecciones descendentes, directas o indirectas y topográficamente organizadas, desde el DMH/PeF hacia el nA.

Desde un punto de vista funcional, cabe resaltar esta diferencia de expresión de c-Fos entre las distintas subdivisiones del nA. Como se ha señalado, la región con mayor diferencia de expresión es la formación semicompacta. Esto indicaría que el DMH/PeF

influye en la actividad de las poblaciones neuronales (motoneuronas y no motoneuronas) que controlan los músculos intrínsecos de la laringe. De hecho, se aprecia una mayor activación del grupo de no-motoneuronas frente al de motoneuronas, lo que sugiere que la modulación ejercida desde esta región hipotalámica podría estar vehiculizada a través de estas subpoblaciones aún no muy bien estudiadas y, por tanto, que la modulación que ejerce sobre las motoneuronas de dicha región no sea de manera directa. En relación con los resultados obtenidos en el grupo de las neuronas no motoras, hay trabajos recientes que describen la presencia de interneuronas en las diferentes subregiones del nA, pero sin darles una funcionalidad concreta (Fogarty et al., 2024). Esta visión no invalida la interpretación clásica, según la cual estas regiones contenían únicamente motoneuronas laríngeas, sino que aumenta la complejidad organizativa, poniendo de manifiesto que ambas poblaciones coexisten dentro del nA (Pascual-Font et al., 2011; Hernández-Morato et al., 2013).

Los datos obtenidos en esta tesis doctoral, junto a los recabados en un trabajo recientemente publicado por nuestro grupo de investigación sobre la SGPdl (González-García et al., 2024a; González-García et al., 2024c), apoyan una dualidad en el control de las diferentes regiones del nA ejercida desde regiones hipotalámicas y mesencefálicas. A diferencia de lo publicado en dicho trabajo en el que el uso del c-Fos combinado con la tirosina hidroxilasa (TH) impidió la distinción entre motoneuronas y no-motoneuronas, en nuestro estudio actual de doble marcaje c-Fos/ChAT sí nos ha sido posible hacerlo, dando una mayor profundidad a las conclusiones extraídas. Independientemente de las diferencias metodológicas, los resultados sugieren que ambas regiones parecen influir sobre estas estructuras bulbares en el control de la actividad laringo-respiratoria. En concreto, dicho estudio demostró que la estimulación de la SGPdl inducía un aumento significativo de la expresión de c-Fos en los dominios compacto y laxo del nA y que esta activación se asociaba a una disminución de la resistencia laríngea (González-García et al., 2024a; González-García et al., 2024c).

Por otro lado, la estimulación eléctrica del DMH/PeF también produjo un incremento significativo de la expresión de c-Fos en el nRA. Este núcleo contiene grupos de interneuronas premotoras heterogéneas con funciones abdominales, intercostales y laríngeas, y podría constituir un punto clave para el DMH/PeF en la integración de la respuesta laringo-respiratoria (Subramanian & Holstege, 2009; Subramanian et al., 2018; Hartmann et al., 2020; Concha-Miranda et al., 2022; Krohn et al., 2023). Debido a que las proyecciones descendentes desde el DMH/PeF hacia el nRA son escasas (Papp & Palkovits, 2014), creemos que la influencia del DMH/PeF sobre este núcleo se ejercería más a través de una vía indirecta mediada por la SGPdl.

Está bien establecido que el DMH/PeF proyecta densamente hacia la SGP (Motta et al., 2009; Benarroch, 2012; Dampney, 2015; Trevizan-Baú et al., 2021a; Schottelkotte &

Crone, 2022), y que esta última ejerce un control potente sobre el nRA, sobre todo, en la modulación de la vocalización, el control respiratorio y los ajustes de la presión abdominal durante respuestas de defensa (Holstege et al., 1997; Papp & Palkovits, 2014). A pesar de las posibles diferencias funcionales, teniendo en cuenta la interconectividad funcional entre ambas y las numerosas conexiones que comparten para regular la actividad cardiorrespiratoria vinculada a la respuesta de defensa, es probable que ambas regiones median esta función a través de mecanismos comunes (Herbert & Saper, 1992; Bianchi et al., 1998; Krout et al., 1998; Vanderhorst et al., 2000; Kawai, 2018; Yang & Feldman, 2018; López-González et al., 2020; Chen et al., 2021; Trevizan-Baú et al., 2021b; González-García et al., 2023; Rocha et al., 2024).

Esta posible arquitectura funcional es coherente con las proyecciones monosinápticas descritas desde el DMH/PeF hacia el nA (ter Horst & Luiten, 1986), así como con la vía DMH/PeF-SGPdl-nRA-nA descrita en la literatura. Esta última vía hipotálamo–mesencefálica–bulbar asociada a la respuesta de lucha/huida, podría representar un eje funcional a través del cual el DMH/PeF modularía la actividad laringo-respiratoria (presión subglótica y permeabilidad de la vía aérea superior) durante estados de defensa (Holstege et al., 1997; Motta et al., 2009; Benarroch, 2012; Papp & Palkovits, 2014; Dampney, 2015; Trevizan-Baú et al., 2021a; Trevizan-Baú et al., 2021b; Schottelkotte & Crone, 2022). Esta idea se ve reforzada por la taquipnea observada en nuestros experimentos de estimulación eléctrica y química del DMH/PeF, así como por los modelos recientemente descritos sobre la red autonómica central y los modelos de red respiratoria. Según estos, el hipotálamo actúa como nodo central para la coordinación de respuestas cardiorrespiratorias y conductuales (Lamotte et al., 2021) y envía señales hacia regiones pontinas (cPB/KF) y bulbares (núcleos generadores del ritmo y patrón respiratorio) con el objetivo de ajustar el tiempo respiratorio y la salida premotora espiratoria (Krohn et al., 2023). Estos mismo núcleos, por su parte, envían señales hacia el nRA, lo que enfatiza el papel integrador que esta estructura tiene en la actividad respiratoria, laríngea y abdominal (Ghali et al., 2019).

Además, los resultados de este estudio apoyan y amplían el modelo jerárquico clásico de Jürgens (1979) sobre la vocalización. De acuerdo con este autor, el hipotálamo es un modulador emocional de las señales vocales y no un generador primario. Por tanto, el hecho de que DMH/PeF reclute predominantemente células no motoras del nA y poblaciones celulares del nRA refuerza su papel como modulador emocional. Además, las diferencias encontradas entre la SGPdl y el DMH/PeF y sus respectivos efectos sobre el nA podría tener su explicación en una mayor dominancia de la SGPdl sobre la vocalización dentro de este modelo jerárquico. No obstante, se necesitan más estudios conjuntos de ambas estructuras para esclarecer esta organización funcional.

7.3.2. Expresión de *Foxp2* y su colocalización con ChAT

El doble marcaje *Foxp2*/ChAT aportó información complementaria sobre la estructura molecular y funcional de las poblaciones neuronales dentro del nA y nRA. La relación entre la distribución molecular y la funcionalidad de estos núcleos encaja con los estudios que relacionan el *Foxp2* con funciones como la respiración, la vocalización, el lenguaje y el control motor fino (Vernes et al., 2011; Hickey et al., 2019; Kosubek et al., 2020).

En los animales control, los resultados mostraron que las neuronas *Foxp2* positivas presentaban una distribución bilateral, pero predominante en el lado ipsilateral en las formaciones semicompacta y laxa del nA, así como en el nRA. En el caso de los animales en los que se estimuló eléctricamente el DMH/PeF, el patrón de expresión de este marcador se mantuvo similar al grupo control. Al comparar los aumentos de expresión entre las zonas ipsilaterales y contralaterales entre el grupo estimulado y el control, no se observaron diferencias significativas entre ellos. La ausencia de cambios en la expresión de *Foxp2* entre el grupo control y el estimulado eléctricamente, refuerza la idea de que este factor de transcripción actúa como un marcador fenotípico estable y no como un marcador dependiente de actividad.

En ambos grupos experimentales, el número de núcleos *Foxp2*⁺ en el nRA fue similar a los observados en la formación semicompacta del nA y ligeramente inferior a los observados en la formación laxa. Esta distribución resultó coherente y esperable debido a la naturaleza heterogénea del nRA (abdominal, respiratoria y laríngea) y por la función que desempeña como núcleo premotor en la conformación de patrones motores laríngeos y espiratorios (Campbell & Green, 1955; Holstege & Kuypers, 1982; Park et al., 2024). En este sentido, resultó significativo que el *Foxp2* se expresara, sobre todo, en las formaciones del nA que modulan la actividad de los músculos intrínsecos de la laringe, así como el calibre de la glotis. De igual modo, una expresión alta de esta proteína en el nRA no solo fue coherente con el papel que este núcleo tiene en la espiración activa (Campbell & Green, 1955; Park et al., 2024), sino también con la respuesta de taquipnea registrada en nuestros experimentos de estimulación eléctrica y química del DMH/PeF.

En nuestro estudio anterior sobre la SGPdI ya identificamos este perfil funcional en el nA y nRA (González-García et al., 2024c). Sin embargo, la interpretación de estos resultados estaba limitada por el uso del doble marcaje *Foxp2*/TH, por lo que no pudimos diferenciar entre motoneuronas y no-motoneuronas. En cambio, los datos obtenidos del presente estudio nos permitieron dar un paso más en la caracterización de estas células. En concreto, el aporte principal de este bloque experimental fue la identificación de que las células positivas para *Foxp2* se correspondían principalmente con no-motoneuronas. Esto sugiere que dentro del nA podrían existir subpoblaciones locales que expresan *Foxp2* y que podrían desempeñar un papel modulador o integrador más que de control motor directo.

Por otro lado, el estudio de la expresión de *Foxp2* en el nA y nRA no solo aportó información del carácter funcional de las poblaciones celulares de estas regiones, sino que también reforzó la idea de que el DMH/PeF también podría formar parte de un circuito laringo-respiratorio especializado. Aunque hasta la fecha no se ha documentado la expresión de esta proteína en el DMH/PeF, algunos autores han demostrado la existencia de proyecciones *Foxp2* positivas que se dirigen desde el pre-LC o el cPB hacia el DMH/PeF (Shin et al., 2011; Huang et al., 2021). Además, el DMH/PeF interacciona, directa o indirectamente, con diversos centros respiratorios bulbopontinos que sí expresan este factor de transcripción (por ejemplo, el cPB-KF, el pre-BötC, BötC y el NTS) (Geerling et al., 2017; Stanić et al., 2018; Vallin et al., 2025). Todas estas regiones, junto a los nA y nRA, parecen establecer un eje molecular caracterizado por la expresión de *Foxp2* que se extiende a lo largo de todo el eje rostro-caudal de la protuberancia y el bulbo.

7.3.3. Coexpresión de c-Fos/*Foxp2*

La técnica de doble marcaje inmunofluorescente permitió identificar grupos de neuronas en la formación semicompacta del nA que coexpresan c-Fos y *Foxp2*. En nuestro estudio, al igual que con los resultados obtenidos con la inmunohistoquímica, pudimos observar que la expresión de *Foxp2* se mantenía estable tanto en animales control como en animales estimulados en ambos lados (ipsilateral y contralateral), mientras que la expresión de c-Fos aumentaba en la zona ipsilateral de los animales estimulados de manera significativa. La comparación entre grupos demostró también que la diferencia de expresión de c-Fos entre el lado ipsilateral y contralateral fue significativamente mayor en los animales estimulados.

En concreto, confirmamos que la coexpresión de ambos marcadores se mantenía constante en los animales control (19,36% y 17,21% ipsilateral y contralateral respectivamente), mientras que aumentaba en la zona ipsilateral (28,57%) de manera significativa respecto a la contralateral (18,23%) en los animales estimulados. En el análisis de las diferencias entre grupos (control vs estimulados) en la comparación ipsilateral-contralateral también se observaron diferencias significativas, lo que confirmó que la estimulación del DMH/PeF producía un aumento de la expresión de c-Fos en neuronas de la formación semicompacta del nA que expresan *Foxp2*.

Aunque los estudios de inmunofluorescencia confocal aportan resultados valiosos, deben ser considerados con cautela, ya que no se empleó ChAT como marcador citoplasmático para localizar las motoneuronas del nA. Esto es debido a que se dieron problemas técnicos de señales inespecíficas por la combinación de varios fluoróforos que imposibilitaron el triple marcaje de c-Fos, *Foxp2* y ChAT. La implementación de enfoques metodológicos más avanzados, como estrategias de imagen multiplex o el uso de fluoróforos con mayor discriminación espectral, podría permitir en el futuro superar estas limitaciones y

validar de manera directa la coexpresión de estos marcadores a nivel celular. A pesar de estas limitaciones, la validez de esta aproximación se apoya en los bloques de inmunohistoquímica en los que sí se pudieron identificar las poblaciones colinérgicas del nA. Además, los tejidos usados mantuvieron la misma localización anatómica estereotáctica y recibieron el mismo muestreo rostro-caudal a lo largo de este núcleo.

De igual modo, tal y como se ha comentado en el apartado anterior, tanto en este trabajo como en nuestro estudio previo sobre la SGPdI (González-García, 2024a; González-García et al., 2024c), hemos podido caracterizar una expresión de *Foxp2* que es independiente de actividad. Esta expresión endógena de la proteína *Foxp2* en el nA sirvió de guía en la localización de esta región y ayudó a delimitar el área para cuantificar de forma fiable las células *c-Fos*⁺. Por tanto, a pesar de la ausencia del marcaje colinérgico, los estudios de inmunofluorescencia demostraron que el DMH/PeF parece tener un efecto, directo o indirecto, sobre grupos celulares *Foxp2*⁺ ubicados en la formación semicompacta del nA.

Aunque se ha establecido de forma general una organización somatotópica del nA, según la cual las neuronas que inervan los músculos intrínsecos de la laringe se localizan en las formaciones semicompacta (control músculo cricotiroideo) y laxa (resto musculatura intrínseca), estos límites no están claramente establecidos (Bieger & Hopkins, 1987). Para algunos autores las neuronas laríngeas presentan una organización difusa, entremezclada en el nA (Gacek, 1975; Hinrichsen & Ryan, 1981; Pásaro et al., 1983; Davis & Nail, 1984; Hisa et al., 1984; Basterra et al., 1987; Flint et al., 1991; Nahm et al., 1993), mientras que para otros los grupos neuronales que controlan dichos músculos presentan una organización más definida. De acuerdo con estos autores las neuronas del cricotiroideo presentan una posición más rostral y las que controlan el cricoaritenoides posterior y el tiroaritenoides se distribuyen de forma progresiva hacia regiones más caudales, ocupando el músculo cricoaritenoides posterior una posición más intermedia. Pero, incluso dentro de esta organización somatotópica, se han identificado áreas de solapamiento entre poblaciones neuronales adyacentes (Hernández-Morato et al., 2013).

Este solapamiento se ve reforzado por la forma en la que estas subdivisiones están inervadas. Aunque algunos autores insisten en que las motoneuronas del NLS se ubican dentro de la formación semicompacta y las motoneuronas del NLR dentro de la formación laxa (Pascual-Font et al., 2011; Weissbrod et al., 2011), otros proponen, además, que el músculo cricoaritenoides posterior está doblemente inervado por el NLS y por el NLR tanto en roedores como en humanos (Bieger & Hopkins, 1987; Kobler et al., 1994; Furusawa et al., 1996; Hydman & Mattson, 2008; Björck et al., 2012; Berdugo-Vega et al., 2014; Uludag et al., 2017; Martín-Oviedo et al., 2019). Esta doble inervación refuerza la idea de que el

cricoaritenideo posterior podría distribuirse de forma más difusa entre las formaciones semicompacta y laxa y no de forma tan definida en esta última subdivisión.

Si bien es cierto que existen estos solapamientos, la coexpresión de células c-Fos⁺/Foxp2⁺ en la formación semicompacta plantea la posibilidad de que el DMH/PeF module la actividad de circuitos laringo-respiratorios Foxp2 dependientes que controlan la apertura glótica. Así, el DMH/PeF ajustaría la respiración y la resistencia glótica en función del estado emocional y las demandas autonómicas. Aunque esta interpretación es coherente con la disminución de la presión subglótica observada en nuestros experimentos de estimulación eléctrica y química, no deben descartarse otras explicaciones alternativas. En especial, si se tiene en cuenta que los efectos observados a nivel bulbar, después de la estimulación del DMH/PeF, se dan mayoritariamente en subpoblaciones del nA categorizadas como no-motoneuronas, cuya identidad y funcionalidad se desconocen.

7.4. Interacción DMH/PeF y nA: experimentos del registro de la actividad neuronal unitaria extracelular del nA

Según la hipótesis de este bloque experimental, se esperaba que el registro unitario de la actividad extracelular del nA, durante la estimulación del DMH/PeF, evidenciara un efecto modulador de esta última región sobre la actividad de las motoneuronas laríngeas. Por ello, el objetivo fue caracterizar la actividad neuronal del nA mediante el registro neuronal unitario extracelular *in vivo*, comparando el patrón de disparo neuronal en reposo y tras la estimulación eléctrica del DMH/PeF.

Después de comprobar la posible relación entre el DMH/PeF y el nA (formación semicompacta y formación laxa) mediante la expresión de c-Fos, se estudió la relación electrofisiológica entre ambas zonas. Para ello, se realizó el registro de la actividad eléctrica unitaria extracelular de motoneuronas localizadas en estas formaciones del nA. Las coordenadas de registro abarcaron toda la estructura funcional del nA encargada de la actividad de la musculatura intrínseca laríngea. Con el fin de caracterizar el mayor número de neuronas dentro de la región de interés, se llevó a cabo un barrido de registro amplio y sistemático. En concreto, se hizo un barrido desde -12,90 mm posterior a bregma hasta -14,20 mm posterior a bregma en sentido rostro caudal, con una extensión lateral de 1,5-2,5 mm respecto a la línea media y una profundidad de 1,8 y 2,6 mm con respecto a superficie cerebral. Las coordenadas de registro se establecieron en base al atlas Paxinos y Watson (2007), aunque se hicieron adaptaciones en cada experimento, tomando como referencia la posición del obex para establecer el punto cero de las coordenadas (referencia atlas -14,40 mm posterior a bregma). El registro también se hizo en las regiones cardiorrespiratorias adyacentes, en concreto, en el GRVr, el grupo catecolaminérgico A1 y las células C1 adrenérgicas (A1/C1) y el bulbo ventrolateral caudal (CVLM, por sus siglas en inglés).

Las neuronas registradas se agruparon dependiendo de la descarga espontánea, la profundidad y de si la descarga se acoplaba a la función cardiovascular o a la respiratoria, propiedades que fueron evaluadas haciendo un análisis comparativo de la descarga mediante histogramas de frecuencia. Además, en esta clasificación se consideró la localización anatómica, para reducir la ambigüedad derivada del solapamiento funcional existente entre las regiones estudiadas (neuronas respiratorias del nA, neuronas del GRVr y neuronas cardiovasculares de los grupos A1/C1 y CVLM). La localización de las neuronas registradas se confirmó mediante los estudios histológicos que revelaban los microcoágulos en el tejido, generados por la corriente eléctrica de alta intensidad aplicada al final de cada experimento (250 μ A durante 20 s). El resto de los puntos de registro se dedujeron tomando como referencia el punto estereotáxico de la microcoagulación.

En total, se registró la actividad unitaria extracelular de 78 neuronas. De todas las neuronas registradas, se descartó 1, ya que el estudio histológico reveló que la profundidad no era la adecuada. El resto neuronas se encontraban dentro de las regiones descritas. De estas 77 neuronas restantes, todas, menos dos que eran silentes, presentaron la actividad espontánea típica de las neuronas de estas regiones bulbares, con una frecuencia de descarga variable que fueron coherentes con los datos obtenidos por otros autores y por nuestro grupo de investigación en estudios anteriores (Dawid-Milner et al., 1993, 1995; Moraes & Machado, 2015).

Del total de neuronas registradas, el 41% modificó su actividad tras la estimulación del DMH/PeF y el 36% mostró un patrón de descarga respiratorio. En concreto, dentro de este grupo se identificaron cuatro patrones diferentes, cuyas posiciones estereotáxicas coincidían con la posición clásica de las distintas neuronas respiratorias: inspiratorias laríngeas (10,26 % del total, con patrón de descarga decreciente), neuronas inspiratorias del GRVr (12,82%, con patrón de descarga creciente), neuronas espiratorias laríngeas E1 y E2 (6,41% y 6,41% respectivamente). Un alto porcentaje de este grupo de neuronas mostraron cambios en su frecuencia de descarga en reposo tras la estimulación del DMH/PeF, presentando tanto aumentos como disminuciones de actividad. El grupo que mayores cambios de actividad mostró fue el de las motoneuronas espiratorias (40% ambos tipos), seguido de las motoneuronas inspiratorias laríngeas (37,5%) y las motoneuronas inspiratorias del GRVr (30%). Estos resultados fueron consistentes con los obtenidos en los estudios de inmunohistoquímica que revelaron un aumento de la actividad neuronal de las formaciones del nA implicados en la musculatura laríngea.

Tras el análisis de los cambios de frecuencia de descarga neuronal de estos grupos respiratorios, se observó que la estimulación del DMH/PeF no modificó la actividad neuronal mucho más allá de los aumentos y disminuciones de frecuencias de descarga ya mencionadas. Aun así, se observó una excitación de 200 ms en una motoneurona espiratoria, situada en la región semicompacta y, quizá como el dato más importante extraído en esta sección de registro neuronal, tres motoneuronas inspiratorias laríngeas (37,5%) vieron facilitada su actividad cuando se estimulaba conjuntamente el DMH/PeF junto con el nervio vago. De hecho, aumentaron la actividad hasta cuatro veces durante dicha estimulación conjunta. Estos datos certifican que el DMH/PeF modula la actividad inspiratoria durante la respuesta al estrés vehiculizada desde esta región hipotalámica. Esta perspectiva coincide con lo que ya demostró nuestro grupo investigador en un estudio en gato (Dawid-Milner et al., 1995). En dicho estudio, mediante registro intracelular, se demostró que la estimulación conjunta del DMH/PeF y el nervio laríngeo superior facilitaba la actividad de las motoneuronas laríngeas. Esto confirma la importancia de las proyecciones entre ambas regiones y refleja la diversidad de conexiones sinápticas que existen en esta zona.

Con respecto a las neuronas registradas en regiones adyacentes a las formaciones semicompacta y laxa del nA, se registraron neuronas inspiratorias del GRVr (12,82%) y de la zona cardiovascular del A1/C1–CVLM (47,44%). Por otro lado, también se registró un número elevado de neuronas con actividad espontánea que no poseían un patrón de descarga cardiorrespiratorio claro (16,7%) pero que por posición estereotáctica se situaban entre el GRVr y las neuronas cardiovasculares A1/C1. De estos tres grupos neuronales, la descarga del 51,3% de las neuronas cardiovasculares y del 23,1% de las neuronas no moduladas cardiorrespiratoriamente se vio afectada por la actividad del DMH/PeF.

La diversidad entre las neuronas cardiovasculares en su respuesta al DMH/PeF o al vago en cuanto a aumentos o disminuciones de actividad, refleja la dualidad funcional de las zonas A1/C1 y CVLM, zonas de por sí antagónicas. La A1/C1 vehiculiza el aumento de actividad cardíaca desde el DMH/PeF, mientras que la CVLM tiene función opuesta. De hecho, la CVLM suele ser inhibida en la respuesta de defensa del animal para el mantenimiento de una presión arterial elevada (inhibición del reflejo baroreceptor a nivel del NTS) (Guyenet, 2006; Suarez-Roca et al., 2021). Por tanto, es lógico encontrar neuronas con patrón de descarga cardiovascular afectadas por la estimulación del DMH/PeF en ambos sentidos. Estas modificaciones de actividad no sólo afectan al aumento o disminución de la frecuencia de descarga en reposo, como ocurre con las neuronas inspiratorias del GRVr, sino que añaden también ejemplos de excitación (neurona cardiovascular excitada entre 50-200 ms) y de activación postestímulo de latencia corta (neurona no modulada cardiorrespiratoriamente activada a los 12, 22 y 30 ms desde el DMH/PeF). Eso significa que existe conexión (polisináptica seguramente) desde el DMH/PeF con estas regiones bulbares.

En el caso del grupo de neuronas que no mostraron modulación cardiorrespiratoria (s/m), los cambios en la actividad de descarga fueron escasos. Aun así, se observaron cambios puntuales en la frecuencia de disparo, con descensos en el 23% de los casos y con aumentos en el 13% de ellos. Además, una de ellas presenta una activación entre los 10–30 ms con máximos en los 12, 22 y 30 ms tras las estimulación del DMH/PeF. La ubicación anatómica de estas neuronas (entre las neuronas del GRVr y las neuronas cardiovasculares) y los resultados obtenidos parecen indicar que se trata de un grupo de neuronas de interconexión, o interneuronas, cuya función sería la de integrar la información aferente vagal y descendente procedente del DMH/PeF.

Todos estos datos constituyen las primeras evidencias electrofisiológicas de interacción funcional entre las neuronas del DMH/PeF y las neuronas ubicadas en las distintas regiones del nA. Con el objetivo de profundizar aún más en esta relación funcional, realizamos experimentos de activación eléctrica y química el DMH/PeF para estudiar el

posible papel que las motoneuronas laríngeas tienen en el control de la presión subglótica durante la respuesta cardiorrespiratoria evocada desde la DMH/PeF.

7.5. Interacción DMH/PeF y nA: experimentos con estimulación eléctrica/química y presión subglótica

Según la hipótesis planteada en este bloque experimental, se esperaba que la activación de estas regiones hipotalámicas indujera respuestas fisiológicas consistentes tanto en la dinámica cardiorrespiratoria como en la resistencia laríngea, y que esta pudiera medirse de manera fiable a través de la presión subglótica. Por ello, se tuvo como objetivo caracterizar el papel del DMH/PeF en la regulación cardiorrespiratoria y laríngea, mediante su activación eléctrica y química, y el uso de la técnica de “glotis aislada in situ” para medir de forma precisa la presión subglótica. Los resultados obtenidos en ambos tipos de estimulación respaldan esta hipótesis, ya que muestran una activación simpatoexcitadora junto a una disminución de la resistencia laríngea. A continuación, se analizan, por separado, los efectos observados tras la estimulación eléctrica y química.

7.5.1. Efectos de la estimulación eléctrica en el DMH/PeF sobre la presión subglótica

Inicialmente, los experimentos de estimulación eléctrica se llevaron a cabo con el objetivo de confirmar la localización del DMH/PeF. Para ello, se tuvieron en cuenta los efectos cardiorrespiratorios típicos de esta región. Asimismo, estos experimentos sirvieron para estudiar variaciones en la presión subglótica durante la estimulación, que se interpretan como cambios en la resistencia laríngea asociados a la posición de las cuerdas vocales. Solo se consideraron los datos de los animales que mostraron cambios cardiorrespiratorios característicos de una respuesta de defensa.

La estimulación eléctrica del DMH/PeF produjo respuestas fisiológicas marcadas en todos los parámetros evaluados, tanto a nivel cardiorrespiratorio como laríngeo. A nivel respiratorio, se registró un aumento significativo de la frecuencia respiratoria, junto a una reducción de los tiempos inspiratorio y espiratorio. Además, se produjo un incremento de la presión pleural inspiratoria que se tradujo en un aumento de la actividad frénica y, junto a la disminución de los tiempos inspiratorio y espiratorio, en un mayor flujo inspiratorio. Estos resultados indican una activación potente de los centros respiratorios y una facilitación del ritmo ventilatorio.

A nivel cardiovascular, los efectos observados (aumento de presión arterial y frecuencia cardíaca) mostraron un perfil de activación simpática, característico de una respuesta de defensa. Todos los cambios cardiorrespiratorios en conjunto sugieren que el DMH/PeF integra de forma coordinada funciones autonómicas para generar respuestas adaptativas ante situaciones de alerta. Estos hallazgos son consistentes con los resultados descritos con anterioridad por nuestro grupo de investigación mediante la estimulación

eléctrica del DMH/PeF, que refuerzan el papel de esta región en la coordinación de las respuestas cardiorrespiratorias al estrés (Díaz-Casares et al., 2009; López-González et al., 2013).

Inicialmente, en la literatura científica, los estudios de estimulación eléctrica que identificaron el papel del DMH/PeF fueron cuestionados, ya que parecían activar tanto somas neuronales como fibras de paso (Bandler, 1982; Tan & Dampney, 1983). Sin embargo, los estudios de microinyección de glutamato revelaron respuestas cardiorrespiratorias similares, lo que confirmó que ambos tipos de estimulación inducen la activación de las neuronas del DMH/PeF (Goodchild et al., 1982; DiMicco et al., 1986; Lipski et al., 1988; Fontes et al., 2001; DiMicco et al., 2002; Cao et al., 2004; Horiuchi et al., 2004; McDowall et al., 2006). Por tanto, los resultados obtenidos en este estudio por la estimulación eléctrica del DMH/PeF se pueden considerar con mayor solidez.

Aunque los trabajos anteriores han descrito los efectos cardiorrespiratorios inducidos por la estimulación eléctrica de esta región, hasta la fecha ninguno había estudiado su influencia sobre la actividad laríngea. En el presente estudio se incorporó el registro de la presión subglótica (variable ya medida por nuestro grupo en estudios centrados en la SGPdl) con el objetivo de analizar, por primera vez, su relación con la activación del DMH/PeF. En concreto, se observó una disminución significativa de la presión subglótica durante la estimulación, que refleja una disminución importante en la resistencia laríngea. Este hallazgo sugiere una apertura activa de la glotis, probablemente mediada por proyecciones descendentes desde el DMH/PeF hacia el nA, donde se encuentran las motoneuronas laríngeas (Hernández-Morato et al., 2013; Fogarty, 2024). La caída de la presión subglótica es coherente con un mecanismo fisiológico de reducción de la resistencia al paso de aire, facilitando un aumento rápido del flujo ventilatorio.

7.5.2. Efectos de estimulación química en el DMH/PeF sobre la presión subglótica

Los experimentos de estimulación química con glutamato en el DMH/PeF se realizaron para confirmar y apoyar los cambios cardiorrespiratorios y laríngeos encontrados en los estudios de estimulación eléctrica. La estimulación química aseguró que los cambios encontrados se debían a una activación localizada de los cuerpos celulares en el DMH/PeF y no al reclutamiento de fibras de paso o poblaciones neuronales adyacentes.

Se utilizó glutamato para activar las neuronas en el DMH/PeF, en lugar de otros métodos de estimulación como la desinhibición con bicuculina o el ácido homocisteínico, debido a que hemos demostrado con anterioridad que se trata de un método efectivo y confiable (Dawid-Milner et al., 2001; Lara et al., 2002; Dawid-Milner et al., 2003; González-García, 2024c). Al igual que en los experimentos de estimulación eléctrica, solo se

consideraron los datos de los animales que mostraron cambios cardiorrespiratorios característicos de una respuesta de defensa.

La activación química del DMH/PeF mediante microinyecciones de glutamato replicó prácticamente el perfil de activación observado con la estimulación eléctrica, aunque con menor intensidad en algunas variables. Esta ligera diferencia en la magnitud de los resultados podría explicarse por una diferencia en la extensión de la estimulación química frente a la eléctrica. En concreto, la activación química indujo una respuesta simpatoexcitatoria caracterizada por hipertensión, taquicardia y taquipnea. El aumento de la frecuencia respiratoria se dio junto a una disminución de los tiempos inspiratorio y espiratorio, así como junto a una caída moderada de la presión subglótica. Asimismo, estos cambios respiratorios se acompañaron de un aumento de la presión pleural. En comparación con las microinyecciones de PBS (grupo control), los efectos del glutamato fueron significativamente mayores, tanto en variables respiratorias como cardiovasculares. Además, los efectos inducidos por glutamato fueron reversibles, ya que las variables fisiológicas regresaron a sus niveles basales.

El perfil simpatoexcitatorio descrito en este estudio coincide con los observados en trabajos anteriores de este equipo de investigación, basados en la estimulación química del DMH/PeF (Díaz-Casares et al., 2012; López-González et al., 2018) y los observados por otros autores (Fontes et al., 2001; DiMicco et al., 2002; Horiuchi et al., 2004; Fontes et al., 2023). Estos hallazgos, en conjunto, no solo refuerzan el papel de DMH/PeF en la coordinación de respuestas cardiorrespiratorias al estrés, sino que además confirman los resultados obtenidos por la estimulación eléctrica de DMH/PeF en este estudio y en los previos a este (Díaz-Casares et al., 2009; López-González et al., 2013).

Funcionalmente, este patrón de respuestas cardiorrespiratorias y laríngeas podría interpretarse como parte de una respuesta defensiva o de alerta, en la que la apertura glótica y el aumento del flujo aéreo facilitan una ventilación rápida y eficaz. Todo ello, para mejorar la oxigenación y eliminar los niveles elevados de CO₂ durante el estrés. La respuesta cardiovascular simpatoexcitatoria, por su parte, parece tener como objetivo principal la correcta perfusión de aquellos órganos con mayor demanda de oxígeno en estas condiciones (Loewy, 1991). Esta respuesta es consistente con la conocida participación del DMH/PeF en el control de estados de alerta y comportamiento orientado a la acción (DiMicco et al., 2002; Cao et al., 2004; Horiuchi et al., 2004; McDowall et al., 2006; Fortuna et al., 2009; ligaya et al., 2012; Bondarenko et al., 2015; Sabetghadam et al., 2017; Brasil et al., 2020; Narai et al., 2024; Zahner et al., 2024).

En roedores, el DMH/PeF ejerce esta función autonómica a través de vías neuronales que proyectan hacia centros cardiorrespiratorios ubicados en el tronco del

encéfalo. En concreto, el DMH/PeF ejerce su influencia en la actividad cardiovascular a través de vías que alcanzan el BVLr (Cao et al., 2004; Huang et al., 2010; Li et al., 2018), el RP (Samuels et al., 2002; Cao et al., 2004; Horiuchi et al., 2004) y la región A5 (Bruinstroop et al., 2012), involucrados en el control del tono simpático y de la frecuencia cardíaca. Por otra parte, la respuesta respiratoria parece estar mediada por proyecciones que reclutan grupos de neuronas ubicados en los núcleos KF y el PBI y cuyos efectos dependen de receptores de glutamato (Dawid-Milner et al., 2003; Díaz-Casares et al., 2009; Díaz-Casares et al., 2012; López-González et al., 2013). De igual modo, sus conexiones hacia el NTS facilitan los reflejos barorreceptor y quimiorreceptor para mantener los niveles elevados de presión arterial, frecuencia cardíaca y frecuencia respiratoria (Silva-Carvalho et al., 1995a; Silva-Carvalho et al., 1995b).

De manera complementaria, los resultados de la estimulación química también muestran que la activación del DMH/PeF produce una disminución sólida de la presión subglótica, que se traduce en una disminución de la resistencia laríngea y una mayor apertura glótica. El reclutamiento de grupos neuronales ubicados en el nA y el nRA observado en el análisis inmunohistoquímico respalda fuertemente esta interpretación, ya que ambas estructuras están integradas en circuitos bulbares que controlan la actividad laríngea y espiratoria. Estas observaciones también concuerdan con la organización hipotálamo-bulbar descrita por Nakamura et al. (2022), en la cual el DMH/PeF transmite comandos defensivos que sincronizan los outputs autonómicos y respiratorios.

Por otro lado, en estudios recientes hemos demostrado que la SGPdI participa activamente en el control del nA (González-García et al., 2024a; González-García et al., 2024c). Por tanto, la disminución de la presión subglótica por la activación de DMH/PeF podría ser explicada no solo por la influencia de esta región sobre los centros respiratorios previamente descritos, sino también por su conectividad con la SGPdI. La SGPdI desempeña un papel clave en la respuesta de defensa y regula funciones autonómicas, motoras y nociceptivas, que facilitan conductas activas de lucha o huida (Bandler et al., 2000; Benarroch, 2012; Linnman et al., 2012; Dampney et al., 2013; Dampney, 2016; Deng et al., 2016; Motta et al., 2017; Klingbeil et al., 2021; Vázquez-León et al., 2023; Zhang et al., 2024), similares a las inducidas por la activación del DMH/PeF (Hilton & Redfern, 1986; Yardley & Hilton, 1986). De hecho, diversos estudios han demostrado que la inhibición de una de ellas atenúa las respuestas generadas por la otra (de Menezes et al., 2006; de Menezes et al., 2009; Horiuchi et al., 2009).

La interconectividad entre el DMH/PeF y la SGPdI sugiere que ambas estructuras podrían formar parte de un circuito funcional compartido no solo para la regulación cardiorrespiratoria, sino también para el control laríngeo (de Git et al., 2018). Estos resultados posicionan al DMH/PeF como una estructura hipotalámica crítica capaz de

modular las motoneuronas e interneuronas laríngeas ubicadas en el nA, así como poblaciones premotoras espiratorias en el nRA. Todo ello, con la finalidad de adaptar la actividad respiratoria a las demandas autonómicas, conductuales y emocionales de la respuesta de defensa.

A nivel clínico, el DMH/PeF se ha relacionado con la aparición de patologías como la hipertensión, las arritmias y las alteraciones del patrón respiratorio asociadas al miedo o al pánico (Korner, 2007; Simms et al., 2009; Esler, 2010; Malpas, 2010; Fisher & Paton, 2012; Briant et al., 2015; Meuret et al., 2017; Johnson, 2019; de Silva et al., 2020). El hecho de que numerosos trastornos de la voz tengan un origen psicobiológico y que la producción de esta dependa de una coordinación precisa entre la actividad laríngea y la respiración, hace que no resulte extraño que el estrés tenga un impacto significativo en la función vocal (Baker, 2016). La disfonía musculotensional es un ejemplo claro de ello, caracterizada por un aumento de la tensión laríngea y una descoordinación muscular que afectan de forma directa al control glótico (Van Houtte, 2011; Fernández et al., 2020; Garaycochea et al., 2021).

De acuerdo con los resultados del presente estudio, el DMH/PeF está implicado en la función laríngea, como sugiere la disminución de la presión subglótica y el reclutamiento de estructuras bulbares relacionadas con el control laringo-respiratorio. No obstante, y aunque el presente trabajo ha combinado diversas aproximaciones metodológicas, resulta necesario profundizar en la caracterización de estos circuitos y en la naturaleza funcional de las subpoblaciones neuronales del nA. Para avanzar en esta línea, podrían incorporarse técnicas complementarias como la electromiografía laríngea como medida independiente de validación funcional de la activación motora laríngea, junto con herramientas de trazado transneuronal y aproximaciones optogenéticas en animales conscientes para definir con mayor precisión la organización y función del circuito DMH/PeF-nA.

La profundización en estos mecanismos abre también nuevas perspectivas de investigación, ya que plantea la posibilidad de que el DMH/PeF esté implicado en el desarrollo de trastornos vocales asociados al estrés. Su papel en la respuesta autonómica sugiere que una disfunción en este sistema podría alterar tanto la respiración como la motricidad laríngea, favoreciendo la aparición de disfonías de origen psicógeno y por estrés. En este contexto, el estudio de estas conexiones en modelos animales con lesiones o alteraciones específicas en estas regiones permitiría establecer relaciones causales y avanzar en la identificación de posibles dianas terapéuticas.

VIII. CONCLUSIONES

1. La microestimulación eléctrica de la región dorsomedial hipotalámica y el área perifornical induce un aumento significativo de la actividad neuronal, medida como expresión de la proteína c-Fos, en el lado ipsilateral a la estimulación de poblaciones celulares motoras y no motoras localizadas en la formación compacta y semicompacta del núcleo ambiguo y núcleo retroambiguo.
2. La expresión del factor de transcripción Foxp2 a lo largo de todo el núcleo ambiguo y núcleo retroambiguo muestra predominancia ipsilateral, con una expresión especialmente destacada en las poblaciones celulares no motoras de las formaciones semicompacta y laxa, relacionadas con el control laríngeo. La microestimulación eléctrica de la región dorsomedial hipotalámica y el área perifornical no induce cambios en la expresión de esta proteína.
3. La microestimulación eléctrica de la región dorsomedial hipotalámica y el área perifornical induce un aumento de la actividad neuronal en poblaciones que coexpresan c-Fos/Foxp2 en la formación semicompacta del núcleo ambiguo.
4. Mediante el registro de la actividad unitaria extracelular de neuronas localizadas en el núcleo ambiguo y zonas adyacentes durante la microestimulación eléctrica de la región dorsomedial hipotalámica y área perifornical, se han caracterizado hasta 6 grupos neuronales distintos: inspiratorias decrecientes, inspiratorias crecientes, espiratorias E1 (postinspiratorias), espiratorias E2, cardiovasculares y no moduladas.
5. La microestimulación eléctrica de la región dorsomedial hipotalámica y el área perifornical modifica la actividad del 41% del total de neuronas registradas unitariamente. Se observan aumentos o disminuciones en la frecuencia de descarga, así como la presencia de activaciones, excitaciones y facilitaciones, lo que demuestra la gran complejidad de las interacciones existentes entre las dos regiones del estudio.
6. La coestimulación del nervio vago y de la región dorsomedial hipotalámica y el área perifornical produce una respuesta de facilitación en el 38% de las motoneuronas vagales inspiratorias registradas, en las que la actividad de descarga se incrementa hasta cuatro veces. Este efecto sugiere un papel modulador de la región dorsomedial hipotalámica y el área perifornical sobre la actividad glótica durante la respuesta de defensa.

7. La microestimulación eléctrica y química con glutamato de la región dorsomedial hipotalámica y el área perifornical induce una respuesta cardiorrespiratoria clásica de defensa, caracterizada por hipertensión, taquicardia y taquipnea.
8. Bajo nuestras condiciones experimentales, la estimulación eléctrica y química con glutamato en la región dorsomedial hipotalámica y el área perifornical induce una disminución de la resistencia laríngea, medida en forma de presión subglótica.
9. Nuestro estudio sugiere que la activación de la región dorsomedial hipotalámica y el área perifornical activa mecanismos centrales que aumentan la actividad de motoneuronas laríngeas inspiratorias. Al mismo tiempo disminuye la actividad de las espiratorias, lo que parece facilitar el incremento de la frecuencia respiratoria evocada durante la respuesta de defensa del animal.

CONCLUSIÓN GENERAL

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral en rata, mediante el uso de técnicas neuromorfológicas, electroneurofisiológicas y neurofarmacológicas, aportan las primeras evidencias funcionales que apoyan el papel modulador de la región dorsomedial hipotalámica y área perifornical sobre la actividad de las motoneuronas laríngeas del núcleo ambiguo y de las neuronas premotoras del núcleo retroambiguo durante la respuesta de defensa evocada por la estimulación de esta área.

VIII. CONCLUSIONS

1. Electrical microstimulation of the dorsomedial hypothalamic region and the perifornical area induces a significant increase in neuronal activity, measured as c-Fos protein expression, on the ipsilateral side of stimulation in motor and non-motor cell populations located in the compact and semicompact formations of the nucleus ambiguus and the retroambiguus nucleus.
2. The expression of the transcription factor Foxp2 throughout the ambiguus and the retroambiguus nuclei shows an ipsilateral predominance, with particularly prominent expression in non-motor cell populations of the semicompact and loose formations associated with laryngeal control. Electrical microstimulation of the dorsomedial hypothalamic region and the perifornical area does not induce changes in the expression of this protein.
3. Electrical microstimulation of the dorsomedial hypothalamic region and the perifornical area induces an increase in neuronal activity in cell populations co-expressing c-Fos and Foxp2 within the semicompact formation of the nucleus ambiguus.
4. Extracellular unit recordings obtained during electrical microstimulation of the dorsomedial hypothalamic region and the perifornical area allowed the characterization of up to six distinct neuronal populations within the nucleus ambiguus and adjacent regions: decrementing inspiratory, augmenting inspiratory, expiratory E1 (postinspiratory), expiratory E2, cardiovascular, and non-modulated neurons.
5. Electrical microstimulation of the dorsomedial hypothalamic region and the perifornical area modifies the activity of 41% of the total neurons recorded using extracellular single-unit recordings. Increases or decreases in firing rate are observed, as well as the presence of activations, excitations, and facilitations, demonstrating the great complexity of the interactions between both regions.
6. Co-stimulation of the vagus nerve and the dorsomedial hypothalamic region and perifornical area produces a facilitatory response in 38% of the recorded inspiratory vagal motoneurons, in which firing activity increases by up to fourfold. This effect suggests a modulatory role of the dorsomedial hypothalamic region and perifornical area on glottic activity during the defensive response.

7. Electrical and chemical microstimulation with glutamate of the dorsomedial hypothalamic region and the perifornical area induces a classical cardiorespiratory defensive response, characterized by hypertension, tachycardia, and tachypnea.
8. Under our experimental conditions, electrical and chemical stimulation with glutamate of the dorsomedial hypothalamic region and the perifornical area, induces a decrease in laryngeal resistance, measured through subglottic pressure.
9. Our study suggests that activation of the dorsomedial hypothalamic region and the perifornical area triggers central mechanisms that increase the activity of inspiratory laryngeal motoneurons, while decreasing the activity of expiratory motoneurons, which may facilitate the increase in respiratory frequency evoked during the animal's defensive response.

GENERAL CONCLUSION

Overall, the results of this study, obtained in rat using neuromorphological, electrophysiological, and neuropharmacological techniques, provide the first functional evidence supporting the modulatory role of the dorsomedial hypothalamic region and the perifornical area on the activity of laryngeal motoneurons of the nucleus ambiguus and premotor neurons of the nucleus retroambiguus during the defensive response evoked by stimulation of this area.



IX. REFERENCIAS

- Abbott, S. B., Kanbar, R., Bochorishvili, G., Coates, M. B., Stornetta, R. L., & Guyenet, P. G. (2012). C1 neurons excite locus coeruleus and A5 noradrenergic neurons along with sympathetic outflow in rats. *The Journal of physiology*, *590*(12), 2897–2915. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.232157>
- Abdelkafy, W. M., Smith, J. Q., Henriquez, O. A., Golub, J. S., Xu, J., Rojas, M., Brigham, K. L., & Johns, M. M. (2007). Age-related changes in the murine larynx: initial validation of a mouse model. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*, *116*(8), 618–622. <https://doi.org/10.1177/000348940711600810>
- Abrahams, V. C., Hilton, S. M., & Zbrozyna, A. (1960). Active muscle vasodilatation produced by stimulation of the brain stem: its significance in the defence reaction. *The Journal of physiology*, *154*(3), 491–513. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1960.sp006593>
- Adametz, J., & O'leary, J. L. (1959). Experimental mutism resulting from periaqueductal lesions in cats. *Neurology*, *9*, 636–642. <https://doi.org/10.1212/wnl.9.10.636>
- Akbar, S., Subhan, F., Qamar, R., Akbar, A., Shahbaz, N., Aamir, M., Siddique, N., & Islam, S. U. (2024). 6-Hydroxyflavanone treats anxiety and chemotherapy-induced neuropathy in Sprague-Dawley rats. *Frontiers in pharmacology*, *15*, 1486918. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1486918>
- Akunna, G. G., & Abah, E. D. (2023). Deciphering the nucleus ambiguus: Anatomy, functions and clinical implications explored. *Journal of Clinical and Medical Sciences*, *7*(6), 264. <https://doi.org/10.35248/2593-9947.23.7.264>
- Alli, O., Berzofsky, C., Sharma, S., & Pitman, M. J. (2013). Development of the rat larynx: a histological study. *The Laryngoscope*, *123*(12), 3093–3098. <https://doi.org/10.1002/lary.24145>
- Altafullah, I., Shipley, C., & Buchwald, J. S. (1988). Voiced calls evoked by hypothalamic stimulation in the cat. *Experimental brain research*, *71*(1), 21–32. <https://doi.org/10.1007/BF00247519>
- Altemus, M., Redwine, L. S., Leong, Y. M., Frye, C. A., Porges, S. W., & Carter, C. S. (2001). Responses to laboratory psychosocial stress in postpartum women. *Psychosomatic medicine*, *63*(5), 814–821. <https://doi.org/10.1097/00006842-200109000-00015>
- Amorim, M. R., Wang, X., Aung, O., Bevans-Fonti, S., Anokye-Danso, F., Ribeiro, C., Escobar, J., Freire, C., Pho, H., Dergacheva, O., Branco, L. G. S., Ahima, R. S., Mendelowitz, D., & Polotsky, V. Y. (2023). Leptin signaling in the dorsomedial

- hypothalamus couples breathing and metabolism in obesity. *Cell reports*, 42(12), 113512. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113512>
- Anderson, T. M., & Ramirez, J. M. (2017). Respiratory rhythm generation: triple oscillator hypothesis. *F1000Research*, 6, 139. <https://doi.org/10.12688/f1000research.10193.1>
- Arandjelović, J., Ivanović, J., Batinić, B., Mirković, K., Matović, B. D., & Savić, M. M. (2024). Sucrose binge-eating and increased anxiety-like behavior in Sprague-Dawley rats exposed to repeated LPS administration followed by chronic mild unpredictable stress. *Scientific reports*, 14(1), 22569. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-72450-8>
- Arch, J. J., & Craske, M. G. (2006). Mechanisms of mindfulness: emotion regulation following a focused breathing induction. *Behaviour research and therapy*, 44(12), 1849–1858. <https://doi.org/10.1016/j.brat.2005.12.007>
- Arthur, J. M., Bonham, A. C., Gutterman, D. D., Gebhart, G. F., Marcus, M. L., & Brody, M. J. (1991). Coronary vasoconstriction during stimulation in hypothalamic defense region. *The American journal of physiology*, 260(2 Pt 2), R335–R345. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1991.260.2.R335>
- Ashhad, S., & Feldman, J. L. (2020). Emergent Elements of Inspiratory Rhythmogenesis: Network Synchronization and Synchrony Propagation. *Neuron*, 106(3), 482–497.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.02.005>
- Ausborn, J., Koizumi, H., Barnett, W. H., John, T. T., Zhang, R., Molkov, Y. I., Smith, J. C., & Rybak, I. A. (2018). Organization of the core respiratory network: Insights from optogenetic and modeling studies. *PLoS computational biology*, 14(4), e1006148. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006148>
- Baertsch, N. A., Baertsch, H. C., & Ramirez, J. M. (2018). The interdependence of excitation and inhibition for the control of dynamic breathing rhythms. *Nature communications*, 9(1), 843. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03223-x>
- Baertsch, N. A., Severs, L. J., Anderson, T. M., & Ramirez, J. M. (2019). A spatially dynamic network underlies the generation of inspiratory behaviors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(15), 7493–7502. <https://doi.org/10.1073/pnas.1900523116>
- Baker J. (2016). Functional voice disorders: Clinical presentations and differential diagnosis. *Handbook of clinical neurology*, 139, 389–405. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801772-2.00034-5>

- Bandler R. (1982). Induction of 'rage' following microinjections of glutamate into midbrain but not hypothalamus of cats. *Neuroscience letters*, 30(2), 183–188. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(82\)90294-4](https://doi.org/10.1016/0304-3940(82)90294-4)
- Bandler, R., & Carrive, P. (1988). Integrated defence reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal grey region of the unrestrained cat. *Brain research*, 439(1-2), 95–106. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)91465-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)91465-5)
- Bandler, R., Keay, K. A., Floyd, N., & Price, J. (2000). Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. *Brain research bulletin*, 53(1), 95–104. [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(00\)00313-0](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(00)00313-0)
- Barbier, M., González, J. A., Houdayer, C., Burdakov, D., Risold, P. Y., & Croizier, S. (2021). Projections from the dorsomedial division of the bed nucleus of the stria terminalis to hypothalamic nuclei in the mouse. *The Journal of comparative neurology*, 529(5), 929–956. <https://doi.org/10.1002/cne.24988>
- Barker, A. J., Koch, U., Lewin, G. R., & Pyott, S. (2021). Hearing and vocalizations in the naked mole-rat. En R. Buffenstein, T. J. Park, & M. M. Holmes (Eds.), *The extraordinary biology of the naked mole-rat*. Springer.
- Basterra, J., Chumbley, C., & Dilly, P. N. (1987). Topographic distribution of laryngeal motor neurons in the nucleus ambiguus of the guinea pig studied by horseradish peroxidase (HRP) technique. *Acta oto-laryngologica*, 103(1-2), 105–110. <https://doi.org/10.3109/00016488709134704>
- Bautista, T. G., & Dutschmann, M. (2014). Ponto-medullary nuclei involved in the generation of sequential pharyngeal swallowing and concomitant protective laryngeal adduction in situ. *The Journal of physiology*, 592(12), 2605–2623. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.272468>
- Beckstead, R. M., Morse, J. R., & Norgren, R. (1980). The nucleus of the solitary tract in the monkey: projections to the thalamus and brain stem nuclei. *The Journal of comparative neurology*, 190(2), 259–282. <https://doi.org/10.1002/cne.901900205>
- Belafsky, P. C., & Rees Lintzenich, C. R. (2013). Development, anatomy, and physiology of the pharynx. In R. Shaker, P. C. Belafsky, G. N. Postma, & C. Easterling (Eds.), *Principles of deglutition: A multidisciplinary text for swallowing and its disorders* (pp. 165–173). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3794-9_12
- Bellani, G., Bronco, A., Arrigoni Marocco, S., Pozzi, M., Sala, V., Eronia, N., Villa, G., Foti, G., Tagliabue, G., Eger, M., & Pesenti, A. (2018). Measurement of Diaphragmatic Electrical Activity by Surface Electromyography in Intubated Subjects and Its

- Relationship With Inspiratory Effort. *Respiratory care*, 63(11), 1341–1349. <https://doi.org/10.4187/respcare.06176>
- BeMent, S. L., & Ranck, J. B., Jr (1969). A model for electrical stimulation of central myelinated fibers with monopolar electrodes. *Experimental neurology*, 24(2), 171–186. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(69\)90013-2](https://doi.org/10.1016/0014-4886(69)90013-2)
- Benarroch E. E. (2012). Periaqueductal gray: an interface for behavioral control. *Neurology*, 78(3), 210–217. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31823fcdde>
- Berdugo-Vega, G., Arias-Gil, G., Rodriguez-Niedenführ, M., Davies, D. C., Vázquez, T., & Pascual-Font, A. (2014). GFAP immunoreactivity within the rat nucleus ambiguus after laryngeal nerve injury. *Journal of anatomy*, 225(5), 492–501. <https://doi.org/10.1111/joa.12231>
- Berger A. J. (1977). Dorsal respiratory group neurons in the medulla of cat: spinal projections, responses to lung inflation and superior laryngeal nerve stimulation. *Brain research*, 135(2), 231–254. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(77\)91028-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(77)91028-9)
- Bernabe, C. S., Caliman, I. F., de Abreu, A. R. R., Molosh, A. I., Truitt, W. A., Shekhar, A., & Johnson, P. L. (2024). Identification of a novel perifornical-hypothalamic-area-projecting serotonergic system that inhibits innate panic and conditioned fear responses. *Translational psychiatry*, 14(1), 60. <https://doi.org/10.1038/s41398-024-02769-3>
- Bester, H., Besson, J. M., & Bernard, J. F. (1997). Organization of efferent projections from the parabrachial area to the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *The Journal of comparative neurology*, 383(3), 245–281. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9861\(19970707\)383:3<245::aid-cne1>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(19970707)383:3<245::aid-cne1>3.0.co;2-3)
- Beton, S., Yücel, L., Başak, H., & Çiler Büyükatalay, Z. (2022). The Elderly Voice: Mechanisms, Disorders and Treatment Methods. *Turkish archives of otorhinolaryngology*, 60(4), 220–226. <https://doi.org/10.4274/tao.2022.2022-8-1>
- Biancardi, V., Saini, J., Pageni, A., Prashaad M, H., Funk, G. D., & Pagliardini, S. (2021). Mapping of the excitatory, inhibitory, and modulatory afferent projections to the anatomically defined active expiratory oscillator in adult male rats. *The Journal of comparative neurology*, 529(4), 853–884. <https://doi.org/10.1002/cne.24984>
- Bianchi, R., Corsetti, G., Rodella, L., Tredici, G., & Gioia, M. (1998). Supraspinal connections and termination patterns of the parabrachial complex determined by the biocytin anterograde tract-tracing technique in the rat. *Journal of anatomy*, 193(Pt3) (Pt 3), 417–430. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.1998.19330417.x>

- Bieger, D., & Hopkins, D. A. (1987). Viscerotopic representation of the upper alimentary tract in the medulla oblongata in the rat: the nucleus ambiguus. *The Journal of comparative neurology*, 262(4), 546–562. <https://doi.org/10.1002/cne.902620408>
- Bienkowski, M. S., & Rinaman, L. (2013). Common and distinct neural inputs to the medial central nucleus of the amygdala and anterior ventrolateral bed nucleus of stria terminalis in rats. *Brain structure & function*, 218(1), 187–208. <https://doi.org/10.1007/s00429-012-0393-6>
- Björck, G., Margolin, G., Måbäck, G. M., Persson, J. K., Mattsson, P., & Hydman, J. (2012). New animal model for assessment of functional laryngeal motor innervation. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*, 121(10), 695–699. <https://doi.org/10.1177/000348941212101013>
- Blount, Q., Hernández-Morato, I., Moayed, Y., & Pitman, M. J. (2023). Expression of Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor Receptors Within Nucleus Ambiguus During Rat Development. *The Laryngoscope*, 133(9), 2240–2247. <https://doi.org/10.1002/lary.30440>
- Bochorishvili, G., Stornetta, R. L., Coates, M. B., & Guyenet, P. G. (2012). Pre-Bötzing complex receives glutamatergic innervation from galaninergic and other retrotrapezoid nucleus neurons. *The Journal of comparative neurology*, 520(5), 1047–1061. <https://doi.org/10.1002/cne.22769>
- Boers, J., Klop, E. M., Hulshoff, A. C., de Weerd, H., & Holstege, G. (2002). Direct projections from the nucleus retroambiguus to cricothyroid motoneurons in the cat. *Neuroscience letters*, 319(1), 5–8. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(01\)02395-3](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(01)02395-3)
- Bolme, P., Nagai, S. H., Uvnäs, B., & Wallenberg, L. R. (1967). Circulatory and behavioural effects on electrical stimulation of the sympathetic vasodilator areas in the hypothalamus and the mesencephalon in unanesthetized dogs. *Acta physiologica Scandinavica*, 70(3), 334–336. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1967.tb03633.x>
- Bondarenko, E., Beig, M. I., Hodgson, D. M., Braga, V. A., & Nalivaiko, E. (2015). Blockade of the dorsomedial hypothalamus and the perifornical area inhibits respiratory responses to arousing and stressful stimuli. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 308(10), R816–R822. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00415.2014>
- Bondarenko, E., Hodgson, D. M., & Nalivaiko, E. (2014). Amygdala mediates respiratory responses to sudden arousing stimuli and to restraint stress in rats. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 306(12), R951–R959. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00528.2013>

- Bonham, A. C., Gutterman, D. D., Arthur, J. M., Marcus, M. L., Gebhart, G. F., & Brody, M. J. (1987). Neurogenic regulation of coronary blood flow: evidence for a central nervous system pathway. *Circulation research*, 61(5 Pt 2), II42–II46.
- Bonis, J. M., Neumueller, S. E., Krause, K. L., Kiner, T., Smith, A., Marshall, B. D., Qian, B., Pan, L. G., & Forster, H. V. (2010). Site-specific effects on respiratory rhythm and pattern of ibotenic acid injections in the pontine respiratory group of goats. *Journal of Applied Physiology*, 109(1), 171–188. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00934.2009>
- Bonis, J. M., Neumueller, S. E., Krause, K. L., Pan, L. G., Hodges, M. R., & Forster, H. V. (2013). Contributions of the Kölliker-Fuse nucleus to coordination of breathing and swallowing. *Respiratory physiology & neurobiology*, 189(1), 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2013.06.003>
- Bonis, J. M., Neumueller, S. E., Marshall, B. D., Krause, K. L., Qian, B., Pan, L. G., Hodges, M. R., & Forster, H. V. (2011). The effects of lesions in the dorsolateral pons on the coordination of swallowing and breathing in awake goats. *Respiratory physiology & neurobiology*, 175(2), 272–282. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2010.12.002>
- Bonnet, L., Comte, A., Tatu, L., Millot, J. L., Moulin, T., & Medeiros de Bustos, E. (2015). The role of the amygdala in the perception of positive emotions: an "intensity detector". *Frontiers in behavioral neuroscience*, 9, 178. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00178>
- Boulanger-Bertolus, J., & Mouly, A. M. (2021). Ultrasonic Vocalizations Emission across Development in Rats: Coordination with Respiration and Impact on Brain Neural Dynamics. *Brain sciences*, 11(5), 616. <https://doi.org/10.3390/brainsci11050616>
- Braga, V. A., Soriano, R. N., & Machado, B. H. (2006). Sympathoexcitatory response to peripheral chemoreflex activation is enhanced in juvenile rats exposed to chronic intermittent hypoxia. *Experimental physiology*, 91(6), 1025–1031. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2006.034868>
- Brailoiu, E., McGuire, M., Shuler, S. A., Deliu, E., Barr, J. L., Abood, M. E., & Brailoiu, G. C. (2017). Modulation of cardiac vagal tone by bradykinin acting on nucleus ambiguus. *Neuroscience*, 365, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.09.034>
- Branco, A., Todorovic Fabro, A., Gonçalves, T. M., & Garcia Martins, R. H. (2015). Alterations in extracellular matrix composition in the aging larynx. *Otolaryngology--head and neck surgery: official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 152(2), 302–307. <https://doi.org/10.1177/0194599814562727>

- Brasil, T. F. S., Lopes-Azevedo, S., Belém-Filho, I. J. A., Fortaleza, E. A. T., Antunes-Rodrigues, J., & Corrêa, F. M. A. (2020). The Dorsomedial Hypothalamus Is Involved in the Mediation of Autonomic and Neuroendocrine Responses to Restraint Stress. *Frontiers in pharmacology*, *10*, 1547. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01547>
- Briant, L. J., O'Callaghan, E. L., Champneys, A. R., & Paton, J. F. (2015). Respiratory modulated sympathetic activity: a putative mechanism for developing vascular resistance?. *The Journal of physiology*, *593*(24), 5341–5360. <https://doi.org/10.1113/JP271253>
- Briski, K., & Gillen, E. (2001). Differential distribution of Fos expression within the male rat preoptic area and hypothalamus in response to physical vs. psychological stress. *Brain research bulletin*, *55*(3), 401–408. [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(01\)00532-9](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(01)00532-9)
- Brudzynski S. M. (2009). Communication of adult rats by ultrasonic vocalization: biological, sociobiological, and neuroscience approaches. *ILAR journal*, *50*(1), 43–50. <https://doi.org/10.1093/ilar.50.1.43>
- Brudzynski, S. M., & Fletcher, N. H. (2010). Rat ultrasonic vocalization: Short range communication. En S. M. Brudzynski (Ed.), *Handbook of mammalian vocalization: An integrative neuroscience approach* (pp. 69–76). Academic Press/Elsevier.
- Bruinstroop, E., Cano, G., Vanderhorst, V. G., Cavalcante, J. C., Wirth, J., Sena-Esteves, M., & Saper, C. B. (2012). Spinal projections of the A5, A6 (locus coeruleus), and A7 noradrenergic cell groups in rats. *The Journal of comparative neurology*, *520*(9), 1985–2001. <https://doi.org/10.1002/cne.23024>
- Bryant, T. H., Yoshida, S., de Castro, D., & Lipski, J. (1993). Expiratory neurons of the Bötzing Complex in the rat: a morphological study following intracellular labeling with biocytin. *The Journal of comparative neurology*, *335*(2), 267–282. <https://doi.org/10.1002/cne.903350210>
- Burbridge, S., Stewart, I., & Placzek, M. (2016). Development of the Neuroendocrine Hypothalamus. *Comprehensive Physiology*, *6*(2), 623–643. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150023>
- Caille, D., Vibert, J. F., & Hugelin, A. (1981). Apneusis and apnea after parabrachial or Kölliker-Fuse N. lesion; influence of wakefulness. *Respiration physiology*, *45*(1), 79–95. [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(81\)90051-7](https://doi.org/10.1016/0034-5687(81)90051-7)
- Calais-Germain, B., & Germain, F. (2013). *Anatomía para la voz: Entender y mejorar la dinámica del aparato vocal* (U. Fischbach, Trad.; G. Gastaminza, Col.). La Liebre de Marzo.

- Campbell, E. J., & Green, J. H. (1955). The behaviour of the abdominal muscles and the intra-abdominal pressure during quiet breathing and increased pulmonary ventilation: a study in man. *The Journal of physiology*, 127(2), 423–426. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1955.sp005268>
- Cao, W. H., & Morrison, S. F. (2006). Glutamate receptors in the raphe pallidus mediate brown adipose tissue thermogenesis evoked by activation of dorsomedial hypothalamic neurons. *Neuropharmacology*, 51(3), 426–437. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.03.031>
- Cao, W. H., Fan, W., & Morrison, S. F. (2004). Medullary pathways mediating specific sympathetic responses to activation of dorsomedial hypothalamus. *Neuroscience*, 126(1), 229–240. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.03.013>
- Caples, S. M., Gami, A. S., & Somers, V. K. (2005). Obstructive sleep apnea. *Annals of internal medicine*, 142(3), 187–197. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-142-3-200502010-00010>
- Carrillo-Franco, L., González-García, M., Morales-Luque, C., Dawid-Milner, M. S., & López-González, M. V. (2024). Hypothalamic Regulation of Cardiorespiratory Functions: Insights into the Dorsomedial and Perifornical Pathways. *Biology*, 13(11), 933. <https://doi.org/10.3390/biology13110933>
- Carrive P. (1993). The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behavioural brain research*, 58(1-2), 27–47. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(93\)90088-8](https://doi.org/10.1016/0166-4328(93)90088-8)
- Carrive, P., & Bandler, R. (1991). Viscerotopic organization of neurons subserving hypotensive reactions within the midbrain periaqueductal grey: a correlative functional and anatomical study. *Brain research*, 541(2), 206–215. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91020-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91020-2)
- Céruse, P., Ltaief-Boutrigou, A., Buiet, G., Cosmidis, A., & Tringali, S. (2012). Anatomía descriptiva, endoscópica y radiológica de la laringe. *EMC - Otorrinolaringología*, 41(3), 1–26.
- Chamberlin, N. L., Eikermann, M., Fassbender, P., White, D. P., & Malhotra, A. (2007). Genioglossus premotoneurons and the negative pressure reflex in rats. *The Journal of physiology*, 579(Pt 2), 515–526. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.121889>
- Chao-Écija, A., López-González, M. V., & Dawid-Milner, M. S. (2023). CardioRVAR: A New R Package and Shiny Application for the Evaluation of Closed-Loop Cardiovascular Interactions. *Biology*, 12(11), 1438. <https://doi.org/10.3390/biology12111438>

- Chen, Z., Lin, M. T., Zhan, C., Zhong, N. S., Mu, D., Lai, K. F., & Liu, M. J. (2021). A descending pathway emanating from the periaqueductal gray mediates the development of cough-like hypersensitivity. *iScience*, *25*(1), 103641. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103641>
- Cho, Y. J., Ryu, W. S., Lee, H., Kim, D. E., & Park, J. W. (2020). Which Factors Affect the Severity of Dysphagia in Lateral Medullary Infarction?. *Dysphagia*, *35*(3), 414–418. <https://doi.org/10.1007/s00455-019-10043-8>
- Clarós, P., Karlikowska, A., Clarós-Pujol, A., Clarós, A., & Pujol, C. (2019). Psychogenic voice disorders: Literature review, personal experiences with opera singers and case report of psychogenic dysphonia in opera singer. *International Journal of Depression and Anxiety*, *2*(2), 015. <https://doi.org/10.23937/2643-4059/1710015>
- Concha-Miranda, M., Tang, W., Hartmann, K., & Brecht, M. (2022). Large-Scale Mapping of Vocalization-Related Activity in the Functionally Diverse Nuclei in Rat Posterior Brainstem. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *42*(44), 8252–8261. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0813-22.2022>
- Correia, J. M., Caballero-Gaudes, C., Guediche, S., & Carreiras, M. (2020). Phonatory and articulatory representations of speech production in cortical and subcortical fMRI responses. *Scientific reports*, *10*(1), 4529. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61435-y>
- Coverdell, T. C., Abraham-Fan, R. J., Wu, C., Abbott, S. B. G., & Campbell, J. N. (2022). Genetic encoding of an esophageal motor circuit. *Cell reports*, *39*(11), 110962. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110962>
- Cui, Y., Kam, K., Sherman, D., Janczewski, W. A., Zheng, Y., & Feldman, J. L. (2016). Defining preBötzing Complex Rhythm- and Pattern-Generating Neural Microcircuits In Vivo. *Neuron*, *91*(3), 602–614. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.07.003>
- da Silva, L. G., de Menezes, R. C., dos Santos, R. A., Campagnole-Santos, M. J., & Fontes, M. A. (2003). Role of periaqueductal gray on the cardiovascular response evoked by disinhibition of the dorsomedial hypothalamus. *Brain research*, *984*(1-2), 206–214. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(03\)03157-3](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(03)03157-3)
- Damasceno, R. S., Takakura, A. C., & Moreira, T. S. (2014). Regulation of the chemosensory control of breathing by Kölliker-Fuse neurons. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, *307*(1), R57–R67. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00024.2014>

- Dampney R. A. (2015). Central mechanisms regulating coordinated cardiovascular and respiratory function during stress and arousal. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 309(5), R429–R443. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00051.2015>
- Dampney R. A. (2016). Central neural control of the cardiovascular system: current perspectives. *Advances in physiology education*, 40(3), 283–296. <https://doi.org/10.1152/advan.00027.2016>
- Dampney, R. A., Coleman, M. J., Fontes, M. A., Hirooka, Y., Horiuchi, J., Li, Y. W., Polson, J. W., Potts, P. D., & Tagawa, T. (2002). Central mechanisms underlying short- and long-term regulation of the cardiovascular system. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 29(4), 261–268. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2002.03640.x>
- Dampney, R. A., Furlong, T. M., Horiuchi, J., & Iigaya, K. (2013). Role of dorsolateral periaqueductal grey in the coordinated regulation of cardiovascular and respiratory function. *Autonomic neuroscience: basic & clinical*, 175(1-2), 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2012.12.008>
- Davidson, E. P., Coppey, L. J., Calcutt, N. A., Oltman, C. L., & Yorek, M. A. (2010). Diet-induced obesity in Sprague-Dawley rats causes microvascular and neural dysfunction. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 26(4), 306–318. <https://doi.org/10.1002/dmrr.1088>
- Davis, P. J., & Nail, B. S. (1984). On the location and size of laryngeal motoneurons in the cat and rabbit. *The Journal of comparative neurology*, 230(1), 13–32. <https://doi.org/10.1002/cne.902300103>
- Davis, P. J., Zhang, S. P., Winkworth, A., & Bandler, R. (1996). Neural control of vocalization: respiratory and emotional influences. *Journal of voice: official journal of the Voice Foundation*, 10(1), 23–38. [https://doi.org/10.1016/s0892-1997\(96\)80016-6](https://doi.org/10.1016/s0892-1997(96)80016-6)
- Dawid-Milner, M. S., Lara, J. P., González-Barón, S., & Spyer, K. M. (2001). Respiratory effects of stimulation of cell bodies of the A5 region in the anaesthetised rat. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 441(4), 434–443. <https://doi.org/10.1007/s004240000450>
- Dawid-Milner, M. S., Lara, J. P., López de Miguel, M. P., López-González, M. V., Spyer, K. M., & González-Barón, S. (2003). A5 region modulation of the cardiorespiratory responses evoked from parabrachial cell bodies in the anaesthetised rat. *Brain research*, 982(1), 108–118. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(03\)03005-1](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(03)03005-1)

- Dawid-Milner, M. S., Lara, J. P., Milán, A., & González-Barón, S. (1993). Activity of inspiratory neurones of the ambiguous complex during cough in the spontaneously breathing decerebrate cat. *Exp Physiol*, 78(6), 835–838. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1993.sp003730>
- Dawid-Milner, M. S., Silva-Carvalho, L., Goldsmith, G. E., & Spyer, K. M. (1995). Hypothalamic modulation of laryngeal reflexes in the anaesthetized cat: role of the nucleus tractus solitarii. *The Journal of physiology*, 487 (Pt3) (Pt3), 739–749. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1995.sp020914>
- de Castro, D., Lipski, J., & Kanjhan, R. (1994). Electrophysiological study of dorsal respiratory neurons in the medulla oblongata of the rat. *Brain research*, 639(1), 49–56. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91763-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91763-9)
- de Git, K. C. G., van Tuijl, D. C., Luijendijk, M. C. M., Wolterink-Donselaar, I. G., Ghanem, A., Conzelmann, K. K., & Adan, R. A. H. (2018). Anatomical projections of the dorsomedial hypothalamus to the periaqueductal grey and their role in thermoregulation: a cautionary note. *Physiological reports*, 6(14), e13807. <https://doi.org/10.14814/phy2.13807>
- de Menezes, R. C., Zaretsky, D. V., Fontes, M. A., & DiMicco, J. A. (2006). Microinjection of muscimol into caudal periaqueductal gray lowers body temperature and attenuates increases in temperature and activity evoked from the dorsomedial hypothalamus. *Brain research*, 1092(1), 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.03.080>
- de Menezes, R. C., Zaretsky, D. V., Fontes, M. A., & DiMicco, J. A. (2009). Cardiovascular and thermal responses evoked from the periaqueductal grey require neuronal activity in the hypothalamus. *The Journal of physiology*, 587(Pt 6), 1201–1215. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.161463>
- de Silva, T., Cosentino, G., Ganji, S., Riera-Gonzalez, A., & Hsia, D. S. (2020). Endocrine Causes of Hypertension. *Current hypertension reports*, 22(11), 97. <https://doi.org/10.1007/s11906-020-01108-3>
- De Troyer, A., Kirkwood, P. A., & Wilson, T. A. (2005). Respiratory action of the intercostal muscles. *Physiological reviews*, 85(2), 717–756. <https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2004>
- Dean, C., & Coote, J. H. (1986). Discharge patterns in postganglionic neurones to skeletal muscle and kidney during activation of the hypothalamic and midbrain defence areas in the cat. *Brain research*, 377(2), 271–278. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(86\)90868-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)90868-1)

- Dearing C, Handa RJ, Myers B. Sex differences in autonomic responses to stress: implications for cardiometabolic physiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2022;323(3):E281-E289. doi:10.1152/ajpendo.00058.2022
- Dekhou, A. S., Morrison, R. J., & Gemechu, J. M. (2021). The Superior Laryngeal Nerve and Its Vulnerability in Surgeries of the Neck. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 11(7), 1243. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11071243>
- Del Negro, C. A., Funk, G. D., & Feldman, J. L. (2018). Breathing matters. *Nature reviews. Neuroscience*, 19(6), 351–367. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0003-6>
- Delgado-García, J. M., López-Barneo, J., Serra, R., & González-Barón, S. (1983). Electrophysiological and functional identification of different neuronal types within the nucleus ambiguus in the cat. *Brain research*, 277(2), 231–240. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(83\)90930-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(83)90930-7)
- Deng, H., Xiao, X., & Wang, Z. (2016). Periaqueductal Gray Neuronal Activities Underlie Different Aspects of Defensive Behaviors. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 36(29), 7580–7588. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4425-15.2016>
- Dergacheva, O., Griffioen, K. J., Neff, R. A., & Mendelowitz, D. (2010). Respiratory modulation of premotor cardiac vagal neurons in the brainstem. *Respiratory physiology & neurobiology*, 174(1-2), 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2010.05.005>
- Dhingra, R. R., Dick, T. E., Furuya, W. I., Galán, R. F., & Dutschmann, M. (2020). Volumetric mapping of the functional neuroanatomy of the respiratory network in the perfused brainstem preparation of rats. *The Journal of physiology*, 598(11), 2061–2079. <https://doi.org/10.1113/JP279605>
- Dhingra, R. R., Furuya, W. I., Bautista, T. G., Dick, T. E., Galán, R. F., & Dutschmann, M. (2019). Increasing Local Excitability of Brainstem Respiratory Nuclei Reveals a Distributed Network Underlying Respiratory Motor Pattern Formation. *Frontiers in physiology*, 10, 887. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00887>
- Di Pasquasio, C., De Pellegrin, L., Pineaud, A., Marty, A., & Chaminade, T. (2025). Central nervous system control of breathing in natural conversation turn-taking. *Scientific reports*, 15(1), 31276. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-15776-1>
- Díaz-Casares, A., López-González, M. V., & Dawid-Milner, M. S. (2018). Role of the dorso- and ventrolateral pons in cardiorespiratory hypothalamic defense responses. En S. J. Baloyannis & J. O. Gordeladze (Eds.), *Hypothalamus in health and diseases* (pp. 47–71). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72679>

- Díaz-Casares, A., López-González, M. V., Peinado-Aragonés, C. A., Lara, J. P., González-Barón, S., & Dawid-Milner, M. S. (2009). Role of the parabrachial complex in the cardiorespiratory response evoked from hypothalamic defense area stimulation in the anesthetized rat. *Brain research*, *1279*, 58–70. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.02.085>
- Díaz-Casares, A., López-González, M. V., Peinado-Aragonés, C. A., González-Barón, S., & Dawid-Milner, M. S. (2012). Parabrachial complex glutamate receptors modulate the cardiorespiratory response evoked from hypothalamic defense area. *Autonomic neuroscience: basic & clinical*, *169*(2), 124–134. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2012.06.001>
- DiMicco, J. A., Abshire, V. M., Hankins, K. D., Sample, R. H., & Wible, J. H., Jr (1986). Microinjection of GABA antagonists into posterior hypothalamus elevates heart rate in anesthetized rats. *Neuropharmacology*, *25*(9), 1063–1066. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(86\)90203-0](https://doi.org/10.1016/0028-3908(86)90203-0)
- DiMicco, J. A., Samuels, B. C., Zaretskaia, M. V., & Zaretsky, D. V. (2002). The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, *71*(3), 469–480. [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(01\)00689-x](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(01)00689-x)
- Dong, H. W., Petrovich, G. D., & Swanson, L. W. (2001). Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brain research. Brain research reviews*, *38*(1-2), 192–246. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(01\)00079-0](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(01)00079-0)
- Dudenbostel, T., & Calhoun, D. A. (2012). Resistant hypertension, obstructive sleep apnoea and aldosterone. *Journal of human hypertension*, *26*(5), 281–287. <https://doi.org/10.1038/jhh.2011.47>
- Dutschmann, M., & Dick, T. E. (2012). Pontine mechanisms of respiratory control. *Comprehensive Physiology*, *2*(4), 2443–2469. <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. *The European journal of neuroscience*, *24*(4), 1071–1084. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04981.x>
- Dutschmann, M., Bautista, T. G., Trevizan-Baú, P., Dhingra, R. R., & Furuya, W. I. (2021). The pontine Kölliker-Fuse nucleus gates facial, hypoglossal, and vagal upper airway related motor activity. *Respiratory physiology & neurobiology*, *284*, 103563. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2020.103563>

- Dutschmann, M., Jones, S. E., Subramanian, H. H., Stanic, D., & Bautista, T. G. (2014). The physiological significance of postinspiration in respiratory control. *Progress in brain research*, 212, 113–130. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63488-7.00007-0>
- Dutschmann, M., Mörschel, M., Reuter, J., Zhang, W., Gestreau, C., Stettner, G. M., & Kron, M. (2008). Postnatal emergence of synaptic plasticity associated with dynamic adaptation of the respiratory motor pattern. *Respiratory physiology & neurobiology*, 164(1-2), 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2008.06.013>
- Eliasson, S., Folkow, B., Lindgren, P., & Uvnas, B. (1951). Activation of sympathetic vasodilator nerves to the skeletal muscles in the cat by hypothalamic stimulation. *Acta physiologica Scandinavica*, 23(4), 333–351. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1951.tb00819.x>
- Ellenberger, H. H., Vera, P. L., Haselton, J. R., Haselton, C. L., & Schneiderman, N. (1990). Brainstem projections to the phrenic nucleus: an anterograde and retrograde HRP study in the rabbit. *Brain research bulletin*, 24(2), 163–174. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(90\)90201-a](https://doi.org/10.1016/0361-9230(90)90201-a)
- Enard, W., Gehre, S., Hammerschmidt, K., Hölter, S. M., Blass, T., Somel, M., Brückner, M. K., Schreiweis, C., Winter, C., Sohr, R., Becker, L., Wiebe, V., Nickel, B., Giger, T., Müller, U., Groszer, M., Adler, T., Aguilar, A., Bolle, I., Calzada-Wack, J., ... Pääbo, S. (2009). A humanized version of Foxp2 affects cortico-basal ganglia circuits in mice. *Cell*, 137(5), 961–971. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.041>
- Enard, W., Przeworski, M., Fisher, S. E., Lai, C. S., Wiebe, V., Kitano, T., Monaco, A. P., & Pääbo, S. (2002). Molecular evolution of FOXP2, a gene involved in speech and language. *Nature*, 418(6900), 869–872. <https://doi.org/10.1038/nature01025>
- Esler M. (2010). The 2009 Carl Ludwig Lecture: Pathophysiology of the human sympathetic nervous system in cardiovascular diseases: the transition from mechanisms to medical management. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 108(2), 227–237. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00832.2009>
- Esler M. (2017). Mental stress and human cardiovascular disease. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 74(Pt B), 269–276. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.10.011>
- Esposito, A., Demeurisse, G., Alberti, B., & Fabbro, F. (1999). Complete mutism after midbrain periaqueductal gray lesion. *Neuroreport*, 10(4), 681–685. <https://doi.org/10.1097/00001756-199903170-00004>

- Ezure, K., & Tanaka, I. (2006). Distribution and medullary projection of respiratory neurons in the dorsolateral pons of the rat. *Neuroscience*, *141*(2), 1011–1023. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.04.020>
- Ezure, K., Tanaka, I., & Saito, Y. (2003). Brainstem and spinal projections of augmenting expiratory neurons in the rat. *Neuroscience research*, *45*(1), 41–51. [https://doi.org/10.1016/s0168-0102\(02\)00197-9](https://doi.org/10.1016/s0168-0102(02)00197-9)
- Faber, C. L., Deem, J. D., Phan, B. A., Doan, T. P., Ogimoto, K., Mirzadeh, Z., Schwartz, M. W., & Morton, G. J. (2021). Leptin receptor neurons in the dorsomedial hypothalamus regulate diurnal patterns of feeding, locomotion, and metabolism. *eLife*, *10*, e63671. <https://doi.org/10.7554/eLife.63671>
- Farley, G. R., Barlow, S. M., & Netsell, R. (1992). Factors influencing neural activity in parabrachial regions during cat vocalizations. *Experimental brain research*, *89*(2), 341–351. <https://doi.org/10.1007/BF00228250>
- Faull, O. K., Subramanian, H. H., Ezra, M., & Pattinson, K. T. S. (2019). The midbrain periaqueductal gray as an integrative and interoceptive neural structure for breathing. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, *98*, 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.12.020>
- Fedorcko, L., Merrill, E. G., & Lipski, J. (1983). Two descending medullary inspiratory pathways to phrenic motoneurons. *Neuroscience letters*, *43*(2-3), 285–291. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(83\)90202-1](https://doi.org/10.1016/0304-3940(83)90202-1)
- Feigl, E. O. (1964). Vasoconstriction resulting from diencephalic stimulation. *Acta Physiologica Scandinavica*, *60*, 372–380. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1964.tb02900.x>
- Feldman, J. L., Del Negro, C. A., & Gray, P. A. (2013). Understanding the rhythm of breathing: so near, yet so far. *Annual review of physiology*, *75*, 423–452. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-040510-130049>
- Fernandes, A. C. N., Ferreira, M. V. N., Serra, L. S. M., Kuckelhaus, S. A. S., da Silva, E. M., & Sampaio, A. L. L. (2025). Methodological Approaches for Vocal Fold Experiments in Laryngology: A Scoping Review. *Journal of voice: official journal of the Voice Foundation*, *39*(2), 317–330. <https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2022.07.025>
- Fernández de Molina, A., & Hunsperger, R. W. (1959). Central representation of affective reactions in forebrain and brain stem: electrical stimulation of amygdala, stria terminalis, and adjacent structures. *The Journal of physiology*, *145*(2), 251–265. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1959.sp006140>

- Fernández, S., Garaycochea, O., Martínez-Arellano, A., & Alcalde, J. (2020). Does More Compression Mean More Pressure? A New Classification for Muscle Tension Dysphonia. *Journal of speech, language, and hearing research: JSLHR*, 63(7), 2177–2184. https://doi.org/10.1044/2020_JSLHR-20-00042
- Finck, C., & Lejeune, L. (2010). Structure and oscillatory function of the vocal folds. En S. M. Brudzynski (Ed.), *Handbook of mammalian vocalization: An integrative neuroscience approach* (pp. 383–395). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374593-4.00039-5>
- Fisher, J. P., & Paton, J. F. (2012). The sympathetic nervous system and blood pressure in humans: implications for hypertension. *Journal of human hypertension*, 26(8), 463–475. <https://doi.org/10.1038/jhh.2011.66>
- Fletcher E. C. (2001). Invited review: Physiological consequences of intermittent hypoxia: systemic blood pressure. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 90(4), 1600–1605. <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.90.4.1600>
- Flint, P. W., Downs, D. H., & Coltrera, M. D. (1991). Laryngeal synkinesis following reinnervation in the rat. Neuroanatomic and physiologic study using retrograde fluorescent tracers and electromyography. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*, 100(10), 797–806. <https://doi.org/10.1177/000348949110001003>
- Flor, K. C., Barnett, W. H., Karlen-Amarante, M., Molkov, Y. I., & Zoccal, D. B. (2020). Inhibitory control of active expiration by the Bötzing complex in rats. *The Journal of physiology*, 598(21), 4969–4994. <https://doi.org/10.1113/JP280243>
- Fogarty M. J. (2024). Dendritic morphology of motor neurons and interneurons within the compact, semicompact, and loose formations of the rat nucleus ambiguus. *Frontiers in cellular neuroscience*, 18, 1409974. <https://doi.org/10.3389/fncel.2024.1409974>
- Folkow, B., Lisander, B., Tuttle, R. S., & Wang, S. C. (1968). Changes in cardiac output upon stimulation of the hypothalamic defence area and the medullary depressor area in the cat. *Acta physiologica Scandinavica*, 72(1), 220–233. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1968.tb03844.x>
- Fontes, M. A. P., Filho, M. L., Santos Machado, N. L., de Paula, C. A., Souza Cordeiro, L. M., Xavier, C. H., Marins, F. R., Henderson, L., & Macefield, V. G. (2017). Asymmetric sympathetic output: The dorsomedial hypothalamus as a potential link between emotional stress and cardiac arrhythmias. *Autonomic neuroscience : basic & clinical*, 207, 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2017.01.001>
- Fontes, M. A. P., Marins, F. R., Patel, T. A., de Paula, C. A., Dos Santos Machado, L. R., de Sousa Lima, É. B., Ventris-Godoy, A. C., Viana, A. C. R., Linhares, I. C. S., Xavier, C.

- H., Filosa, J. A., & Patel, K. P. (2023). Neurogenic Background for Emotional Stress-Associated Hypertension. *Current hypertension reports*, 25(7), 107–116. <https://doi.org/10.1007/s11906-023-01235-7>
- Fontes, M. A., Tagawa, T., Polson, J. W., Cavanagh, S. J., & Dampney, R. A. (2001). Descending pathways mediating cardiovascular response from dorsomedial hypothalamic nucleus. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 280(6), H2891–H2901. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.280.6.H2891>
- Fontes, M. A., Xavier, C. H., de Menezes, R. C., & Dimicco, J. A. (2011). The dorsomedial hypothalamus and the central pathways involved in the cardiovascular response to emotional stress. *Neuroscience*, 184, 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.03.018>
- Fortuna, M. G., Stornetta, R. L., West, G. H., & Guyenet, P. G. (2009). Activation of the retrotrapezoid nucleus by posterior hypothalamic stimulation. *The Journal of physiology*, 587(Pt 21), 5121–5138. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.176875>
- Fregosi, R. F., & Fuller, D. D. (1997). Respiratory-related control of extrinsic tongue muscle activity. *Respiration physiology*, 110(2-3), 295–306. [https://doi.org/10.1016/s0034-5687\(97\)00095-9](https://doi.org/10.1016/s0034-5687(97)00095-9)
- Freitas, R. L., Salgado-Rohner, C. J., Hallak, J. E., Crippa, J. A., & Coimbra, N. C. (2013). Involvement of prelimbic medial prefrontal cortex in panic-like elaborated defensive behaviour and innate fear-induced antinociception elicited by GABAA receptor blockade in the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei: role of the endocannabinoid CB1 receptor. *The international journal of neuropsychopharmacology*, 16(8), 1781–1798. <https://doi.org/10.1017/S1461145713000163>
- Friedman, R. M., Breuninger, A. S., Aronson, M. R., Brown, E. A., Patel, N., Han, L., Zur, K. B., & Gottardi, R. (2024). Age-related remodeling of the vocal fold extracellular matrix composition, structure, and biomechanics during tissue maturation. *Connective tissue research*, 65(6), 472–485. <https://doi.org/10.1080/03008207.2024.2435364>
- Fukushi, I., Yokota, S., & Okada, Y. (2019). The role of the hypothalamus in modulation of respiration. *Respiratory physiology & neurobiology*, 265, 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2018.07.003>
- Fulwiler, C. E., & Saper, C. B. (1984). Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain research*, 319(3), 229–259. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(84\)90012-2](https://doi.org/10.1016/0165-0173(84)90012-2)

- Furusawa, K., Yasuda, K., Okuda, D., Tanaka, M., & Yamaoka, M. (1996). Central distribution and peripheral functional properties of afferent and efferent components of the superior laryngeal nerve: morphological and electrophysiological studies in the rat. *The Journal of comparative neurology*, 375(1), 147–156. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19961104\)375:1<147::AID-CNE9>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19961104)375:1<147::AID-CNE9>3.0.CO;2-3)
- Gabbott, P. L., Warner, T. A., Jays, P. R., Salway, P., & Busby, S. J. (2005). Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *The Journal of comparative neurology*, 492(2), 145–177. <https://doi.org/10.1002/cne.20738>
- Gacek R. R. (1975). Localization of laryngeal motor neurons in the kitten. *The Laryngoscope*, 85(11 pt 1), 1841–1861. <https://doi.org/10.1288/00005537-197511000-00007>
- Garaycochea, O., Alcalde, J., & Fernández, S. (2021). Aerodynamic Measures in Muscle Tension Dysphonia. *Journal of voice: official journal of the Voice Foundation*, 35(6), 930. <https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2020.03.002>
- Garcia, A. J., 3rd, Viemari, J. C., & Khuu, M. A. (2019). Respiratory rhythm generation, hypoxia, and oxidative stress-Implications for development. *Respiratory physiology & neurobiology*, 270, 103259. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2019.103259>
- Gasparini, S., Howland, J. M., Thatcher, A. J., & Geerling, J. C. (2020). Central afferents to the nucleus of the solitary tract in rats and mice. *The Journal of comparative neurology*, 528(16), 2708–2728. <https://doi.org/10.1002/cne.24927>
- Geerling, J. C., Yokota, S., Rukhadze, I., Roe, D., & Chamberlin, N. L. (2017). Kölliker-Fuse GABAergic and glutamatergic neurons project to distinct targets. *The Journal of comparative neurology*, 525(8), 1844–1860. <https://doi.org/10.1002/cne.24164>
- Gerrits, P. O., & Holstege, G. (1996). Pontine and medullary projections to the nucleus retroambiguus: a wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase and autoradiographic tracing study in the cat. *The Journal of comparative neurology*, 373(2), 173–185. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960916\)373:2<173::AID-CNE2>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960916)373:2<173::AID-CNE2>3.0.CO;2-0)
- Ghali M. G. Z. (2019). Respiratory rhythm generation and pattern formation: oscillators and network mechanisms. *Journal of integrative neuroscience*, 18(4), 481–517. <https://doi.org/10.31083/j.jin.2019.04.188>
- Glikson, E., Sagiv, D., Eyal, A., Wolf, M., & Primov-Fever, A. (2017). The anatomical evolution of the thyroid cartilage from childhood to adulthood: A computed tomography evaluation. *The Laryngoscope*, 127(10), E354–E358. <https://doi.org/10.1002/lary.26644>

- González-Barón, S., Bogas, A. M., Molina, M., & García-Matilla, F. (1978). Resistencia de la laringe en relación con estímulos de las vías respiratorias altas. *Rev Esp Fisiol*, 34(4), 453–462.
- González-Barón, S., Dawid-Milner, M. S., Lara, J. P., Clavijo, E., & Aguirre, J. A. (1989). Cambios de la resistencia laríngea y tono bronquial [Changes in laryngeal resistance and bronchial tonus]. *Revista española de fisiología*, 45 Suppl, 191–196.
- González-Barón, S., Molina, M., & García-Matilla, F. (1980). Isoprenaline effect on larynx resistance in the cat. *Revista española de fisiología*, 36(2), 217–218.
- González-Barón, S., Molina, M., García Matilla, F., & Bogas, A. (1979a). Control vagal de la resistencia de la laringe. *Rev Esp Fisiol*, 35(3), 291–306.
- González-Barón, S., Molina, M., García-Mantilla, F., & Bogas, A. (1979b). Influences of hypoglossus and glossopharyngeus nerves on the larynx resistance. *Rev Esp Fisiol*, 35(2), 251–253.
- González-Barón, S., Molina, M., García-Matilla, F., & Alvarez de Toledo, G. (1981). Influencia de los nervios laríngeo superior y recurrente en diversas respuestas respiratorias reflejas [Influence of the superior laryngeal and recurrent nerves on several reflex respiratory responses (author's transl)]. *Revista española de fisiología*, 37(2), 211–220.
- González-García, M. (2024a). *Mecanismos supraencefálicos involucrados en el control de la actividad laríngea* (Tesis de doctorado, Universidad de Málaga). Repositorio Institucional UMA. <https://riuma.uma.es/xmlui/handle/10630/34924>
- González-García, M., Carrillo-Franco, L., Morales-Luque, C., Dawid-Milner, M. S., & López-González, M. V. (2024b). Central Autonomic Mechanisms Involved in the Control of Laryngeal Activity and Vocalization. *Biology*, 13(2), 118. <https://doi.org/10.3390/biology13020118>
- González-García, M., Carrillo-Franco, L., Morales-Luque, C., Ponce-Velasco, M., Gago, B., Dawid-Milner, M. S., & López-González, M. V. (2024c). Uncovering the neural control of laryngeal activity and subglottic pressure in anaesthetized rats: insights from mesencephalic regions. *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, 476(8), 1235–1247. <https://doi.org/10.1007/s00424-024-02976-3>
- González-García, M., Carrillo-Franco, L., Peinado-Aragonés, C. A., Díaz-Casares, A., Gago, B., López-González, M. V., & Dawid-Milner, M. S. (2023). Impact of the glutamatergic neurotransmission within the A5 region on the cardiorespiratory response evoked from the midbrain dIPAG. *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, 475(4), 505–516. <https://doi.org/10.1007/s00424-022-02777-6>

- Goodchild, A. K., Dampney, R. A., & Bandler, R. (1982). A method for evoking physiological responses by stimulation of cell bodies, but not axons of passage, within localized regions of the central nervous system. *Journal of neuroscience methods*, 6(4), 351–363. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(82\)90036-x](https://doi.org/10.1016/0165-0270(82)90036-x)
- Gören, M. Z., Yananli, H. R., Berkman, K., Onat, F., & Aker, R. (2003). The influence of dorsomedial hypothalamic nucleus on contralateral paraventricular nucleus in NMDA-mediated cardiovascular responses. *Brain research*, 968(2), 219–226. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(03\)02241-8](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(03)02241-8)
- Groessl, F., Jeong, J. H., Talmage, D. A., Role, L. W., & Jo, Y. H. (2013). Overnight fasting regulates inhibitory tone to cholinergic neurons of the dorsomedial nucleus of the hypothalamus. *PLoS one*, 8(4), e60828. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060828>
- Gross, C. T., & Canteras, N. S. (2012). The many paths to fear. *Nature reviews. Neuroscience*, 13(9), 651–658. <https://doi.org/10.1038/nrn3301>
- Guo, H., Yuan, X. S., Zhou, J. C., Chen, H., Li, S. Q., Qu, W. M., & Huang, Z. L. (2020). Whole-Brain Monosynaptic Inputs to Hypoglossal Motor Neurons in Mice. *Neuroscience bulletin*, 36(6), 585–597. <https://doi.org/10.1007/s12264-020-00468-9>
- Guyenet P. G. (2006). The sympathetic control of blood pressure. *Nature reviews. Neuroscience*, 7(5), 335–346. <https://doi.org/10.1038/nrn1902>
- Haesler, S., Rochefort, C., Georgi, B., Licznarski, P., Osten, P., & Scharff, C. (2007). Incomplete and inaccurate vocal imitation after knockdown of FoxP2 in songbird basal ganglia nucleus Area X. *PLoS biology*, 5(12), e321. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050321>
- Harding, R., Johnson, P., & McClelland, M. E. (1980). Respiratory function of the larynx in developing sheep and the influence of sleep state. *Respiration physiology*, 40(2), 165–179. [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(80\)90090-0](https://doi.org/10.1016/0034-5687(80)90090-0)
- Hartmann, K., & Brecht, M. (2020). A Functionally and Anatomically Bipartite Vocal Pattern Generator in the Rat Brain Stem. *iScience*, 23(12), 101804. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101804>
- Hayakawa, T., Takanaga, A., Maeda, S., Ito, H., & Seki, M. (2000). Monosynaptic inputs from the nucleus tractus solitarius to the laryngeal motoneurons in the nucleus ambiguus of the rat. *Anatomy and embryology*, 202(5), 411–420. <https://doi.org/10.1007/s004290000120>
- Hayakawa, T., Zheng, J. Q., Maeda, S., Ito, H., Seki, M., & Yajima, Y. (1999). Synaptology and ultrastructural characteristics of laryngeal cricothyroid and posterior

- cricoarytenoid motoneurons in the nucleus ambiguus of the rat. *Anatomy and embryology*, 200(3), 301–311. <https://doi.org/10.1007/s004290050281>
- Hayward, L. F., Castellanos, M., & Davenport, P. W. (2004). Parabrachial neurons mediate dorsal periaqueductal gray evoked respiratory responses in the rat. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md.: 1985), 96(3), 1146–1154. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00903.2003>
- Heinricher, M. M., Tavares, I., Leith, J. L., & Lumb, B. M. (2009). Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain research reviews*, 60(1), 214–225. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.12.009>
- Henrywood, R. H., & Agarwal, A. (2013). The aeroacoustics of a steam kettle. *Physics of Fluids*, 25(10), 107101. <https://doi.org/10.1063/1.4821782>
- Herbert, H., & Saper, C. B. (1992). Organization of medullary adrenergic and noradrenergic projections to the periaqueductal gray matter in the rat. *The Journal of comparative neurology*, 315(1), 34–52. <https://doi.org/10.1002/cne.903150104>
- Herbert, H., Moga, M. M., & Saper, C. B. (1990). Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. *The Journal of comparative neurology*, 293(4), 540–580. <https://doi.org/10.1002/cne.902930404>
- Hermans, E. J., Henckens, M. J., Roelofs, K., & Fernández, G. (2013). Fear bradycardia and activation of the human periaqueductal grey. *NeuroImage*, 66, 278–287. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.10.063>
- Hernández-Morato, I., Pascual-Font, A., Ramírez, C., Matarranz-Echeverría, J., McHanwell, S., Vázquez, T., Sañudo, J. R., & Valderrama-Canales, F. J. (2013). Somatotopy of the neurons innervating the cricothyroid, posterior cricoarytenoid, and thyroarytenoid muscles of the rat's larynx. *Anatomical record (Hoboken, N.J.: 2007)*, 296(3), 470–479. <https://doi.org/10.1002/ar.22643>
- Hernández-Morato, I., Pitman, M. J., & Sharma, S. (2016). Muscle specific nucleus ambiguus neurons isolation and culturing. *Journal of neuroscience methods*, 273, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.07.014>
- Hess, W. R., & Brügger, M. (1981). The subcortical center of the affective defense reaction. En K. Akert (Ed.), *Biological order and brain organization* (pp. 333–354). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-67948-3_11
- Hiatt, J. L., & Gartner, L. P. (2002). Palate, pharynx, and larynx. In L. McGraw (Ed.), *Textbook of head and neck anatomy* (Chap. 16, pp. 229–245). Lippincott Williams & Wilkins.

- Hickey, S. L., Berto, S., & Konopka, G. (2019). Chromatin Decondensation by FOXP2 Promotes Human Neuron Maturation and Expression of Neurodevelopmental Disease Genes. *Cell reports*, 27(6), 1699–1711.e9. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.044>
- Hilton S. M. (1982). The defence-arousal system and its relevance for circulatory and respiratory control. *The Journal of experimental biology*, 100, 159–174. <https://doi.org/10.1242/jeb.100.1.159>
- Hilton, S. M., & Redfern, W. S. (1986). A search for brain stem cell groups integrating the defence reaction in the rat. *The Journal of physiology*, 378, 213–228. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1986.sp016215>
- Hilton, S. M., & Zbrozyna, A. W. (1963). Amygdaloid region for defence reactions and its efferent pathway to the brain stem. *The Journal of physiology*, 165(1), 160–173. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1963.sp007049>
- Hinrichsen, C. F., & Ryan, A. T. (1981). Localization of laryngeal motoneurons in the rat: morphologic evidence for dual innervation?. *Experimental neurology*, 74(2), 341–355. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(81\)90174-6](https://doi.org/10.1016/0014-4886(81)90174-6)
- Hirano M. (1974). Morphological structure of the vocal cord as a vibrator and its variations. *Folia phoniatica*, 26(2), 89–94. <https://doi.org/10.1159/000263771>
- Hirano, S., Minamiguchi, S., Yamashita, M., Ohno, T., Kanemaru, S., & Kitamura, M. (2009). Histologic characterization of human scarred vocal folds. *Journal of voice: official journal of the Voice Foundation*, 23(4), 399–407. <https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2007.12.002>
- Hirasugi, K., Hisa, Y., Setsu, T., & Terashima, T. (2007). Ambiguous motoneurons innervating laryngeal and esophageal muscles are malpositioned in the Reelin-deficient mutant rat, Shaking Rat Kawasaki. *Acta oto-laryngologica*, 127(2), 213–220. <https://doi.org/10.1080/00016480600794479>
- Hisa, Y., Sato, F., Fukui, K., Ibata, Y., & Mizuokoshi, O. (1984). Nucleus ambiguus motoneurons innervating the canine intrinsic laryngeal muscles by the fluorescent labeling technique. *Experimental neurology*, 84(2), 441–449. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(84\)90240-1](https://doi.org/10.1016/0014-4886(84)90240-1)
- Hoffman, G. E., Smith, M. S., & Verbalis, J. G. (1993). c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Frontiers in neuroendocrinology*, 14(3), 173–213. <https://doi.org/10.1006/frne.1993.1006>

- Holstege G. (1989). Anatomical study of the final common pathway for vocalization in the cat. *The Journal of comparative neurology*, 284(2), 242–252. <https://doi.org/10.1002/cne.902840208>
- Holstege G. (2005). Micturition and the soul. *The Journal of comparative neurology*, 493(1), 15–20. <https://doi.org/10.1002/cne.20785>
- Holstege, G., & Kuypers, H. G. (1982). The anatomy of brain stem pathways to the spinal cord in cat. A labeled amino acid tracing study. *Progress in brain research*, 57, 145–175. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)64128-X](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)64128-X)
- Holstege, G., & Subramanian, H. H. (2016). Two different motor systems are needed to generate human speech. *The Journal of comparative neurology*, 524(8), 1558–1577. <https://doi.org/10.1002/cne.23898>
- Holstege, G., Kerstens, L., Moes, M. C., & Vanderhorst, V. G. (1997). Evidence for a periaqueductal gray-nucleus retroambiguus-spinal cord pathway in the rat. *Neuroscience*, 80(2), 587–598. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(97\)00061-4](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(97)00061-4)
- Horiuchi, J., McAllen, R. M., Allen, A. M., Killinger, S., Fontes, M. A., & Dampney, R. A. (2004). Descending vasomotor pathways from the dorsomedial hypothalamic nucleus: role of medullary raphe and RVLM. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 287(4), R824–R832. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00221.2004>
- Horiuchi, J., McDowall, L. M., & Dampney, R. A. (2009). Vasomotor and respiratory responses evoked from the dorsolateral periaqueductal grey are mediated by the dorsomedial hypothalamus. *The Journal of physiology*, 587(Pt 21), 5149–5162. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.179739>
- Horiuchi, J., Wakabayashi, S., & Dampney, R. A. (2005). Activation of 5-hydroxytryptamine 1A receptors suppresses the cardiovascular response evoked from the dorsomedial hypothalamic nucleus. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 46(1), 173–179. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000169970.68151.17>
- Hosoya, Y., Ito, R., & Kohno, K. (1987). The topographical organization of neurons in the dorsal hypothalamic area that project to the spinal cord or to the nucleus raphe pallidus in the rat. *Experimental brain research*, 66(3), 500–506. <https://doi.org/10.1007/BF00270682>
- Houtz, J., Liao, G. Y., An, J. J., & Xu, B. (2021). Discrete TrkB-expressing neurons of the dorsomedial hypothalamus regulate feeding and thermogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(4), e2017218118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2017218118>

- Huang, D., Grady, F. S., Peltekian, L., & Geerling, J. C. (2021). Efferent projections of Vglut2, Foxp2, and Pdyn parabrachial neurons in mice. *The Journal of comparative neurology*, 529(4), 657–693. <https://doi.org/10.1002/cne.24975>
- Huang, S. C., Dai, Y. W., Lee, Y. H., Chiou, L. C., & Hwang, L. L. (2010). Orexins depolarize rostral ventrolateral medulla neurons and increase arterial pressure and heart rate in rats mainly via orexin 2 receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 334(2), 522–529. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.167791>
- Huff, A., Karlen-Amarante, M., Pitts, T., & Ramirez, J. M. (2022). Optogenetic stimulation of pre-Bötzinger complex reveals novel circuit interactions in swallowing-breathing coordination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(29), e2121095119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2121095119>
- Hülsmann, S., Hagos, L., Eulenburg, V., & Hirrlinger, J. (2021). Inspiratory Off-Switch Mediated by Optogenetic Activation of Inhibitory Neurons in the preBötzinger Complex In Vivo. *International journal of molecular sciences*, 22(4), 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms22042019>
- Hunter, E. J., & Ludwigsen, D. (2017). Source-filter theory. En C. Brown & T. Riede (Eds.), *Comparative bioacoustics: An overview* (pp. 231–252). Bentham Science Publishers.
- Hutchison, A. A., Leclerc, F., Nève, V., Pillow, J. J., & Robinson, P. D. (2015). The respiratory system. En P. C. Rimensberger (Ed.), *Pediatric and neonatal mechanical ventilation* (pp. 55–72). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-01219-8_4
- Hydman, J., & Mattsson, P. (2008). Collateral reinnervation by the superior laryngeal nerve after recurrent laryngeal nerve injury. *Muscle & nerve*, 38(4), 1280–1289. <https://doi.org/10.1002/mus.21124>
- Iigaya, K., Horiuchi, J., McDowall, L. M., Lam, A. C., Sediqi, Y., Polson, J. W., Carrive, P., & Dampney, R. A. (2012). Blockade of orexin receptors with Almorexant reduces cardiorespiratory responses evoked from the hypothalamus but not baro- or chemoreceptor reflex responses. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 303(10), R1011–R1022. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00263.2012>
- Inagi, K., Schultz, E., & Ford, C. N. (1998). An anatomic study of the rat larynx: establishing the rat model for neuromuscular function. *Otolaryngology--head and neck surgery: official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 118(1), 74–81. [https://doi.org/10.1016/S0194-5998\(98\)70378-X](https://doi.org/10.1016/S0194-5998(98)70378-X)
- Jakus, J., Poliacek, I., Halasova, E., Murin, P., Knocikova, J., Tomori, Z., & Bolser, D. C. (2008). Brainstem circuitry of tracheal-bronchial cough: c-fos study in anesthetized

- cats. *Respiratory physiology & neurobiology*, 160(3), 289–300.
<https://doi.org/10.1016/j.resp.2007.10.014>
- Jalil, M., Coverdell, T. C., Gutierrez, V. A., Crook, M. E., Shi, J., Stornetta, D. S., Schwalbe, D. C., Abbott, S. B. G., & Campbell, J. N. (2023). Molecular Disambiguation of Heart Rate Control by the Nucleus Ambiguus. *bioRxiv: the preprint server for biology*, 2023.12.16.571991. <https://doi.org/10.1101/2023.12.16.571991>
- Janczewski, W. A., Tashima, A., Hsu, P., Cui, Y., & Feldman, J. L. (2013). Role of inhibition in respiratory pattern generation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(13), 5454–5465.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1595-12.2013>
- Jean A. (2001). Brain stem control of swallowing: neuronal network and cellular mechanisms. *Physiological reviews*, 81(2), 929–969.
<https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.929>
- Jenkin, S. E., 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>
- Jeong, J. H., Lee, D. K., & Jo, Y. H. (2017). Cholinergic neurons in the dorsomedial hypothalamus regulate food intake. *Molecular metabolism*, 6(3), 306–312.
<https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.01.001>
- Jiang, J. J., & Maytag, A. L. (2014). Aerodynamic measures of glottal function: what extra can they tell us and how do they guide management?. *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery*, 22(6), 450–454.
<https://doi.org/10.1097/MOO.000000000000107>
- Johnson H. M. (2019). Anxiety and Hypertension: Is There a Link? A Literature Review of the Comorbidity Relationship Between Anxiety and Hypertension. *Current hypertension reports*, 21(9), 66. <https://doi.org/10.1007/s11906-019-0972-5>
- Jones, S. E., Stanić, D., & Dutschmann, M. (2016). Dorsal and ventral aspects of the most caudal medullary reticular formation have differential roles in modulation and formation of the respiratory motor pattern in rat. *Brain structure & function*, 221(9), 4353–4368. <https://doi.org/10.1007/s00429-015-1165-x>
- Jordan, D., Mifflin, S. W., & Spyer, K. M. (1988). Hypothalamic inhibition of neurones in the nucleus tractus solitarius of the cat is GABA mediated. *The Journal of physiology*, 399, 389–404. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1988.sp017087>

- Jürgens, U. (1974). On the elicibility of vocalization from the cortical larynx area. *Brain research*, 81(3), 564–566. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(74\)90853-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(74)90853-1)
- Jürgens, U. (1976). Reinforcing concomitants of electrically elicited vocalizations. *Experimental brain research*, 26(2), 203–214. <https://doi.org/10.1007/BF00238284>
- Jürgens, U. (1979) Neural control of vocalization in non-human primates. In: Steklis HD, Raleigh MJ (eds), *Neurobiology of social communication in primates: an evolutionary perspective*. (pp 11-44). Academic Press, New York,
- Jürgens, U. (1994). The role of the periaqueductal grey in vocal behaviour. *Behavioural brain research*, 62(2), 107–117. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(94\)90017-5](https://doi.org/10.1016/0166-4328(94)90017-5)
- Jürgens, U. (2002a). A study of the central control of vocalization using the squirrel monkey. *Medical engineering & physics*, 24(7-8), 473–477. [https://doi.org/10.1016/s1350-4533\(02\)00051-6](https://doi.org/10.1016/s1350-4533(02)00051-6)
- Jürgens, U. (2002b). Neural pathways underlying vocal control. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 26(2), 235–258. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(01\)00068-9](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(01)00068-9)
- Jürgens, U. (2009). The neural control of vocalization in mammals: a review. *Journal of voice: official journal of the Voice Foundation*, 23(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2007.07.005>
- Jürgens, U., & Müller-Preuss, P. (1977). Convergent projections of different limbic vocalization areas in the squirrel monkey. *Experimental brain research*, 29(1), 75–83. <https://doi.org/10.1007/BF00236876>
- Jürgens, U., Maurus, M., Ploog, D., & Winter, P. (1967). Vocalization in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*) elicited by brain stimulation. *Experimental brain research*, 4(2), 114–117. <https://doi.org/10.1007/BF00240356>
- Kabat, H., Magoun, H. W., & Ranson, S. W. (1935). Electrical stimulation of points in the forebrain and midbrain: The resultant alterations in blood pressure. *Arch. Neurol. Psychiatry*, 34(5), 931–955. <https://doi.org/10.1002/cne.900640202>
- Kabir, M. M., Beig, M. I., Baumert, M., Trombini, M., Mastorci, F., Sgoifo, A., Walker, F. R., Day, T. A., & Nalivaiko, E. (2010). Respiratory pattern in awake rats: effects of motor activity and of alerting stimuli. *Physiology & behavior*, 101(1), 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.04.004>
- Kalia, M., & Mesulam, M. M. (1980). Brain stem projections of sensory and motor components of the vagus complex in the cat: II. Laryngeal, tracheobronchial,

- pulmonary, cardiac, and gastrointestinal branches. *The Journal of comparative neurology*, 193(2), 467–508. <https://doi.org/10.1002/cne.901930211>
- KANAI, T., & WANG, S. C. (1962). Localization of the central vocalization mechanism in the brain stem of the cat. *Experimental neurology*, 6, 426–434. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(62\)90022-5](https://doi.org/10.1016/0014-4886(62)90022-5)
- Kanbar, R., Oréa, V., Chapuis, B., Barrès, C., & Julien, C. (2007). A transfer function method for the continuous assessment of baroreflex control of renal sympathetic nerve activity in rats. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 293(5), R1938–R1946. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00374.2007>
- Kataoka, N., Hioki, H., Kaneko, T., & Nakamura, K. (2014). Psychological stress activates a dorsomedial hypothalamus-medullary raphe circuit driving brown adipose tissue thermogenesis and hyperthermia. *Cell metabolism*, 20(2), 346–358. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.05.018>
- Kataoka, N., Shima, Y., Nakajima, K., & Nakamura, K. (2020). A central master driver of psychosocial stress responses in the rat. *Science*, 367(6482), 1105–1112. <https://doi.org/10.1126/science.aaz4639>
- Kaur, H., Aggarwal, A., Gupta, T., Sahni, D., & Gupta, R. (2016). Anatomical and functional aspects of cricothyroid joint: a cadaveric study. *European Journal of Anatomy*, 20(3), 205-213.
- Kaur, S., Lynch, N., Sela, Y., Lima, J. D., Thomas, R. C., Bandaru, S. S., & Saper, C. B. (2024). Lateral parabrachial FoxP2 neurons regulate respiratory responses to hypercapnia. *Nature communications*, 15(1), 4475. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-48773-5>
- Kawai Y. (2018). Differential Ascending Projections From the Male Rat Caudal Nucleus of the Tractus Solitarius: An Interface Between Local Microcircuits and Global Macrocircuits. *Frontiers in neuroanatomy*, 12, 63. <https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00063>
- Keay, K. A., & Bandler, R. (2001). Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 25(7-8), 669–678. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(01\)00049-5](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(01)00049-5)
- Kirchner, J. A. (1994). Fisiología de la laringe. En M. M. Paparella, D. A. Shumrick, J. L. Gluckman & W. L. Meyerhoff (Eds.), *Otorrinolaringología* (Vol. 1, 3.^a ed., pp. 398–408). Editorial Médica Panamericana.

- Kittelberger, J. M., Land, B. R., & Bass, A. H. (2006). Midbrain periaqueductal gray and vocal patterning in a teleost fish. *Journal of neurophysiology*, *96*(1), 71–85. <https://doi.org/10.1152/jn.00067.2006>
- Klages, S., Bellingham, M. C., & Richter, D. W. (1993). Late expiratory inhibition of stage 2 expiratory neurons in the cat—a correlate of expiratory termination. *Journal of neurophysiology*, *70*(4), 1307–1315. <https://doi.org/10.1152/jn.1993.70.4.1307>
- Klingbeil, J., Wawrzyniak, M., Stockert, A., Brandt, M. L., Schneider, H. R., Metelmann, M., & Saur, D. (2021). Pathological laughter and crying: insights from lesion network-symptom-mapping. *Brain: a journal of neurology*, *144*(10), 3264–3276. <https://doi.org/10.1093/brain/awab224>
- Knutson, B., Burgdorf, J., & Panksepp, J. (2002). Ultrasonic vocalizations as indices of affective states in rats. *Psychological bulletin*, *128*(6), 961–977. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.128.6.961>
- Kobler, J. B., Datta, S., Goyal, R. K., & Benecchi, E. J. (1994). Innervation of the larynx, pharynx, and upper esophageal sphincter of the rat. *The Journal of comparative neurology*, *349*(1), 129–147. <https://doi.org/10.1002/cne.903490109>
- Kono, Y., Yokota, S., Fukushi, I., Arima, Y., Onimaru, H., Okazaki, S., Takeda, K., Yazawa, I., Yoshizawa, M., Hasebe, Y., Koizumi, K., Pokorski, M., Toda, T., Sugita, K., & Okada, Y. (2020). Structural and functional connectivity from the dorsomedial hypothalamus to the ventral medulla as a chronological amplifier of sympathetic outflow. *Scientific reports*, *10*(1), 13325. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70234-4>
- Korner, P. I. (2007). Psychosocial stress and hypertension. En P. I. Korner (Ed.), *Essential hypertension and its causes: Neural and non-neural mechanisms* (pp. 317–358). Oxford University Press.
- Koshiya, N., Oku, Y., Yokota, S., Oyamada, Y., Yasui, Y., & Okada, Y. (2014). Anatomical and functional pathways of rhythmogenic inspiratory premotor information flow originating in the pre-Bötzinger complex in the rat medulla. *Neuroscience*, *268*, 194–211. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.03.002>
- Kosubek-Langer, J., & Scharff, C. (2020). Dynamic FoxP2 levels in male zebra finches are linked to morphology of adult-born Area X medium spiny neurons. *Scientific reports*, *10*(1), 4787. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61740-6>
- Krohn, F., Novello, M., van der Giessen, R. S., De Zeeuw, C. I., Pel, J. J. M., & Bosman, L. W. J. (2023). The integrated brain network that controls respiration. *eLife*, *12*, e83654. <https://doi.org/10.7554/eLife.83654>

- Krohner, R. G., & Ramanathan, S. (2007). Functional anatomy of the airway. En C. A. Hagberg (Ed.), *Benumof's airway management: Principles and practice* (2.^a ed., pp. 3–21). Philadelphia, PA: Mosby Elsevier.
- Krout, K. E., & Loewy, A. D. (2000). Periaqueductal gray matter projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. *The Journal of comparative neurology*, *424*(1), 111–141. [https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20000814\)424:1<111::aid-cne9>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20000814)424:1<111::aid-cne9>3.0.co;2-3)
- Krout, K. E., Jansen, A. S., & Loewy, A. D. (1998). Periaqueductal gray matter projection to the parabrachial nucleus in rat. *The Journal of comparative neurology*, *401*(4), 437–454.
- Krukoff, T. L., Harris, K. H., & Jhamandas, J. H. (1993). Efferent projections from the parabrachial nucleus demonstrated with the anterograde tracer Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Brain research bulletin*, *30*(1-2), 163–172. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(93\)90054-f](https://doi.org/10.1016/0361-9230(93)90054-f)
- Kubin, L., Alheid, G. F., Zuperku, E. J., & McCrimmon, D. R. (2006). Central pathways of pulmonary and lower airway vagal afferents. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, *101*(2), 618–627. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00252.2006>
- Kuner, R., & Kuner, T. (2021). Cellular Circuits in the Brain and Their Modulation in Acute and Chronic Pain. *Physiological reviews*, *101*(1), 213–258. <https://doi.org/10.1152/physrev.00040.2019>
- Kuo, H. Y., Chen, S. Y., Huang, R. C., Takahashi, H., Lee, Y. H., Pang, H. Y., Wu, C. H., Graybiel, A. M., & Liu, F. C. (2023). Speech- and language-linked FOXP2 mutation targets protein motors in striatal neurons. *Brain: a journal of neurology*, *146*(8), 3542–3557. <https://doi.org/10.1093/brain/awad090>
- Lai, C. S., Fisher, S. E., Hurst, J. A., Vargha-Khadem, F., & Monaco, A. P. (2001). A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder. *Nature*, *413*(6855), 519–523. <https://doi.org/10.1038/35097076>
- Lamotte, G., Shouman, K., & Benarroch, E. E. (2021). Stress and central autonomic network. *Autonomic neuroscience: basic & clinical*, *235*, 102870. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2021.102870>
- Lara Aparicio, S. Y., Laureani Fierro, Á. J., Aranda Abreu, G. E., Toledo Cárdenas, R., García Hernández, L. I., Coria Ávila, G. A., Rojas Durán, F., Aguilar, M. E. H., Manzo Denes, J., Chi-Castañeda, L. D., & Pérez Estudillo, C. A. (2022). Current Opinion on the Use of c-Fos in Neuroscience. *NeuroSci*, *3*(4), 687–702. <https://doi.org/10.3390/neurosci3040050>

- Lara, J. P., Dawid-Milner, M. S., & González-Barón, S. (1993). Effects of bronchoconstriction on the cough reflex in the cat. *Rev Esp Fisiol*, 49(4), 235–240.
- Lara, J. P., Dawid-Milner, M. S., López, M. V., Montes, C., Spyer, K. M., & González-Barón, S. (2002). Laryngeal effects of stimulation of rostral and ventral pons in the anaesthetized rat. *Brain research*, 934(2), 97–106. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)02364-8](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)02364-8)
- Lavezzi, A. M., & Mehboob, R. (2021). The Mesencephalic Periaqueductal Gray, a Further Structure Involved in Breathing Failure Underlying Sudden Infant Death Syndrome. *ASN neuro*, 13, 17590914211048260. <https://doi.org/10.1177/17590914211048260>
- Lebow, M. A., & Chen, A. (2016). Overshadowed by the amygdala: the bed nucleus of the stria terminalis emerges as key to psychiatric disorders. *Molecular psychiatry*, 21(4), 450–463. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.1>
- Lemon, R. (1985). Methods for neuronal recording in conscious animals [Reseña del libro *IBRO handbook series: Methods in the neurosciences*, Vol. 4, editado por A. D. Smith]. *Neurology*, 35(1), 142–142-d. <https://doi.org/10.1212/WNL.35.1.142-d>
- Lenell, C., Broadfoot, C. K., Schaen-Heacock, N. E., & Ciucci, M. R. (2021). Biological and Acoustic Sex Differences in Rat Ultrasonic Vocalization. *Brain sciences*, 11(4), 459. <https://doi.org/10.3390/brainsci11040459>
- Lev, M. H., & Curtin, H. D. (1998). Larynx. *Neuroimaging clinics of North America*, 8(1), 235–256.
- Levendoski, E. E., Leydon, C., & Thibeault, S. L. (2014). Vocal fold epithelial barrier in health and injury: a research review. *Journal of speech, language, and hearing research: JSLHR*, 57(5), 1679–1691. https://doi.org/10.1044/2014_JSLHR-S-13-0283
- Levitt, E. S., Abdala, A. P., Paton, J. F., Bissonnette, J. M., & Williams, J. T. (2015). μ opioid receptor activation hyperpolarizes respiratory-controlling Kölliker-Fuse neurons and suppresses post-inspiratory drive. *The Journal of physiology*, 593(19), 4453–4469. <https://doi.org/10.1113/JP270822>
- Li, L., Zhang, M. Q., Sun, X., Liu, W. Y., Huang, Z. L., & Wang, Y. Q. (2022). Role of Dorsomedial Hypothalamus GABAergic Neurons in Sleep-Wake States in Response to Changes in Ambient Temperature in Mice. *International journal of molecular sciences*, 23(3), 1270. <https://doi.org/10.3390/ijms23031270>
- Li, T. L., Chen, J. Y. S., Huang, S. C., Dai, Y. E., & Hwang, L. L. (2018). Cardiovascular pressor effects of orexins in the dorsomedial hypothalamus. *European journal of pharmacology*, 818, 343–350. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.11.004>

- Liao, G. Y., Kinney, C. E., An, J. J., & Xu, B. (2019). TrkB-expressing neurons in the dorsomedial hypothalamus are necessary and sufficient to suppress homeostatic feeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(8), 3256–3261. <https://doi.org/10.1073/pnas.1815744116>
- Linnman, C., Moulton, E. A., Barmettler, G., Becerra, L., & Borsook, D. (2012). Neuroimaging of the periaqueductal gray: state of the field. *NeuroImage*, *60*(1), 505–522. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.11.095>
- Lipski, J., Bellingham, M. C., West, M. J., & Pilowsky, P. (1988). Limitations of the technique of pressure microinjection of excitatory amino acids for evoking responses from localized regions of the CNS. *Journal of neuroscience methods*, *26*(2), 169–179. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(88\)90166-5](https://doi.org/10.1016/0165-0270(88)90166-5)
- Liu, N., Fu, C., Yu, H., Wang, Y., Shi, L., Hao, Y., Yuan, F., Zhang, X., & Wang, S. (2021). Respiratory Control by Phox2b-expressing Neurons in a Locus Coeruleus-preBötzing Complex Circuit. *Neuroscience bulletin*, *37*(1), 31–44. <https://doi.org/10.1007/s12264-020-00519-1>
- Loewy A. D. (1991). Forebrain nuclei involved in autonomic control. *Progress in brain research*, *87*, 253–268. [https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(08\)63055-1](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)63055-1)
- LoMauro, A., & Aliverti, A. (2021). Sex and gender in respiratory physiology. *European respiratory review: an official journal of the European Respiratory Society*, *30*(162), 210038. <https://doi.org/10.1183/16000617.0038-2021>
- López-González, M. V., Díaz-Casares, A., González-García, M., Peinado-Aragonés, C. A., Barbancho, M. A., Carrillo de Albornoz, M., & Dawid-Milner, M. S. (2018). Glutamate receptors of the A5 region modulate cardiovascular responses evoked from the dorsomedial hypothalamic nucleus and perifornical area. *Journal of physiology and biochemistry*, *74*(2), 325–334. <https://doi.org/10.1007/s13105-018-0623-3>
- López-González, M. V., Díaz-Casares, A., Peinado-Aragonés, C. A., Lara, J. P., Barbancho, M. A., & Dawid-Milner, M. S. (2013). Neurons of the A5 region are required for the tachycardia evoked by electrical stimulation of the hypothalamic defence area in anaesthetized rats. *Experimental physiology*, *98*(8), 1279–1294. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2013.072538>
- López-González, M. V., González-García, M., Peinado-Aragonés, C. A., Barbancho, M. A., Díaz-Casares, A., & Dawid-Milner, M. S. (2020). Pontine A5 region modulation of the cardiorespiratory response evoked from the midbrain dorsolateral periaqueductal grey. *Journal of physiology and biochemistry*, *76*(4), 561–572. <https://doi.org/10.1007/s13105-020-00761-1>

- Lorente de No, R. (1947). Initiation of the nerve impulse by the electric current. *Studies from the Rockefeller institute for medical research. Reprints. Rockefeller Institute for Medical Research*, 132, 85–144.
- Loth, A., Corny, J., Santini, L., Dahan, L., Dessi, P., Adalian, P., & Fakhry, N. (2015). Analysis of Hyoid-Larynx Complex Using 3D Geometric Morphometrics. *Dysphagia*, 30(3), 357–364. <https://doi.org/10.1007/s00455-015-9609-2>
- Luppi, P. H., Aston-Jones, G., Akaoka, H., Chouvet, G., & Jouvet, M. (1995). Afferent projections to the rat locus coeruleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing with cholera-toxin B subunit and Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience*, 65(1), 119–160. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)00481-j](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)00481-j)
- Luskin, A. T., Bhatti, D. L., Mulvey, B., Pedersen, C. E., Girven, K. S., Oden-Brunson, H., Kimbell, K., Blackburn, T., Sawyer, A., Gereau, R. W., 4th, Dougherty, J. D., & Bruchas, M. R. (2021). Extended amygdala-parabrachial circuits alter threat assessment and regulate feeding. *Science advances*, 7(9), eabd3666. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abd3666>
- Machado, B. H., & Brody, M. J. (1988). Role of the nucleus ambiguus in the regulation of heart rate and arterial pressure. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 11(6 Pt 2), 602–607. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.11.6.602>
- Magoun, H. W., Atlas, D., Ingersoll, E. H., & Ranson, S. W. (1937). Associated Facial, Vocal and Respiratory Components of Emotional Expression: An Experimental Study. *The Journal of neurology and psychopathology*, 17(67), 241–255. <https://doi.org/10.1136/jnnp.s1-17.67.241>
- Mahrt, E., Agarwal, A., Perkel, D., Portfors, C., & Elemans, C. P. (2016). Mice produce ultrasonic vocalizations by intra-laryngeal planar impinging jets. *Current biology: CB*, 26(19), R880–R881. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.08.032>
- Malpas S. C. (2010). Sympathetic nervous system overactivity and its role in the development of cardiovascular disease. *Physiological reviews*, 90(2), 513–557. <https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2009>
- Mancia, G., & Zanchetti, A. (1981). Hypothalamic control of autonomic functions. En P. J. Morgane & J. Panksepp (Eds.), *Handbook of the hypothalamus* (Vol. 3, Part B. *Behavioral studies of the hypothalamus*, pp. 147–201). Marcel Dekker.
- Manduca, A., Campolongo, P., Palmery, M., Vanderschuren, L. J., Cuomo, V., & Trezza, V. (2014). Social play behavior, ultrasonic vocalizations and their modulation by morphine and amphetamine in Wistar and Sprague-Dawley rats.

- Psychopharmacology*, 231(8), 1661–1673. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3337-9>
- Marchenko, V., Koizumi, H., Mosher, B., Koshiya, N., Tariq, M. F., Bezdudnaya, T. G., Zhang, R., Molkov, Y. I., Rybak, I. A., & Smith, J. C. (2016). Perturbations of Respiratory Rhythm and Pattern by Disrupting Synaptic Inhibition within Pre-Bötzinger and Bötzing Complexes. *eNeuro*, 3(2), ENEURO.0011-16.2016. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0011-16.2016>
- Marina, N., Turovsky, E., Christie, I. N., Hosford, P. S., Hadjihambi, A., Korsak, A., Ang, R., Mastitskaya, S., Sheikhabahaei, S., Theparambil, S. M., & Gourine, A. V. (2018). Brain metabolic sensing and metabolic signaling at the level of an astrocyte. *Glia*, 66(6), 1185–1199. <https://doi.org/10.1002/glia.23283>
- Marins, F. R., Limborço-Filho, M., Xavier, C. H., Biancardi, V. C., Vaz, G. C., Stern, J. E., Oppenheimer, S. M., & Fontes, M. A. (2016). Functional topography of cardiovascular regulation along the rostrocaudal axis of the rat posterior insular cortex. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 43(4), 484–493. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12542>
- Markakis E. A. (2002). Development of the neuroendocrine hypothalamus. *Frontiers in neuroendocrinology*, 23(3), 257–291. [https://doi.org/10.1016/s0091-3022\(02\)00003-1](https://doi.org/10.1016/s0091-3022(02)00003-1)
- Markgraf, C. G., Winters, R. W., Liskowsky, D. R., McCabe, P. M., Green, E. J., & Schneiderman, N. (1991). Hypothalamic, midbrain and bulbar areas involved in the defense reaction in rabbits. *Physiology & behavior*, 49(3), 493–500. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(91\)90270-x](https://doi.org/10.1016/0031-9384(91)90270-x)
- Markova, D., Richer, L., Pangelinan, M., Schwartz, D. H., Leonard, G., Perron, M., Pike, G. B., Veillette, S., Chakravarty, M. M., Pausova, Z., & Paus, T. (2016). Age- and sex-related variations in vocal-tract morphology and voice acoustics during adolescence. *Hormones and behavior*, 81, 84–96. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.03.001>
- Marques, M. J., Ferretti, R., Vomero, V. U., Minatel, E., & Neto, H. S. (2007). Intrinsic laryngeal muscles are spared from myonecrosis in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Muscle & nerve*, 35(3), 349–353. <https://doi.org/10.1002/mus.20697>
- Marsh, A. J., Fontes, M. A., Killinger, S., Pawlak, D. B., Polson, J. W., & Dampney, R. A. (2003). Cardiovascular responses evoked by leptin acting on neurons in the ventromedial and dorsomedial hypothalamus. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 42(4), 488–493. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000090097.22678.0A>

- Martinez, C. C., & Cassol, M. (2015). Measurement of Voice Quality, Anxiety and Depression Symptoms After Speech Therapy. *Journal of voice: official journal of the Voice Foundation*, 29(4), 446–449. <https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2014.09.004>
- Martín-Oviedo, C., Marañillo, E., Sañudo, J. R., Pérez-Lloret, P., Verdú, E., Martínez-Guirado, T., Álvarez-Montero, O., Gómez Martín-Zarco, J. M., & Vázquez, T. (2019). The Human Laryngeal Innervation Revisited-The Role of the Neural Connections. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)*, 302(4), 646–651. <https://doi.org/10.1002/ar.23817>
- McCullagh, K. L., Shah, R. N., & Huang, B. Y. (2022). Anatomy of the Larynx and Cervical Trachea. *Neuroimaging clinics of North America*, 32(4), 809–829. <https://doi.org/10.1016/j.nic.2022.07.011>
- McDowall, L. M., Horiuchi, J., Killinger, S., & Dampney, R. A. (2006). Modulation of the baroreceptor reflex by the dorsomedial hypothalamic nucleus and perifornical area. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 290(4), R1020–R1026. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00541.2005>
- McFarland, D. H. (2008). *Atlas de anatomía en ortofonía: lenguaje y deglución* (M. Calvo i Graells, Trad.; V. Bartolomé Pascual, Rev.; il. F. H. Netter). Elsevier España.
- McGovern, A. E., Driessen, A. K., Simmons, D. G., Powell, J., Davis-Poynter, N., Farrell, M. J., & Mazzone, S. B. (2015). Distinct brainstem and forebrain circuits receiving tracheal sensory neuron inputs revealed using a novel conditional anterograde transsynaptic viral tracing system. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 35(18), 7041–7055. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5128-14.2015>
- McHanwell, S. (2008). The larynx. En S. Standring (Ed.), *Gray's Anatomy: The anatomical basis of clinical practice* (40.^a ed., pp. 577–594). Churchill Livingstone.
- Merrill E. G. (1970). The lateral respiratory neurones of the medulla: their associations with nucleus ambiguus, nucleus retroambiguus, the spinal accessory nucleus and the spinal cord. *Brain research*, 24(1), 11–28. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(70\)90271-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(70)90271-4)
- Merrill, E. G., Lipski, J., Kubin, L., & Fedorko, L. (1983). Origin of the expiratory inhibition of nucleus tractus solitarius inspiratory neurones. *Brain research*, 263(1), 43–50. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(83\)91198-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(83)91198-8)
- Meuret, A. E., Kroll, J., & Ritz, T. (2017). Panic Disorder Comorbidity with Medical Conditions and Treatment Implications. *Annual review of clinical psychology*, 13, 209–240. <https://doi.org/10.1146/annurev-clinpsy-021815-093044>

- Meuret, A. E., Rosenfield, D., Seidel, A., Bhaskara, L., & Hofmann, S. G. (2010). Respiratory and cognitive mediators of treatment change in panic disorder: evidence for intervention specificity. *Journal of consulting and clinical psychology, 78*(5), 691–704. <https://doi.org/10.1037/a0019552>
- Michael, V., Goffinet, J., Pearson, J., Wang, F., Tschida, K., & Mooney, R. (2020). Circuit and synaptic organization of forebrain-to-midbrain pathways that promote and suppress vocalization. *eLife, 9*, e63493. <https://doi.org/10.7554/eLife.63493>
- Mifflin, S. W., Spyer, K. M., & Withington-Wray, D. J. (1988). Baroreceptor inputs to the nucleus tractus solitarius in the cat: modulation by the hypothalamus. *The Journal of physiology, 399*, 369–387. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1988.sp017086>
- Miller A. J. (2008). The neurobiology of swallowing and dysphagia. *Developmental disabilities research reviews, 14*(2), 77–86. <https://doi.org/10.1002/ddrr.12>
- Miri A. K. (2014). Mechanical characterization of vocal fold tissue: a review study. *Journal of voice: official journal of the Voice Foundation, 28*(6), 657–667. <https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2014.03.001>
- Moga, M. M., Herbert, H., Hurley, K. M., Yasui, Y., Gray, T. S., & Saper, C. B. (1990). Organization of cortical, basal forebrain, and hypothalamic afferents to the parabrachial nucleus in the rat. *The Journal of comparative neurology, 295*(4), 624–661. <https://doi.org/10.1002/cne.902950408>
- Mohammed, M., Kulasekara, K., De Menezes, R. C., Ootsuka, Y., & Blessing, W. W. (2013). Inactivation of neuronal function in the amygdaloid region reduces tail artery blood flow alerting responses in conscious rats. *Neuroscience, 228*, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.10.008>
- Molkov, Y. I., Rubin, J. E., Rybak, I. A., & Smith, J. C. (2017). Computational models of the neural control of breathing. *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine, 9*(2), 10.1002/wsbm.1371. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1371>
- Molkov, Y. I., Shevtsova, N. A., Park, C., Ben-Tal, A., Smith, J. C., Rubin, J. E., & Rybak, I. A. (2014). A closed-loop model of the respiratory system: focus on hypercapnia and active expiration. *PloS one, 9*(10), e109894. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109894>
- 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*(7448), 205–210. <https://doi.org/10.1038/nature12076>

- Moore, K. L., & Dalley, A. F. (2006). *Clinically oriented anatomy* (5.^a ed.). Lippincott Williams & Wilkins.
- Moraes, D. J., & Machado, B. H. (2015). Electrophysiological properties of laryngeal motoneurons in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *The Journal of physiology*, 593(3), 619–634. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.283085>
- Moreira, T. S., Takakura, A. C., Falquetto, B., Ramirez, J. M., Oliveira, L. M., Silva, P. E., & Araujo, E. V. (2025). Neuroanatomical and neurochemical organization of brainstem and forebrain circuits involved in breathing regulation. *Journal of neurophysiology*, 133(4), 1116–1137. <https://doi.org/10.1152/jn.00475.2024>
- Morgado-Valle, C., & Beltran-Parrazal, L. (2017). Respiratory Rhythm Generation: The Whole Is Greater Than the Sum of the Parts. *Advances in experimental medicine and biology*, 1015, 147–161. https://doi.org/10.1007/978-3-319-62817-2_9
- Morgan, A., Fisher, S. E., Scheffer, I. E., & Hildebrand, M. S. (2016). FOXP2-related speech and language disorder. In M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. H. Bean, K. W. Gripp, & A. Amemiya (Eds.), *GeneReviews*®. University of Washington, Seattle. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK368474/>
- Morgan, J. I., & Curran, T. (1991). Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annual review of neuroscience*, 14, 421–451. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.14.030191.002225>
- Morin, S. M., Stotz-Potter, E. H., & DiMicco, J. A. (2001). Injection of muscimol in dorsomedial hypothalamus and stress-induced Fos expression in paraventricular nucleus. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 280(5), R1276–R1284. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.280.5.R1276>
- Mortensen, L. H., Ohman, L. E., & Haywood, J. R. (1994). Effects of lateral parabrachial nucleus lesions in chronic renal hypertensive rats. *Hypertension*, 23(6 Pt 1), 774–780. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.23.6.774>
- Mortola, J. P. (2013). Lung viscoelasticity: Implications on breathing and forced expiration. *Clinical Pulmonary Medicine*, 20(4), 144–148. <https://doi.org/10.1097/CPM.0b013e31828fc9d6>
- Motta, S. C., Carobrez, A. P., & Canteras, N. S. (2017). The periaqueductal gray and primal emotional processing critical to influence complex defensive responses, fear learning and reward seeking. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 76(Pt A), 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.10.012>

- Motta, S. C., Goto, M., Gouveia, F. V., Baldo, M. V., Canteras, N. S., & Swanson, L. W. (2009). Dissecting the brain's fear system reveals the hypothalamus is critical for responding in subordinate conspecific intruders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(12), 4870–4875. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900939106>
- Nahm, I., Shin, T., Watanabe, H., & Maeyama, T. (1993). Misdirected regeneration of injured recurrent laryngeal nerve in the cat. *American journal of otolaryngology*, 14(1), 43–48. [https://doi.org/10.1016/0196-0709\(93\)90009-v](https://doi.org/10.1016/0196-0709(93)90009-v)
- Nakamura K. (2011). Central circuitries for body temperature regulation and fever. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 301(5), R1207–R1228. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00109.2011>
- Nakamura, K., & Morrison, S. F. (2022). Central sympathetic network for thermoregulatory responses to psychological stress. *Autonomic neuroscience: basic & clinical*, 237, 102918. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2021.102918>
- Narai, E., & Koba, S. (2024). Effect of optogenetic excitation of non-orexinergic neurons in the hypothalamic perifornical area on motor behaviors and cardiovascular parameters in rats. *Neuroscience letters*, 837, 137915. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2024.137915>
- Neff, R. A., Mihalevich, M., & Mendelowitz, D. (1998). Stimulation of NTS activates NMDA and non-NMDA receptors in rat cardiac vagal neurons in the nucleus ambiguus. *Brain research*, 792(2), 277–282. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(98\)00149-8](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)00149-8)
- Netter, F. H. (2019). Actions of intrinsic muscles of larynx. *En Atlas of human anatomy* (7.^a ed., cap. 93). Philadelphia, PA: Saunders Elsevier.
- Ni, R. J., Luo, P. H., Shu, Y. M., Chen, J. T., & Zhou, J. N. (2016). Whole-brain mapping of afferent projections to the bed nucleus of the stria terminalis in tree shrews. *Neuroscience*, 333, 162–180. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.07.017>
- Nishimura, T., Tokuda, I. T., Miyachi, S., Dunn, J. C., Herbst, C. T., Ishimura, K., Kaneko, A., Kinoshita, Y., Koda, H., Saers, J. P. P., Imai, H., Matsuda, T., Larsen, O. N., Jürgens, U., Hirabayashi, H., Kojima, S., & Fitch, W. T. (2022). *Evolutionary loss of complexity in human vocal anatomy as an adaptation for speech. Science*, 377(6607), 760–763. <https://doi.org/10.1126/science.abm1574>
- Nogueira, M. I., de Rezende, B. D., do Vale, L. E., & Bittencourt, J. C. (2000). Afferent connections of the caudal raphe pallidus nucleus in rats: a study using the fluorescent retrograde tracers fluorogold and true-blue. *Annals of anatomy = Anatomischer*

- Anzeiger: official organ of the Anatomische Gesellschaft*, 182(1), 35–45.
[https://doi.org/10.1016/s0940-9602\(00\)80118-1](https://doi.org/10.1016/s0940-9602(00)80118-1)
- Noordzij, J. P., & Ossoff, R. H. (2006). Anatomy and physiology of the larynx. *Otolaryngologic clinics of North America*, 39(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.otc.2005.10.004>
- Núñez-Abades, P. A., Portillo, F., & Pásaro, R. (1990). Characterisation of afferent projections to the nucleus ambiguus of the rat by means of fluorescent double labelling. *Journal of anatomy*, 172, 1–15.
- Oka, T., Tsumori, T., Yokota, S., & Yasui, Y. (2008). Neuroanatomical and neurochemical organization of projections from the central amygdaloid nucleus to the nucleus retroambiguus via the periaqueductal gray in the rat. *Neuroscience research*, 62(4), 286–298. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2008.10.004>
- Oliveira, L. M., Takakura, A. C., & Moreira, T. S. (2021). Forebrain and Hindbrain Projecting-neurons Target the Post-inspiratory Complex Cholinergic Neurons. *Neuroscience*, 476, 102–115. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.09.015>
- Onat, F. Y., Aker, R., Sehirli, U., San, T., & Cavdar, S. (2002). Connections of the dorsomedial hypothalamic nucleus from the forebrain structures in the rat. *Cells, tissues, organs*, 172(1), 48–52. <https://doi.org/10.1159/000064385>
- Pang, Z. P., & Han, W. (2012). Regulation of synaptic functions in central nervous system by endocrine hormones and the maintenance of energy homeostasis. *Bioscience reports*, 32(5), 423–432. <https://doi.org/10.1042/BSR20120026>
- Panneton, W. M., Gan, Q., & Juric, R. (2006). Brainstem projections from recipient zones of the anterior ethmoidal nerve in the medullary dorsal horn. *Neuroscience*, 141(2), 889–906. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.04.055>
- Papp, R. S., & Palkovits, M. (2014). Brainstem projections of neurons located in various subdivisions of the dorsolateral hypothalamic area-an anterograde tract-tracing study. *Frontiers in neuroanatomy*, 8, 34. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00034>
- Park, J., Choi, S., Takatoh, J., Zhao, S., Harrahill, A., Han, B. X., & Wang, F. (2024). Brainstem control of vocalization and its coordination with respiration. *Science*, 383(6687), eadi8081. <https://doi.org/10.1126/science.adi8081>
- Parker, N. P., Patel, R. R., & Halum, S. (2016). Micro-neuroanatomy of the vagus, superior laryngeal, and recurrent laryngeal nerves. En R. R. Patel & S. M. Bless (Eds.), *The recurrent and superior laryngeal nerves* (pp. 49–68). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27727-1_4

- Pásaro, R., Lobera, B., González-Barón, S., & Delgado-García, J. M. (1983). Cytoarchitectonic organization of laryngeal motoneurons within the nucleus ambiguus of the cat. *Experimental neurology*, *82*(3), 623–634. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(83\)90085-7](https://doi.org/10.1016/0014-4886(83)90085-7)
- Pascual-Font, A., Hernández-Morato, I., McHanwell, S., Vázquez, T., Maranillo, E., Sañudo, J., & Valderrama-Canales, F. J. (2011). The central projections of the laryngeal nerves in the rat. *Journal of anatomy*, *219*(2), 217–228. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2011.01390.x>
- Pascual-Font, A., Maranillo, E., Merchán, A., Vázquez, T., Sañudo, J. R., & Valderrama-Canales, F. (2006). Proyecciones centrales del nervio laríngeo superior de la rata [Central projections of the rat superior laryngeal nerve]. *Acta otorrinolaringologica española*, *57*(7), 295–299. [https://doi.org/10.1016/s0001-6519\(06\)78714-3](https://doi.org/10.1016/s0001-6519(06)78714-3)
- Paton, J. F., & Dutschmann, M. (2002). Central control of upper airway resistance regulating respiratory airflow in mammals. *Journal of anatomy*, *201*(4), 319–323. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2002.00101.x>
- Patrickson, J. W., Smith, T. E., & Zhou, S. S. (1991). Motor neurons of the laryngeal nerves. *The Anatomical record*, *230*(4), 551–556. <https://doi.org/10.1002/ar.1092300415>
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). The rat brain in stereotaxic coordinates (6th ed.). Academic Press.
- Perelló, J. (1962). Théorie muco-ondulatoire de la phonation. *Annales d'Oto-Laryngologie*, *79*(9).
- Peterson, J. R., Watts, C. R., Morris, J. A., Shelton, J. M., & Cooper, B. G. (2013). Laryngeal aging and acoustic changes in male rat ultrasonic vocalizations. *Developmental psychobiology*, *55*(8), 818–828. <https://doi.org/10.1002/dev.21072>
- Pitts, T., Gayagoy, A. G., Rose, M. J., Poliacek, I., Condrey, J. A., Musselwhite, M. N., Shen, T. Y., Davenport, P. W., & Bolser, D. C. (2015). Suppression of Abdominal Motor Activity during Swallowing in Cats and Humans. *PloS one*, *10*(5), e0128245. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128245>
- Poliacek, I., Halasova, E., Jakus, J., Murin, P., Barani, H., Stransky, A., & Bolser, D. C. (2007). Brainstem regions involved in the expiration reflex. A c-fos study in anesthetized cats. *Brain research*, *1184*, 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.09.064>
- Pozzi, M., Rezoagli, E., Bronco, A., Rabboni, F., Grasselli, G., Foti, G., & Bellani, G. (2022). Accessory and Expiratory Muscles Activation During Spontaneous Breathing Trial: A

- Physiological Study by Surface Electromyography. *Frontiers in medicine*, 9, 814219. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.814219>
- Prostebby, M., Saini, J., Biancardi, V., Dickson, C. T., & Pagliardini, S. (2025). Activation of the periaqueductal gray controls respiratory output through a distributed brain network. *Frontiers in physiology*, 16, 1516771. <https://doi.org/10.3389/fphys.2025.1516771>
- Puzovic, G., Wolan, M. J., Shi, Y., & Collins, G. T. (2025). Interactions between cardiorespiratory effects of fentanyl and xylazine and their reversal in male and female Sprague-Dawley rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 392(10), 103711. <https://doi.org/10.1016/j.jpvet.2025.103711>
- Queiroz, E. A., Okada, M. N., Fumega, U., Fontes, M. A., Moraes, M. F., & Haibara, A. S. (2011). Excitatory amino acid receptors in the dorsomedial hypothalamus are involved in the cardiovascular and behavioural chemoreflex responses. *Experimental physiology*, 96(2), 73–84. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2010.054080>
- Rakerd, B., Hunter, E. J., & Lapine, P. (2019). Resonance Effects and the Vocalization of Speech. *Perspectives of the ASHA special interest groups*, 4(6), 1637–1643. https://doi.org/10.1044/2019_pers-19-00052
- Ramirez, J. M., & Baertsch, N. A. (2019). Modeling breathing rhythms. *eLife*, 8, e46033. <https://doi.org/10.7554/eLife.46033>
- Ramirez-Plascencia, O. D., De Luca, R., Machado, N. L. S., Eghlidi, D., Khanday, M. A., Bandaru, S. S., Raffin, F., Vujovic, N., Arrigoni, E., & Saper, C. B. (2025). A hypothalamic circuit for circadian regulation of corticosterone secretion. *Research square*, rs.3.rs-4718850. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4718850/v2>
- Reddy, M. K., Patel, K. P., & Schultz, H. D. (2005). Differential role of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in modulating the sympathoexcitatory component of peripheral and central chemoreflexes. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 289(3), R789–R797. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00222.2005>
- Regner, M. F., Tao, C., Ying, D., Olszewski, A., Zhang, Y., & Jiang, J. J. (2012). The effect of vocal fold adduction on the acoustic quality of phonation: ex vivo investigations. *J Voice*, 26(6), 698–705. <https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2011.09.012>
- Reimers-Kipping, S., Hevers, W., Pääbo, S., & Enard, W. (2011). Humanized Foxp2 specifically affects cortico-basal ganglia circuits. *Neuroscience*, 175, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.11.042>

- Ressler, K. J., Berretta, S., Bolshakov, V. Y., Rosso, I. M., Meloni, E. G., Rauch, S. L., & Carlezon, W. A., Jr (2022). Post-traumatic stress disorder: clinical and translational neuroscience from cells to circuits. *Nature reviews. Neurology*, *18*(5), 273–288. <https://doi.org/10.1038/s41582-022-00635-8>
- Reuter, M. S., Riess, A., Moog, U., Briggs, T. A., Chandler, K. E., Rauch, A., Stampfer, M., Steindl, K., Gläser, D., Joset, P., DDD Study, Krumbiegel, M., Rabe, H., Schulte-Mattler, U., Bauer, P., Beck-Wödl, S., Kohlhase, J., Reis, A., & Zweier, C. (2017). FOXP2 variants in 14 individuals with developmental speech and language disorders broaden the mutational and clinical spectrum. *Journal of medical genetics*, *54*(1), 64–72. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2016-104094>
- Richter, D. W., & Smith, J. C. (2014). Respiratory rhythm generation in vivo. *Physiology (Bethesda, Md.)*, *29*(1), 58–71. <https://doi.org/10.1152/physiol.00035.2013>
- Riede T. (2011). Subglottal pressure, tracheal airflow, and intrinsic laryngeal muscle activity during rat ultrasound vocalization. *Journal of neurophysiology*, *106*(5), 2580–2592. <https://doi.org/10.1152/jn.00478.2011>
- Riede T. (2013). Stereotypic laryngeal and respiratory motor patterns generate different call types in rat ultrasound vocalization. *Journal of experimental zoology. Part A, Ecological genetics and physiology*, *319*(4), 213–224. <https://doi.org/10.1002/jez.1785>
- Riede, T., Borgard, H. L., & Pasch, B. (2017). Laryngeal airway reconstruction indicates that rodent ultrasonic vocalizations are produced by an edge-tone mechanism. *Royal Society open science*, *4*(11), 170976. <https://doi.org/10.1098/rsos.170976>
- Riede, T., Schaefer, C., & Stein, A. (2020). Role of deep breaths in ultrasonic vocal production of Sprague-Dawley rats. *Journal of neurophysiology*, *123*(3), 966–979. <https://doi.org/10.1152/jn.00590.2019>
- Roberts L. H. (1975b). The rodent ultrasound production mechanism. *Ultrasonics*, *13*(2), 83–88. [https://doi.org/10.1016/0041-624x\(75\)90052-9](https://doi.org/10.1016/0041-624x(75)90052-9)
- Roberts, L. H. (1975a). Evidence for the laryngeal source of ultrasonic and audible cries of rodents. *Journal of Zoology*, *175*(2), 243–257. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1975.tb01399.x>
- Robins, M. T., Li, J., & Ryabinin, A. E. (2020). Effects of Housing Conditions and Circadian Time on Baseline c-Fos Immunoreactivity in C57BL/6J Mice. *Neuroscience*, *431*, 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.02.006>

- Rocha, I., González-García, M., Carrillo-Franco, L., Dawid-Milner, M. S., & López-González, M. V. (2024). Influence of Brainstem's Area A5 on Sympathetic Outflow and Cardiorespiratory Dynamics. *Biology*, 13(3), 161. <https://doi.org/10.3390/biology13030161>
- Rocha, I., Silva-Carvalho, L., & Spyer, K. M. (2004). Effect of stimulation of anterior hypothalamic area on urinary bladder function of the anesthetized rat. *Clinical autonomic research: official journal of the Clinical Autonomic Research Society*, 14(4), 264–269. <https://doi.org/10.1007/s10286-004-0212-0>
- Rosen, A. (1961). Augmented cardiac contraction, heart acceleration and skeletal muscle vasodilatation produced by hypothalamic stimulation in cats. *Acta physiologica Scandinavica*, 52, 291–308. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1961.tb02226.x>
- Rübsamen, R., & Betz, M. (1986). Control of echolocation pulses by neurons of the nucleus ambiguus in the rufous horseshoe bat, *Rhinolophus rouxi*. I. Single unit recordings in the ventral motor nucleus of the laryngeal nerves in spontaneously vocalizing bats. *Journal of comparative physiology. A, Sensory, neural, and behavioral physiology*, 159(5), 675–687. <https://doi.org/10.1007/BF00612040>
- Ruyle, B. C., Martinez, D., Heesch, C. M., Kline, D. D., & Hasser, E. M. (2019). The PVN enhances cardiorespiratory responses to acute hypoxia via input to the nTS. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 317(6), R818–R833. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00135.2019>
- Ryu, Y., Ogata, T., Nagao, M., Sawada, Y., Nishimura, R., & Fujita, N. (2021). Early escitalopram administration as a preemptive treatment strategy against spasticity after contusive spinal cord injury in rats. *Scientific reports*, 11(1), 7120. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85961-5>
- Sabetghadam, A., Korim, W. S., & Verberne, A. J. (2017). Perifornical hypothalamic pathway to the adrenal gland: Role for glutamatergic transmission in the glucose counter-regulatory response. *Autonomic Neuroscience*, 203, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2017.02.002>
- Salomoni, S., van den Hoorn, W., & Hodges, P. (2016). Breathing and Singing: Objective Characterization of Breathing Patterns in Classical Singers. *PloS one*, 11(5), e0155084. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155084>
- Samson, N., Lafond, J. R., Moreau-Bussière, F., Reix, P., & Praud, J. P. (2007). Cricothyroid muscle electrical activity during respiration and apneas in lambs. *Respiratory physiology & neurobiology*, 155(2), 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2006.04.008>

- Samuels, B. C., Zaretsky, D. V., & DiMicco, J. A. (2002). Tachycardia evoked by disinhibition of the dorsomedial hypothalamus in rats is mediated through medullary raphe. *The Journal of physiology*, 538(Pt 3), 941–946. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.013302>
- Saper, C. B., & Loewy, A. D. (1980). Efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain research*, 197(2), 291–317. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(80\)91117-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(80)91117-8)
- Sapir, S., Ramig, L., & Fox, C. (2008). Speech and swallowing disorders in Parkinson disease. *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery*, 16(3), 205–210. <https://doi.org/10.1097/MOO.0b013e3282febd3a>
- Saran, M., Georgakopoulos, B., & Bordoni, B. (2023). Anatomy, Head and Neck, Larynx Vocal Cords. In *StatPearls*. StatPearls Publishing
- Sasaki, C. T., Fukuda, H., & Kirchner, J. A. (1973). Laryngeal abductor activity in response to varying ventilatory resistance. *Transactions - American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology. American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology*, 77(6), ORL403–ORL410.
- Sataloff, R. T., Chowdhury, F., Portnoy, J. E., & otros. (2013). Anatomy and physiology of the voice: A brief overview. En R. T. Sataloff (Ed.), *Surgical techniques in otolaryngology – head and neck surgery: Laryngeal surgery* (1.^a ed., cap. 3, pp. 8–15). New Delhi, India: JP Medical Ltd
- Sato, K. (2018a). Cells and extracellular matrices in the human adult vocal fold mucosa. En *Functional histoanatomy of the human larynx* (pp. 213–228). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5586-7_10
- Sato, K. (2018b). Comparative histoanatomy of the vocal fold mucosa. En *Functional histoanatomy of the human larynx* (pp. 403–417). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5586-7_19
- Sato, K., & Nakashima, T. (2008). Effect of irradiation on the human laryngeal glands. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*, 117(10), 734–739. <https://doi.org/10.1177/000348940811701005>
- Schadt, J. C., & Hasser, E. M. (1998). Hemodynamic effects of acute stressors in the conscious rabbit. *The American journal of physiology*, 274(3), R814–R821. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1998.274.3.R814>
- Schaeuble, D., & Myers, B. (2022). Cortical-Hypothalamic Integration of Autonomic and Endocrine Stress Responses. *Frontiers in physiology*, 13, 820398. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.820398>

- Schottelkotte, K. M., & Crone, S. A. (2022). Forebrain control of breathing: Anatomy and potential functions. *Frontiers in neurology*, *13*, 1041887. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.1041887>
- Schuller, G., & Radtke-Schuller, S. (1990). Neural control of vocalization in bats: mapping of brainstem areas with electrical microstimulation eliciting species-specific echolocation calls in the rufous horseshoe bat. *Experimental brain research*, *79*(1), 192–206. <https://doi.org/10.1007/BF00228889>
- Schünke, M., Schulte, E., & Schumacher, U. (2022). *Prometheus. Texto y Atlas de Anatomía. Tomo 3: Cabeza, cuello y neuroanatomía* (5.^a ed.). Editorial Médica Panamericana. ISBN: 978-84-9110-625-8
- Schwarz, L. A., & Luo, L. (2015). Organization of the locus coeruleus-norepinephrine system. *Current biology: CB*, *25*(21), R1051–R1056. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.09.039>
- Schwarzacher, S. W., Rüb, U., & Deller, T. (2011). Neuroanatomical characteristics of the human pre-Bötzing complex and its involvement in neurodegenerative brainstem diseases. *Brain: a journal of neurology*, *134*(Pt 1), 24–35. <https://doi.org/10.1093/brain/awq327>
- Seppälä, E. M., Nitschke, J. B., Tudorascu, D. L., Hayes, A., Goldstein, M. R., Nguyen, D. T., Perlman, D., & Davidson, R. J. (2014). Breathing-based meditation decreases posttraumatic stress disorder symptoms in U.S. military veterans: a randomized controlled longitudinal study. *Journal of traumatic stress*, *27*(4), 397–405. <https://doi.org/10.1002/jts.21936>
- Serry, M. A., Alzamendi, G. A., Zañartu, M., & Peterson, S. D. (2023). Modeling the influence of the extrinsic musculature on phonation. *Biomechanics and modeling in mechanobiology*, *22*(4), 1365–1378. <https://doi.org/10.1007/s10237-023-01724-3>
- Sévoz-Couche, C., Brouillard, C., Camus, F., Laude, D., De Boer, S. F., Becker, C., & Benoliel, J. J. (2013). Involvement of the dorsomedial hypothalamus and the nucleus tractus solitarius in chronic cardiovascular changes associated with anxiety in rats. *The Journal of physiology*, *591*(7), 1871–1887. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.247791>
- Sharif, A., Matsumoto, J., Chojiljav, C., Badarch, A., Setogawa, T., Nishijo, H., & Nishimaru, H. (2024). Characterization of Ultrasonic Vocalization-Modulated Neurons in Rat Motor Cortex Based on Their Activity Modulation and Axonal Projection to the Periaqueductal Gray. *eNeuro*, *11*(4), ENEURO.0452-23.2024. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0452-23.2024>

- Sheng, M., & Greenberg, M. E. (1990). The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, 4(4), 477–485. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90106-p](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90106-p)
- Sherman, D., Worrell, J. W., Cui, Y., & Feldman, J. L. (2015). Optogenetic perturbation of preBötzing complex inhibitory neurons modulates respiratory pattern. *Nature neuroscience*, 18(3), 408–414. <https://doi.org/10.1038/nn.3938>
- Shi, J., Ye, Q., Zhao, J., Liu, J., Xu, Z., Yi, W., & Xu, N. (2019). EA promotes swallowing via activating swallowing-related motor neurons in the nucleus ambiguus. *Brain research*, 1718, 103–113. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.12.013>
- Shi, Z., Bonillas, A. C., Wong, J., Padilla, S. L., & Brooks, V. L. (2021). Neuropeptide Y suppresses thermogenic and cardiovascular sympathetic nerve activity via Y1 receptors in the paraventricular nucleus and dorsomedial hypothalamus. *Journal of neuroendocrinology*, 33(8), e13006. <https://doi.org/10.1111/jne.13006>
- Shiba, K. (2010). Functions of larynx in breathing, vocalization and airway protective reflexes. En S. M. Brudzynski (Ed.), *Handbook of mammalian vocalization* (pp. 373–381). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374593-4.00034-6>
- Shiba, K., Umezaki, T., Zheng, Y., & Miller, A. D. (1997). The nucleus retroambiguus controls laryngeal muscle activity during vocalization in the cat. *Experimental brain research*, 115(3), 513–519. <https://doi.org/10.1007/pl00005721>
- Shiba, K., Umezaki, T., Zheng, Y., & Miller, A. D. (1997). The nucleus retroambiguus controls laryngeal muscle activity during vocalization in the cat. *Experimental brain research*, 115(3), 513–519. <https://doi.org/10.1007/pl00005721>
- Shin, J. W., Geerling, J. C., & Loewy, A. D. (2008). Inputs to the ventrolateral bed nucleus of the stria terminalis. *The Journal of comparative neurology*, 511(5), 628–657. <https://doi.org/10.1002/cne.21870>
- Shin, J. W., Geerling, J. C., Stein, M. K., Miller, R. L., & Loewy, A. D. (2011). FoxP2 brainstem neurons project to sodium appetite regulatory sites. *Journal of chemical neuroanatomy*, 42(1), 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2011.05.003>
- Shu, W., Cho, J. Y., Jiang, Y., Zhang, M., Weisz, D., Elder, G. A., Schmeidler, J., De Gasperi, R., Sosa, M. A., Rabidou, D., Santucci, A. C., Perl, D., Morrissey, E., & Buxbaum, J. D. (2005). Altered ultrasonic vocalization in mice with a disruption in the Foxp2 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(27), 9643–9648. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503739102>

- Silva, J. N., Lucena, E. V., Silva, T. M., Damasceno, R. S., Takakura, A. C., & Moreira, T. S. (2016). Inhibition of the pontine Kölliker-Fuse nucleus reduces genioglossal activity elicited by stimulation of the retrotrapezoid chemoreceptor neurons. *Neuroscience*, 328, 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.04.028>
- Silva, N. T., Nalivaiko, E., da Silva, L. G., & Haibara, A. S. (2015). Excitatory amino acid receptors in the dorsomedial hypothalamic area contribute to the chemoreflex tachypneic response. *Respiratory physiology & neurobiology*, 212-214, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2015.04.004>
- Silva-Carvalho, L., Dawid-Milner, M. S., & Spyer, K. M. (1995b). The pattern of excitatory inputs to the nucleus tractus solitarii evoked on stimulation in the hypothalamic defence area in the cat. *The Journal of physiology*, 487 (Pt 3) (Pt 3), 727–737. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1995.sp020913>
- Silva-Carvalho, L., Dawid-Milner, M. S., Goldsmith, G. E., & Spyer, K. M. (1995a). Hypothalamic modulation of the arterial chemoreceptor reflex in the anaesthetized cat: role of the nucleus tractus solitarii. *The Journal of physiology*, 487 (Pt 3)(Pt 3), 751–760. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1995.sp020915>
- Silva-Carvalho, L., Dawid-Milner, M. S., Goldsmith, G. E., & Spyer, K. M. (1993). Hypothalamic-evoked effects in cat nucleus tractus solitarius facilitating chemoreceptor reflexes. *Experimental physiology*, 78(3), 425–428. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1993.sp003696>
- Simms, A. E., Paton, J. F., Pickering, A. E., & Allen, A. M. (2009). Amplified respiratory-sympathetic coupling in the spontaneously hypertensive rat: does it contribute to hypertension?. *The Journal of physiology*, 587(3), 597–610. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.165902>
- Simonyan K, Fuertinger S (2015) Speech networks at rest and in action: interactions between functional brain networks controlling speech production. *J Neurophysiol* 113:2967–2978. CrossRef Medline
- Simonyan K. (2014). The laryngeal motor cortex: its organization and connectivity. *Current opinion in neurobiology*, 28, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.05.006>
- Singh, U., Jiang, J., Saito, K., Toth, B. A., Dickey, J. E., Rodeghiero, S. R., Deng, Y., Deng, G., Xue, B., Zhu, Z., Zingman, L. V., Geerling, J. C., & Cui, H. (2022). Neuroanatomical organization and functional roles of PVN MC4R pathways in physiological and behavioral regulations. *Molecular metabolism*, 55, 101401. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101401>

- Smith, J. C., Abdala, A. P., Borgmann, A., Rybak, I. A., & Paton, J. F. (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., 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(6), 3370–3387. <https://doi.org/10.1152/jn.00985.2007>
- Smith, J. C., Abdala, A. P., Rybak, I. A., & Paton, J. F. (2009). Structural and functional architecture of respiratory networks in the mammalian brainstem. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 364(1529), 2577–2587. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0081>
- Smith, J. C., Morrison, D. E., Ellenberger, H. H., Otto, M. R., & Feldman, J. L. (1989). Brainstem projections to the major respiratory neuron populations in the medulla of the cat. *The Journal of comparative neurology*, 281(1), 69–96. <https://doi.org/10.1002/cne.902810107>
- Smith, S. K., Burkhard, T. T., & Phelps, S. M. (2021). A comparative characterization of laryngeal anatomy in the singing mouse. *Journal of anatomy*, 238(2), 308–320. <https://doi.org/10.1111/joa.13315>
- Soltis, R. P., Cook, J. C., Gregg, A. E., Stratton, J. M., & Flickinger, K. A. (1998). EAA receptors in the dorsomedial hypothalamic area mediate the cardiovascular response to activation of the amygdala. *The American journal of physiology*, 275(2), R624–R631. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1998.275.2.R624>
- Song, G., Wang, H., Xu, H., & Poon, C. S. (2012). Kölliker–Fuse neurons send collateral projections to multiple hypoxia-activated and nonactivated structures in rat brainstem and spinal cord. *Brain structure & function*, 217(4), 835–858. <https://doi.org/10.1007/s00429-012-0384-7>
- Song, G., Yu, Y., & Poon, C. S. (2006). Cytoarchitecture of pneumotaxic integration of respiratory and nonrespiratory information in the rat. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(1), 300–310. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3029-05.2006>
- Spyer K. M. (1981). Neural organisation and control of the baroreceptor reflex. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*, 88, 24–124.
- Spyer, K. M., & Gilbey, M. P. (1988). Cardiorespiratory interactions in heart-rate control. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 533, 350–357. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1988.tb37263.x>

- Sruthi, K. V., & Rahul, A. (2024). Application of psychodynamic model in the assessment and management of psychogenic voice disorder: A case report. *International Journal of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery*, *10*(5), 591–594.
- Stanić, D., Dhingra, R. R., & Dutschmann, M. (2018). Expression of the transcription factor FOXP2 in brainstem respiratory circuits of adult rat is restricted to upper-airway pre-motor areas. *Respiratory physiology & neurobiology*, *250*, 14–18. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2018.01.014>
- Staples, M. C., Herman, M. A., Lockner, J. W., Avchalumov, Y., Kharidia, K. M., Janda, K. D., Roberto, M., & Mandyam, C. D. (2021). Isoxazole-9 reduces enhanced fear responses and retrieval in ethanol-dependent male rats. *Journal of neuroscience research*, *99*(11), 3047–3065. <https://doi.org/10.1002/jnr.24932>
- Stella, M. H., & England, S. J. (2001). Modulation of laryngeal and respiratory pump muscle activities with upper airway pressure and flow. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, *91*(2), 897–904. <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.91.2.897>
- Suarez-Roca, H., Mamoun, N., Sigurdson, M. I., & Maixner, W. (2021). Baroreceptor Modulation of the Cardiovascular System, Pain, Consciousness, and Cognition. *Comprehensive Physiology*, *11*(2), 1373–1423. <https://doi.org/10.1002/cphy.c190038>
- Subramanian, H. H., & Holstege, G. (2009). The nucleus retroambiguus control of respiration. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *29*(12), 3824–3832. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0607-09.2009>
- Subramanian, H. H., & Holstege, G. (2011). Midbrain and medullary control of postinspiratory activity of the crural and costal diaphragm in vivo. *Journal of neurophysiology*, *105*(6), 2852–2862. <https://doi.org/10.1152/jn.00168.2011>
- Subramanian, H. H., Balnave, R. J., & Holstege, G. (2008). The midbrain periaqueductal gray control of respiration. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *28*(47), 12274–12283. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4168-08.2008>
- Subramanian, H. H., Balnave, R. J., & Holstege, G. (2021). Microstimulation in Different Parts of the Periaqueductal Gray Generates Different Types of Vocalizations in the Cat. *Journal of voice: official journal of the Voice Foundation*, *35*(5), 804.e9–804.e25. <https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2020.01.022>
- Subramanian, H. H., Huang, Z. G., Silburn, P. A., Balnave, R. J., & Holstege, G. (2018). The physiological motor patterns produced by neurons in the nucleus retroambiguus in the rat and their modulation by vagal, peripheral chemosensory, and nociceptive

- stimulation. *The Journal of comparative neurology*, 526(2), 229–242. <https://doi.org/10.1002/cne.24318>
- Suess, W. M., Alexander, A. B., Smith, D. D., Sweeney, H. W., & Marion, R. J. (1980). The effects of psychological stress on respiration: a preliminary study of anxiety and hyperventilation. *Psychophysiology*, 17(6), 535–540. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8986.1980.tb02293.x>
- Sugiyama, Y., Shiba, K., Nakazawa, K., Suzuki, T., & Hisa, Y. (2010). Brainstem vocalization area in guinea pigs. *Neuroscience research*, 66(4), 359–365. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2009.12.006>
- Švec, J. G., Schutte, H. K., Chen, C. J., & Titze, I. R. (2023). Integrative Insights into the Myoelastic-Aerodynamic Theory and Acoustics of Phonation. Scientific Tribute to Donald G. Miller. *Journal of voice: official journal of the Voice Foundation*, 37(3), 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2021.01.023>
- Szulczewski M. T. (2019). Training of paced breathing at 0.1 Hz improves CO2 homeostasis and relaxation during a paced breathing task. *PloS one*, 14(6), e0218550. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218550>
- Takahashi, K., Liu, F. C., Hirokawa, K., & Takahashi, H. (2003). Expression of Foxp2, a gene involved in speech and language, in the developing and adult striatum. *Journal of neuroscience research*, 73(1), 61–72. <https://doi.org/10.1002/jnr.10638>
- Tan, E., & Dampney, R. A. (1983). Cardiovascular effects of stimulation of neurones within the 'defence area' of the hypothalamus and midbrain of the rabbit. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 10(3), 299–303. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1983.tb00201.x>
- Tan, W., Janczewski, W. A., Yang, P., Shao, X. M., Callaway, E. M., & Feldman, J. L. (2008). Silencing preBötzing complex somatostatin-expressing neurons induces persistent apnea in awake rat. *Nature neuroscience*, 11(5), 538–540. <https://doi.org/10.1038/nn.2104>
- Tan, W., Pagliardini, S., Yang, P., Janczewski, W. A., & Feldman, J. L. (2010). Projections of preBötzing complex neurons in adult rats. *The Journal of comparative neurology*, 518(10), 1862–1878. <https://doi.org/10.1002/cne.22308>
- Tang, Q., Godschall, E., Brennan, C. D., Zhang, Q., Abraham-Fan, R. J., Williams, S. P., Güngül, T. B., Onoharigho, R., Buyukaksakal, A., Salinas, R., Sajonia, I. R., Olivieri, J. J., Calhan, O. Y., Deppmann, C. D., Campbell, J. N., Podyma, B., & Güler, A. D. (2023). Leptin receptor neurons in the dorsomedial hypothalamus input to the

- circadian feeding network. *Science advances*, 9(34), eadh9570. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adh9570>
- Taughner, R. J., Ghobbeh, A., Sowers, L. P., Fan, R., & Wemmie, J. A. (2015). ASIC1A in the bed nucleus of the stria terminalis mediates TMT-evoked freezing. *Frontiers in neuroscience*, 9, 239. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00239>
- Taughner, R. J., Lu, Y., Wang, Y., Kreple, C. J., Ghobbeh, A., Fan, R., Sowers, L. P., & Wemmie, J. A. (2014). The bed nucleus of the stria terminalis is critical for anxiety-related behavior evoked by CO₂ and acidosis. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 34(31), 10247–10255. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1680-14.2014>
- ter Horst, G. J., & Luiten, P. G. (1986). The projections of the dorsomedial hypothalamic nucleus in the rat. *Brain research bulletin*, 16(2), 231–248. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(86\)90038-9](https://doi.org/10.1016/0361-9230(86)90038-9)
- Tezcaner, Z. Ç., Gökmen, M. F., Yıldırım, S., & Dursun, G. (2019). Clinical Features of Psychogenic Voice Disorder and the Efficiency of Voice Therapy and Psychological Evaluation. *Journal of voice: official journal of the Voice Foundation*, 33(2), 250–254. <https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2017.09.022>
- Thomas, L. B., Joseph, G. L., Adkins, T. D., Andrade, F. H., & Stemple, J. C. (2008). Laryngeal muscles are spared in the dystrophin deficient mdx mouse. *Journal of speech, language, and hearing research: JSLHR*, 51(3), 586–595. [https://doi.org/10.1044/1092-4388\(2008/042\)](https://doi.org/10.1044/1092-4388(2008/042))
- Thomas, L. B., Stemple, J. C., Andreatta, R. D., & Andrade, F. H. (2009). Establishing a new animal model for the study of laryngeal biology and disease: an anatomic study of the mouse larynx. *Journal of speech, language, and hearing research: JSLHR*, 52(3), 802–811. [https://doi.org/10.1044/1092-4388\(2008/08-0087\)](https://doi.org/10.1044/1092-4388(2008/08-0087))
- Thompson, R. H., & Swanson, L. W. (1998). Organization of inputs to the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a reexamination with Fluorogold and PHAL in the rat. *Brain research. Brain research reviews*, 27(2), 89–118. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(98\)00010-1](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(98)00010-1)
- Thompson, R. H., Canteras, N. S., & Swanson, L. W. (1996). Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHA-L study in the rat. *The Journal of comparative neurology*, 376(1), 143–173. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19961202\)376:1<143::AID-CNE9>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19961202)376:1<143::AID-CNE9>3.0.CO;2-3)

- Thompson, R. H., Canteras, N. S., & Swanson, L. W. (1996). Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHA-L study in the rat. *The Journal of comparative neurology*, 376(1), 143–173. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19961202\)376:1<143::AID-CNE9>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19961202)376:1<143::AID-CNE9>3.0.CO;2-3)
- Tian, G. F., Peever, J. H., & Duffin, J. (1998). Bötzinger-complex expiratory neurons monosynaptically inhibit phrenic motoneurons in the decerebrate rat. *Experimental brain research*, 122(2), 149–156. <https://doi.org/10.1007/s002210050502>
- Tokita, K., Inoue, T., & Boughter, J. D., Jr (2010). Subnuclear organization of parabrachial efferents to the thalamus, amygdala and lateral hypothalamus in C57BL/6J mice: a quantitative retrograde double labeling study. *Neuroscience*, 171(1), 351–365. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.08.026>
- Toor, R. U. A. S., Sun, Q. J., Kumar, N. N., Le, S., Hildreth, C. M., Phillips, J. K., & McMullan, S. (2019). Neurons in the Intermediate Reticular Nucleus Coordinate Postinspiratory Activity, Swallowing, and Respiratory-Sympathetic Coupling in the Rat. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 39(49), 9757–9766. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0502-19.2019>
- Torres Gallardo, B., & Ferrán Gimeno, P. (2008). *Anatomía de la voz*. Editorial Paidotribo.
- Torres-Tamayo, N., García-Martínez, D., Lois Ziolniski, S., Torres-Sánchez, I., García-Río, F., & Bastir, M. (2018). 3D analysis of sexual dimorphism in size, shape and breathing kinematics of human lungs. *Journal of anatomy*, 232(2), 227–237. <https://doi.org/10.1111/joa.12743>
- Traser, L., Burk, F., Özen, A. C., Burdumy, M., Bock, M., Blaser, D., Richter, B., & Echternach, M. (2020). Respiratory kinematics and the regulation of subglottic pressure for phonation of pitch jumps - a dynamic MRI study. *PloS one*, 15(12), e0244539. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244539>
- Trevizan-Baú, P., Dhingra, R. R., Furuya, W. I., Stanić, D., Mazzone, S. B., & Dutschmann, M. (2021a). Forebrain projection neurons target functionally diverse respiratory control areas in the midbrain, pons, and medulla oblongata. *The Journal of comparative neurology*, 529(9), 2243–2264. <https://doi.org/10.1002/cne.25091>
- Trevizan-Baú, P., Furuya, W. I., Mazzone, S. B., Stanić, D., Dhingra, R. R., & Dutschmann, M. (2021b). Reciprocal connectivity of the periaqueductal gray with the ponto-medullary respiratory network in rat. *Brain research*, 1757, 147255. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.147255>

- Tsang, E., Orlandini, C., Sureka, R., Crevenna, A. H., Perlas, E., Pranker, I., Masferrer, M. E., & Gross, C. T. (2023). Induction of flight via midbrain projections to the cuneiform nucleus. *PloS one*, *18*(2), e0281464. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281464>
- Tschida, K., Michael, V., Takatoh, J., Han, B. X., Zhao, S., Sakurai, K., Mooney, R., & Wang, F. (2019). A Specialized Neural Circuit Gates Social Vocalizations in the Mouse. *Neuron*, *103*(3), 459–472.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.05.025>
- Tupal, S., Rieger, M. A., Ling, G. Y., Park, T. J., Dougherty, J. D., Goodchild, A. K., & Gray, P. A. (2014). Testing the role of preBötzing Complex somatostatin neurons in respiratory and vocal behaviors. *The European journal of neuroscience*, *40*(7), 3067–3077. <https://doi.org/10.1111/ejn.12669>
- Turner, S. J., Hildebrand, M. S., Block, S., Damiano, J., Fahey, M., Reilly, S., Bahlo, M., Scheffer, I. E., & Morgan, A. T. (2013). Small intragenic deletion in FOXP2 associated with childhood apraxia of speech and dysarthria. *American journal of medical genetics. Part A*, *161A*(9), 2321–2326. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36055>
- Uludag, M., Aygun, N., Kartal, K., Besler, E., & Isgor, A. (2017). Innervation of the human posterior cricoarytenoid muscle by the external branch of the superior laryngeal nerve. *Head & neck*, *39*(11), 2200–2207. <https://doi.org/10.1002/hed.24896>
- Umans, B. D., & Liberles, S. D. (2018). Neural Sensing of Organ Volume. *Trends in neurosciences*, *41*(12), 911–924. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.07.008>
- Usui, N., Co, M., Harper, M., Rieger, M. A., Dougherty, J. D., & Konopka, G. (2017). Sumoylation of FOXP2 Regulates Motor Function and Vocal Communication Through Purkinje Cell Development. *Biological psychiatry*, *81*(3), 220–230. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.02.008>
- Vahabzadeh-Hagh, A. M., Zhang, Z., & Chhetri, D. K. (2018). Hirano's cover-body model and its unique laryngeal postures revisited. *The Laryngoscope*, *128*(6), 1412–1418. <https://doi.org/10.1002/lary.27000>
- Vallin, E., Mostaert, B., Thayer, E., Cho, H., Hoffman, M. R., Cassell, M., & Van Daele, D. (2025). FOXP2 Expression in Rodent, Rhesus Monkey, and Human Brainstem. *Journal of speech, language, and hearing research: JSLHR*, *68*(9), 4177–4187. https://doi.org/10.1044/2025_JSLHR-24-00332
- VAN DEN BERG J. (1958). Myoelastic-aerodynamic theory of voice production. *Journal of speech and hearing research*, *1*(3), 227–244. <https://doi.org/10.1044/jshr.0103.227>

- Van Houtte, E., Van Lierde, K., & Claeys, S. (2011). Pathophysiology and treatment of muscle tension dysphonia: a review of the current knowledge. *Journal of voice: official journal of the Voice Foundation*, 25(2), 202–207. <https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2009.10.009>
- Vanderhorst, V. G., Terasawa, E., Ralston, H. J., 3rd, & Holstege, G. (2000). Monosynaptic projections from the lateral periaqueductal gray to the nucleus retroambiguus in the rhesus monkey: implications for vocalization and reproductive behavior. *The Journal of comparative neurology*, 424(2), 251–268. [https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20000821\)424:2<251::aid-cne5>3.0.co;2-d](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20000821)424:2<251::aid-cne5>3.0.co;2-d)
- Vann, S. D., & Nelson, A. J. (2015). The mammillary bodies and memory: more than a hippocampal relay. *Progress in brain research*, 219, 163–185. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2015.03.006>
- Varga, A. G., Maletz, S. N., Bateman, J. T., Reid, B. T., & Levitt, E. S. (2021). Neurochemistry of the Kölliker-Fuse nucleus from a respiratory perspective. *Journal of neurochemistry*, 156(1), 16–37. <https://doi.org/10.1111/jnc.15041>
- Vargha-Khadem, F., Watkins, K. E., Price, C. J., Ashburner, J., Alcock, K. J., Connelly, A., Frackowiak, R. S., Friston, K. J., Pembrey, M. E., Mishkin, M., Gadian, D. G., & Passingham, R. E. (1998). Neural basis of an inherited speech and language disorder. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(21), 12695–12700. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.21.12695>
- Vázquez-León, P., Miranda-Páez, A., Valencia-Flores, K., & Sánchez-Castillo, H. (2023). Defensive and Emotional Behavior Modulation by Serotonin in the Periaqueductal Gray. *Cellular and molecular neurobiology*, 43(4), 1453–1468. <https://doi.org/10.1007/s10571-022-01262-z>
- Veerakumar, A., Head, J. P., & Krasnow, M. A. (2023). A brainstem circuit for phonation and volume control in mice. *Nature neuroscience*, 26(12), 2122–2130. <https://doi.org/10.1038/s41593-023-01478-2>
- Vernes, S. C., Oliver, P. L., Spiteri, E., Lockstone, H. E., Puliyadi, R., Taylor, J. M., Ho, J., Mombereau, C., Brewer, A., Lowy, E., Nicod, J., Groszer, M., Baban, D., Sahgal, N., Cazier, J. B., Ragoussis, J., Davies, K. E., Geschwind, D. H., & Fisher, S. E. (2011). Foxp2 regulates gene networks implicated in neurite outgrowth in the developing brain. *PLoS genetics*, 7(7), e1002145. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002145>
- Vianna, D. M., & Brandão, M. L. (2003). Anatomical connections of the periaqueductal gray: specific neural substrates for different kinds of fear. *Brazilian journal of medical and biological research*, 36(5), 557–566. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2003000500002>

- von Euler, C., Marttila, I., Remmers, J. E., & Trippenbach, T. (1976). Effects of lesions in the parabrachial nucleus on the mechanisms for central and reflex termination of inspiration in the cat. *Acta physiologica Scandinavica*, 96(3), 324–337. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1976.tb10203.x>
- Wadie, M., Adam, S. I., & Sasaki, C. T. (2013). Development, anatomy, and physiology of the larynx. En R. Shaker, P. Belafsky, G. Postma, & C. Easterling (Eds.), *Principles of deglutition* (pp. 175–197). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3794-9_13
- Waldrop, T. G., Bauer, R. M., & Iwamoto, G. A. (1988). Microinjection of GABA antagonists into the posterior hypothalamus elicits locomotor activity and a cardiorespiratory activation. *Brain research*, 444(1), 84–94. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)90916-x](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)90916-x)
- Wallén-Mackenzie, A., Gezelius, H., Thoby-Brisson, M., Nygård, A., Enjin, A., Fujiyama, F., Fortin, G., & Kullander, K. (2006). Vesicular glutamate transporter 2 is required for central respiratory rhythm generation but not for locomotor central pattern generation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(47), 12294–12307. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3855-06.2006>
- Wang, H., Li, S., & Kirouac, G. J. (2017). Role of the orexin (hypocretin) system in contextual fear conditioning in rats. *Behavioural brain research*, 316, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.08.052>
- 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. *Canadian respiratory journal*, 2018, 2157974. <https://doi.org/10.1155/2018/2157974>
- Wang, X. L., Wang, J. X., Chen, J. L., Hao, W. Y., Xu, W. Z., Xu, Z. Q., Jiang, Y. T., Luo, P. Q., Chen, Q., Li, Y. H., Zhu, G. Q., & Li, X. Z. (2022). Asprosin in the Paraventricular Nucleus Induces Sympathetic Activation and Pressor Responses via cAMP-Dependent ROS Production. *International journal of molecular sciences*, 23(20), 12595. <https://doi.org/10.3390/ijms232012595>
- Wang, Y., Song, Y., Tong, L., Wang, L., Cao, J., Qin, G., Liu, X., Mi, W., Wang, E., & Guo, Y. (2022). GABAergic neurons in the dorsomedial hypothalamus regulate states of consciousness in sevoflurane anesthesia. *iScience*, 26(1), 105913. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105913>
- Watson, A. H., Williams, C., & James, B. V. (2012). Activity patterns in latissimus dorsi and sternocleidomastoid in classical singers. *Journal of voice: official journal of the Voice Foundation*, 26(3), e95–e105. <https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2011.04.008>

- Weissbrod, P., Pitman, M. J., Sharma, S., Bender, A., & Schaefer, S. D. (2011). Quantity and three-dimensional position of the recurrent and superior laryngeal nerve lower motor neurons in a rat model. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*, *120*(11), 761–768. <https://doi.org/10.1177/000348941112001111>
- Welch, J. F., Kipp, S., & Sheel, A. W. (2019). Respiratory muscles during exercise: mechanics, energetics, and fatigue. *Current Opinion in Physiology*, *10*, 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2019.04.023>
- Wiedenmayer, C. P., Goodwin, G. A., & Barr, G. A. (2000). The effect of periaqueductal gray lesions on responses to age-specific threats in infant rats. *Brain research. Developmental brain research*, *120*(2), 191–198. [https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(00\)00009-2](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(00)00009-2)
- Wild, B., Rodden, F. A., Grodd, W., & Ruch, W. (2003). Neural correlates of laughter and humour. *Brain: a journal of neurology*, *126*(Pt 10), 2121–2138. <https://doi.org/10.1093/brain/awg226>
- Winter, P., Handley, P., Ploog, D., & Schott, D. (1973). Ontogeny of squirrel monkey calls under normal conditions and under acoustic isolation. *Behaviour*, *47*(3), 230–239. <https://doi.org/10.1163/156853973x00085>
- Woodson, G. E. (2016). Neurologic control of the larynx. En G. W. Randolph (Ed.), *The recurrent and superior laryngeal nerves* (pp. 33–48). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27727-1_3
- Wu, J., Capelli, P., Bouvier, J., Goulding, M., Arber, S., & Fortin, G. (2017). A V0 core neuronal circuit for inspiration. *Nature communications*, *8*(1), 544. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00589-2>
- Xavier, C. H., Ianzer, D., Lima, A. M., Marins, F. R., Pedrino, G. R., Vaz, G., Menezes, G. B., Nalivaiko, E., & Fontes, M. A. (2014). Excitatory amino acid receptors mediate asymmetry and lateralization in the descending cardiovascular pathways from the dorsomedial hypothalamus. *PloS one*, *9*(11), e112412. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112412>
- Xia, L., Liu, H. Y., Wang, B. Y., Lin, H. N., Wang, M. C., & Ren, J. X. (2023). A review of physiological functions of orexin: From instinctive responses to subjective cognition. *Medicine*, *102*(26), e34206. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000034206>
- Xie, Y., & Dorsky, R. I. (2017). Development of the hypothalamus: conservation, modification and innovation. *Development (Cambridge, England)*, *144*(9), 1588–1599. <https://doi.org/10.1242/dev.139055>

- Yackle, K., Schwarz, L. A., Kam, K., Sorokin, J. M., Huguenard, J. R., Feldman, J. L., Luo, L., & Krasnow, M. A. (2017). Breathing control center neurons that promote arousal in mice. *Science*, *355*(6332), 1411–1415. <https://doi.org/10.1126/science.aai7984>
- Yamashita, M., Bless, D. M., & Welham, N. V. (2010). Morphological and extracellular matrix changes following vocal fold injury in mice. *Cells, tissues, organs*, *192*(4), 262–271. <https://doi.org/10.1159/000315476>
- Yang, B., Sanches-Padilla, J., Kondapalli, J., Morison, S. L., Delpire, E., Awatramani, R., & Surmeier, D. J. (2021). Locus coeruleus anchors a trisynaptic circuit controlling fear-induced suppression of feeding. *Neuron*, *109*(5), 823–838.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.12.023>
- Yang, C. F., & Feldman, J. L. (2018). Efferent projections of excitatory and inhibitory preBötzinger Complex neurons. *The Journal of comparative neurology*, *526*(8), 1389–1402. <https://doi.org/10.1002/cne.24415>
- Yang, C. F., Kim, E. J., Callaway, E. M., & Feldman, J. L. (2020). Monosynaptic Projections to Excitatory and Inhibitory preBötzinger Complex Neurons. *Frontiers in neuroanatomy*, *14*, 58. <https://doi.org/10.3389/fnana.2020.00058>
- Yang, L., Scott, K. A., Hyun, J., Tamashiro, K. L., Tray, N., Moran, T. H., & Bi, S. (2009). Role of dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y in modulating food intake and energy balance. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *29*(1), 179–190. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4379-08.2009>
- Yang, W. Z., Xie, H., Du, X., Zhou, Q., Xiao, Y., Zhao, Z., Jia, X., Xu, J., Zhang, W., Cai, S., Li, Z., Fu, X., Hua, R., Cai, J., Chang, S., Sun, J., Sun, H., Xu, Q., Ni, X., Tu, H., ... Shen, W. L. (2023). A parabrachial-hypothalamic parallel circuit governs cold defense in mice. *Nature communications*, *14*(1), 4924. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40504-6>
- Yardley, C. P., & Hilton, S. M. (1986). The hypothalamic and brainstem areas from which the cardiovascular and behavioural components of the defence reaction are elicited in the rat. *Journal of the autonomic nervous system*, *15*(3), 227–244. [https://doi.org/10.1016/0165-1838\(86\)90066-4](https://doi.org/10.1016/0165-1838(86)90066-4)
- Yeziarski R. P. (1988). Spinomesencephalic tract: projections from the lumbosacral spinal cord of the rat, cat, and monkey. *The Journal of comparative neurology*, *267*(1), 131–146. <https://doi.org/10.1002/cne.902670109>
- Yokota, S., Kaur, S., VanderHorst, V. G., Saper, C. B., & Chamberlin, N. L. (2015). Respiratory-related outputs of glutamatergic, hypercapnia-responsive parabrachial

- neurons in mice. *The Journal of comparative neurology*, 523(6), 907–920. <https://doi.org/10.1002/cne.23720>
- Yokota, S., Oka, T., Asano, H., & Yasui, Y. (2016). Orexinergic fibers are in contact with Kölliker-Fuse nucleus neurons projecting to the respiration-related nuclei in the medulla oblongata and spinal cord of the rat. *Brain research*, 1648(Pt A), 512–523. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.08.020>
- Yokota, S., Oka, T., Tsumori, T., Nakamura, S., & Yasui, Y. (2007). Glutamatergic neurons in the Kölliker-Fuse nucleus project to the rostral ventral respiratory group and phrenic nucleus: a combined retrograde tracing and in situ hybridization study in the rat. *Neuroscience research*, 59(3), 341–346. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2007.08.004>
- Yoshida, K., McCormack, S., España, R. A., Crocker, A., & Scammell, T. E. (2006). Afferents to the orexin neurons of the rat brain. *The Journal of comparative neurology*, 494(5), 845–861. <https://doi.org/10.1002/cne.20859>
- Yoshida, Y., Yatake, K., Tanaka, Y., Imamura, R., Fukunaga, H., Nakashima, T., & Hirano, M. (1998). Morphological observation of laryngeal motoneurons by means of cholera toxin B subunit tracing technique. *Acta oto-laryngologica. Supplementum*, 539, 98–105. <https://doi.org/10.1080/00016489850182242>
- Yu, H., Shi, L., Chen, J., Jun, S., Hao, Y., Wang, S., Fu, C., Zhang, X., Lu, H., Wang, S., & Yuan, F. (2022). A Neural Circuit Mechanism Controlling Breathing by Leptin in the Nucleus Tractus Solitarii. *Neuroscience bulletin*, 38(2), 149–165. <https://doi.org/10.1007/s12264-021-00742-4>
- Yue, Z., Zhang, Y., Zhang, W., Zheng, N., Wen, J., Ren, L., Rong, X., Bai, L., Wang, R., Zhao, S., Liu, E., & Wang, W. (2025). Kaempferol alleviates myocardial ischemia injury by reducing oxidative stress via the HDAC3-mediated Nrf2 signaling pathway. *Journal of advanced research*, 75, 755–764. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2024.10.037>
- Zafar, T., Brouillard, C., Lanfumey, L., & Sévoz-Couche, C. (2018). A hypothalamo-midbrain-medullary pathway involved in the inhibition of the respiratory chemoreflex response induced by potassium cyanide in rodents. *Neuropharmacology*, 128, 152–167. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.09.036>
- Zahner, M. R., Hillard, K. J., & Chandley, M. C. (2024). The role of the dorsomedial hypothalamus in the cardiogenic sympathetic reflex in the Sprague Dawley rat. *Frontiers in physiology*, 15, 1479892. <https://doi.org/10.3389/fphys.2024.1479892>
- Zhang Z. (2016). Mechanics of human voice production and control. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 140(4), 2614. <https://doi.org/10.1121/1.4964509>

- Zhang, C. K., Li, Z. H., Qiao, Y., Zhang, T., Lu, Y. C., Chen, T., Dong, Y. L., Li, Y. Q., & Li, J. L. (2018). VGLUT1 or VGLUT2 mRNA-positive neurons in spinal trigeminal nucleus provide collateral projections to both the thalamus and the parabrachial nucleus in rats. *Molecular brain*, *11*(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s13041-018-0362-y>
- Zhang, H., Zhu, Z., Ma, W. X., Kong, L. X., Yuan, P. C., Bu, L. F., Han, J., Huang, Z. L., & Wang, Y. Q. (2024). The contribution of periaqueductal gray in the regulation of physiological and pathological behaviors. *Frontiers in neuroscience*, *18*, 1380171. <https://doi.org/10.3389/fnins.2024.1380171>
- Zhang, J., Webb, D. M., & Podlaha, O. (2002). Accelerated protein evolution and origins of human-specific features: *Foxp2* as an example. *Genetics*, *162*(4), 1825–1835. <https://doi.org/10.1093/genetics/162.4.1825>
- Zhang, S. P., Bandler, R., & Davis, P. J. (1995). Brain stem integration of vocalization: role of the nucleus retroambiguus. *Journal of neurophysiology*, *74*(6), 2500–2512. <https://doi.org/10.1152/jn.1995.74.6.2500>
- Zhang, S. P., Davis, P. J., Bandler, R., & Carrive, P. (1994). Brain stem integration of vocalization: role of the midbrain periaqueductal gray. *Journal of neurophysiology*, *72*(3), 1337–1356. <https://doi.org/10.1152/jn.1994.72.3.1337>
- Zhang, W., Zhang, N., Sakurai, T., & Kuwaki, T. (2009). Orexin neurons in the hypothalamus mediate cardiorespiratory responses induced by disinhibition of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis. *Brain research*, *1262*, 25–37. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.01.022>
- Zhao, Y., Zhao, Z., Zhang, D., Han, Y., Dionigi, G., & Sun, H. (2021). Improving classification of the external branch of the superior laryngeal nerve with neural monitoring: a research appraisal and narrative review. *Gland surgery*, *10*(9), 2847–2860. <https://doi.org/10.21037/gs-21-518>
- Zheng, Y., Riche, D., Rekling, J. C., Foutz, A. S., & Denavit-Saubié, M. (1998). Brainstem neurons projecting to the rostral ventral respiratory group (VRG) in the medulla oblongata of the rat revealed by co-application of NMDA and biocytin. *Brain research*, *782*(1-2), 113–125. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(97\)01251-1](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(97)01251-1)
- Zoccal, D. B., Bonagamba, L. G., Oliveira, F. R., Antunes-Rodrigues, J., & Machado, B. H. (2007). Increased sympathetic activity in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *Experimental physiology*, *92*(1), 79–85. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2006.035501>
- Zoccal, D. B., Bonagamba, L. G., Paton, J. F., & Machado, B. H. (2009). Sympathetic-mediated hypertension of awake juvenile rats submitted to chronic intermittent

- hypoxia is not linked to baroreflex dysfunction. *Experimental physiology*, 94(9), 972–983. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2009.048306>
- Zoccal, D. B., Furuya, W. I., Bassi, M., Colombari, D. S., & Colombari, E. (2014). The nucleus of the solitary tract and the coordination of respiratory and sympathetic activities. *Frontiers in physiology*, 5, 238. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00238>
- Zoccal, D. B., Silva, J. N., Barnett, W. H., Lemes, E. V., Falquetto, B., Colombari, E., Molkov, Y. I., Moreira, T. S., & 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>
- Zuperku, E. J., Stucke, A. G., Hopp, F. A., & Stuth, E. A. (2017). Characteristics of breathing rate control mediated by a subregion within the pontine parabrachial complex. *Journal of neurophysiology*, 117(3), 1030–1042. <https://doi.org/10.1152/jn.00591.2016>
- Zuperku, E. J., Stucke, A. G., Krolikowski, J. G., Tomlinson, J., Hopp, F. A., & Stuth, E. A. (2019). Inputs to medullary respiratory neurons from a pontine subregion that controls breathing frequency. *Respiratory physiology & neurobiology*, 265, 127–140. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2018.06.011>



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

ANEXOS |

X. ANEXOS

Anexo I. Material y equipamiento para técnicas de inmunomarcaje

Agitador basculante: modelo Polymax 1040 (ángulo de inclinación de 5°). Peso: 8 kg. Rango de velocidades de rotación: 2 - 50 rpm. Dimensiones (An./P./Al.) 320 x 375 x 195 mm.

Agitador magnético: modelo Agimatic-N con calefacción. J.P. SELECTA®. Velocidad (rpm): 60 - 1.600. Vol. agitación (l): Hasta 10. Temp. (°C): Hasta 350. Material: Acero inoxidable. Ø plato (mm): 145. Dimensiones (mm): 190x145x260. Consumo (W): 550. Peso (Kg): 3,2

Balanza: modelo: PL 202-S (Mettler Toledo). Peso máximo: 210 gramos, d = 0.01 gramos repetible (desviación est.) = 0.008 mg. Dimensiones: 19.4 cm de ancho x 22.5 cm de profundo x 6.7 cm de alto. Peso: 3 1/2 lbs.

Bomba peristáltica: modelo G628-1 (alimentación 100–240 V), equipada con un cabezal de tres rodillos y un sistema de dosificación de velocidad ajustable, con un rango de flujo de 4 a 18 ml/min (modelo G628-1-1). Este dispositivo permitió un control preciso y continuo del volumen perfundido.

Cabina de filtración de gases: modelo CRUMA 990 Clase 2. Volumen interior: 0.361m³. Volumen medio de aire tratado/hora: 160 m³/h.

Cámara: modelo VS-XM10 (monocromo, CCD 2/3", 1376 x 1032 píxel, tamaño de píxel 6,45 x 6,45 micras, 14 bits por canal, conexión Firewire)

Estufa de calentamiento y secado: modelo: UN30 Memmert®. Medidas: 400 x 320 x 250 mm. Voltaje: 230 V, 50/60 Hz aprox. 1600 W.

Medidor pH: modelo BASIC 20 (CRISON). Peso: 800 g. Dimensiones: 325 x 155 x 98 mm.

Microbalanza: modelo AB54-S/FACT (Mettler Toledo), Classic Plus.

Microscopio Confocal de fluorescencia: Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Alemania)

Objetivos: PLAN AP 2x/0.08, UPLSAPO10x/0.4, UPLSAPO20x/0.75, UPLSAPO40x/0.9, UPLSAPO60x/1,35 inmersión en aceite.

Pletina motorizada X, Y: rango de movimiento:155.5mm(X)x 85.5mm(Y), Pitch 4mm.

Revolver motorizado, set de polarización, condensador motorizado.

Sistema óptico: BX61VS.

Software ImageJ (NIH): analizador de bioimágenes utilizado para el procesamiento, análisis y cuantificación de imágenes en campo claro y oscuro.

Software Leica LAS X LS (Leica Microsystems): para la captura y análisis de imágenes en campo oscuro.

Software VS (Olympus): para la adquisición y procesamiento de imágenes en campo claro.

Vibratomo (5100mz Campdent Instrument): Microtomo de cuchilla vibrante de corte automático.

Vórtex: MS2 (minishaker) IKA®. Voltaje: 230V, 50-60Hz. Potencia: 31W. Frecuencia de agitación: 0 – 2500 1/min. Dimensiones plato (∅): 7 cm. Dimensiones (w) x (D) x (H): 11.5 x 23 x 8cm.

Anexo II. Material y equipamiento para estudio neurofuncional

Amplificador de audio: modelo NL 120 (Neurolog). Se utilizó para convertir las señales de las descargas de potenciales de acción extracelular (PAE) y el ritmo cardíaco en sonidos audibles, facilitando su observación en tiempo real en los estudios de registro de la actividad neuronal.

Amplificador diferencial: modelo DP-311-00 (ADInstruments). Preamplificador de señal con un cabezal que se usó para la adquisición y monitorización detallada de señales neuronales durante la experimentación.

Amplificadores: para la medición de la presión pleural y el flujo respiratorio, se empleó el amplificador modelo S72-25 de Coulbourn Instruments, con un rango máximo de entrada de 10 mV, una resistencia de entrada de 1010 Ω , y una impedancia de salida de 50 Ω . Por otro lado, para registrar la presión arterial, se usó el bioamplificador modelo FE117 de ADInstruments, que presentaba una impedancia de entrada mayor a 10k Ω a 400 Hz AC.

Bomba microinyectora: modelo micro4™ (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, EE.UU.). Ofreció la posibilidad de realizar microinyecciones precisas de 50 nL, usando para ello una jeringa Hamilton 1.0 μ l 7001 Knurled Hub (KH) Neuros Syringe

Convertidor analógico/digital: modelo ML870 Powerlab 8/30 (ADInstruments). Un sistema avanzado con 8 canales de entrada, resolución de 16 bits y capacidad de muestreo de hasta 200.000 muestras por segundo, con 4 entradas diferenciales POD/BNC y 4 entradas BNC de un solo extremo.

Electrodos de estimulación bipolares: SNE 100 (Rhodes Medical Electrodes). Se usaron para llevar a cabo los experimentos de estimulación eléctrica.

Electrodos de plata: modelo ESW-F15N (Warner Instruments). Se usaron para el registro neuronal.

Electrodos de tungsteno: modelo 5760 (A.M. System) con una impedancia D.C. 8-11 M). Se usaron para el registro de la actividad neuronal.

Generador de onda cuadrada: modelo SEN-3201 (Nihon). Proporcionaba impulsos eléctricos con el fin de estimular células neuronales mediante el uso de microelectrodos de estimulación.

Grabador-reproductor de señales digitales: modelo D211EM (JVC-VHS) diseñado para trabajar con cintas E-180 VHS de TDK. Este dispositivo permitió tanto la grabación como la reproducción de señales digitales en formato VHS.

Medidor/controlador de caudal másico de gas por efecto térmico: modelo Hi-Tec F-201CV-AGD-22-V (Bronkhorst). Se utilizó para asegurar un flujo constante de aire artificial, a una temperatura de 36-37°C y a un rango de caudal de 30 a 70 ml/min, a través de la cánula laríngea y en dirección de la glotis. Todo ello, con la intención de garantizar las condiciones fisiológicas.

Mesa antivibratoria de gas: modelo TMC sys 63530. Absorbe vibraciones mecánicas del entorno que pueden interferir en el correcto registro de las variables electrofisiológicas durante el registro neuronal.

Microposicionador electrohidráulico: modelo 607-W (David Kopf Instruments), con un recorrido mínimo de 1µm. Fue fundamental para la inserción de los microelectrodos y microjeringas en las regiones encefálicas que se querían estimular.

Microscopio quirúrgico: modelo M-300 (Leica). Se utilizó para garantizar una correcta visualización durante todo el procedimiento quirúrgico.

Neumotacógrafo: modelo Fleisch (00) (sensibilidad de 11.25 ml/s equivalente a 1 mmH₂O). Se usó para medir el flujo respiratorio al conectarse directamente con la cánula traqueal en una dirección caudal. Este dispositivo estaba acoplado a un transductor de presión diferencial que convertía el gradiente de presión en una medida del flujo de aire. A través de este sistema, se obtuvieron variaciones cíclicas que reflejaban las fases de la respiración, incluyendo dos puntos de flujo cero (final de la inspiración y de la espiración) y dos puntos de máxima deflexión (flujo máximo inspiratorio y espiratorio) en cada ciclo respiratorio.

Osciloscopio analógico: modelo 5112 (Tektronik). Al ser capaz de operar con hasta cinco canales simultáneamente, se utilizó para observar en tiempo real el flujo respiratorio, la presión arterial y la presión pleural. Además, el dispositivo facilitó la visualización simultánea del flujo respiratorio y los Potenciales de Acción Eléctrico (PAE).

Osciloscopio digital: modelo VC-6023 (Hitachi). Este equipo ofrecía la posibilidad de manejar dos canales de manera simultánea, digitalizar las señales, calcular sus características y exportar los resultados a un ordenador. En el experimento, una unidad se dedicó a la visualización del flujo y la presión pleural, mientras que la otra se empleó para monitorear en tiempo real la intensidad de la estimulación eléctrica.

Panel de conexiones múltiples: dispositivo con 28 entradas intercambiables y 45 salidas, desarrollado por el prof. Marc Stefan Dawid-Milner y producido por Álava Ingenieros.

Torreta de estereotaxia: modelo SM-11 (Narishige). Facilitó la microinyección precisa en las zonas específicas al ofrecer un soporte estable para el microposicionador durante el experimento.

Transductor de presión diferencial con amplificador operacional: transductor aneroide modelo FE141 (ADInstrument). Este dispositivo se utilizó para medir los cambios en la resistencia laríngea. Con un flujo de aire constante, la diferencia entre la presión subglótica y la presión supraglótica indicaban cambios en la resistencia laríngea.

Transductores de presión: para medir la presión pleural de manera indirecta, se utilizó un transductor de presión aneroide, específicamente el modelo T41-05 de Coulbourn Instruments. El flujo respiratorio fue evaluado mediante un transductor de presión diferencial del modelo SP-2040D. En cuanto a la presión arterial, se hizo uso del transductor MP-15D de Coulbourn Instruments, que tiene un rango operativo de -50 a 300 mmHg y una sensibilidad de 50 $\mu\text{V}/\text{cmHg}$.

Unidad de aislamiento: modelo SS-302J (Nihon). Se usó para minimizar la generación de artefactos y asegurar la integridad de las señales en el proceso de adquisición de datos.

Anexo III. Índice de figuras y tablas

Figura 1. Localización y estructura del hipotálamo.....	55
Figura 2. Regiones implicadas en la respuesta cardiorrespiratoria mediada por el DMH/PeF.....	56
Figura 3. Organización funcional de la SGP y sus conexiones con el DMH/PeF.....	68
Figura 4. Ciclo respiratorio y estructuras bulbopontinas implicadas.....	74
Figura 5. Localización de las motoneuronas laríngeas y faciales dentro del tronco del encéfalo.....	86
Figura 6. Cartílagos laríngeos.....	92
Figura 7. Músculos intrínsecos de la laringe.....	94
Figura 8. Capas de los pliegues vocales.....	97
Figura 9. Procedimiento quirúrgico para registro de variables.....	112
Figura 10. Protocolo experimental: administración de anestesia, fases y tiempos.....	114
Tabla 1. Características de los anticuerpos primarios usados.....	116
Figura 11. Subdivisiones del nA para el estudio de la distribución del marcaje para c-Fos y Foxp2.....	119
Figura 12. Registro de la actividad neuronal unitaria del nA durante la estimulación del DMH/PeF.....	124
Tabla 2. Agentes químicos microinyectados para la estimulación química del DMH/PeF.....	126
Tabla 3. Cuantificación relativa y distribución de células inmunorreactivas para c-Fos y Foxp2 (c-Fos-ir y Foxp2-ir) dentro del nA y nRA en animales no estimulados (control) y en animales con estimulación eléctrica del DMH-PeF (estimulados).....	137
Figura 13. Gráficos de cajas y bigotes que muestran el cambio delta significativo en el número de células inmunomarcadas (grupo células totales) para c-Fos-ir y Foxp2-ir....	138
Figura 14. Gráficos de cajas y bigotes que muestran el cambio delta significativo en el número de células inmunomarcadas (grupo células totales) para c-Fos-ir y Foxp2-ir....	139
Figura 15. Activación neuronal en el nA y nRA tras la estimulación eléctrica del DMH/PeF.....	140
Figura 16. Expresión de Foxp2 en las distintas formaciones del nA y nRA tras la estimulación del DMH/PeF.....	141
Figura 17. Expresión diferencial de células motoneuronas y no-motoneuronas positivas para c-Fos y Foxp2 en el nA.....	142
Figura 18. Distribución diferencial de células totales positivas para c-Fos y Foxp2 en el nA y nRA.....	143
Tabla 4. Coexpresión c-Fos/Foxp2 en células totales de la formación semicompacta del nA.....	145
Figura 19. Expresión y coexpresión c-Fos/Foxp2 en la formación compacta del nA.....	146

Tabla 5. Resumen de los resultados del registro extracelular unitario en el nA y regiones circundantes durante la estimulación de DMH/PeF.....	151
Figura 20. Distribución de neuronas registradas en el nA y regiones adyacentes.....	152
Figura 21. Registro de dos motoneuronas inspiratorias laríngeas decrecientes.....	153
Figura 22. Registro de neurona espiratoria E1 y neurona sin modulación cardiorrespiratoria.....	154
Figura 23. Registro de neurona con modulación cardiovascular.....	155
Figura 24. Mapeo de las posiciones anatómicas de estimulación eléctrica en el DMH/PeF.....	157
Figura 25. Estimulación eléctrica del DMH/PeF.....	158
Tabla 6. Cambios cardiorrespiratorios inducidos por la estimulación eléctrica en el DMH/PeF.....	159
Figura 26. Efecto de la estimulación eléctrica en el DMH/PeF en la respuesta respiratoria y resistencia laríngea.....	160
Figura 27. Efecto de la estimulación eléctrica en el DMH/PeF en la respuesta cardiovascular.....	161
Figura 28. Mapeo de las posiciones anatómicas de estimulación química en el DMH/PeF.....	164
Figura 29. Estimulación química del DMH/PeF.....	165
Tabla 7. Cambios cardiorrespiratorios inducidos por la microinyección de PBS en el DMH/PeF.....	166
Tabla 8. Cambios cardiorrespiratorios inducidos por la microinyección de glutamato en el DMH/PeF.....	167
Tabla 9. Análisis comparativo de los efectos de PBS y glutamato en el DMH/PeF.....	168
Figura 30. Efecto de la estimulación química en el DMH/PeF en la respuesta respiratoria y resistencia laríngea.....	169
Figura 31. Efecto de la estimulación química en el DMH/PeF en la respuesta cardiovascular.....	170

Anexo IV. Artículos que avalan la tesis

PUBLICACIÓN N°1

González-García, M., Carrillo-Franco, L., Peinado-Aragonés, C. A., Díaz-Casares, A., Gago, B., López-González, M. V., & Dawid-Milner, M. S. (2023). Impact of the glutamatergic neurotransmission within the A5 region on the cardiorespiratory response evoked from the midbrain dIPAG. *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, 475(4), 505–516. <https://doi.org/10.1007/s00424-022-02777-6>

Abstract: Stimulation of the dorsolateral periaqueductal grey matter (dIPAG) in rats evokes an active defensive behaviour together with a cardiorespiratory response characterised by tachypnoea, tachycardia and hypertension. The dIPAG neurons involved in these responses are excitatory, presumably glutamatergic, due to the presence of vesicular glutamate transporter VGLUT2 within their axon terminals. Previously, our group described a functional interaction between dIPAG and the pontine A5 region. Accordingly, in the present work, in order to characterize the role of glutamate within this interaction, experiments were carried out in spontaneously breathing anaesthetized rats (sodium pentobarbitone 60 mg/kg i.p., supplemented with 20 mg/kg i.p.). The cardiorespiratory response evoked by electrical stimulation of the dIPAG (1 ms pulses, 20–50 μ A, given at 100 Hz, during 5 s) was analysed before and after the microinjection, within the A5 region, of either kynurenic acid (nonspecific glutamate receptor antagonist; 5–10 nmol), DAP-5 (NMDA antagonist; 1 pmol), CNQX (non-NMDA antagonist; 1 pmol) or MCPG (metabotropic antagonist; 0,1 nmol). Kynurenic acid decreased the intensity of both the tachypnoea ($p < 0,001$) and tachycardia ($p < 0,001$) induced by dI-PAG stimulation. Blockade of non-NMDA receptors reduced the increase of respiratory frequency, heart rate and pressor response to dI-PAG stimulation ($p < 0,01$, $p < 0,001$, $p < 0,05$ respectively). Blockade of either NMDA or metabotropic receptors reduced the dIPAG-evoked tachycardia and pressor response ($p < 0,01$; $p < 0,05$ respectively). These results suggest a neuromodulatory role for A5 region via glutamate neurotransmission of the dIPAG-evoked cardiorespiratory response, confirming the role of the ventrolateral pons in the neuronal circuits involved in respiratory and heart rate control.

Keywords: Central cardiorespiratory control; Dorsolateral periaqueductal grey matter (dIPAG); Glutamate; Pontine A5 region; Rat.

PUBLICACIÓN N°2

Carrillo-Franco, L., González-García, M., Morales-Luque, C., Dawid-Milner, M. S., & López-González, M. V. (2024). Hypothalamic Regulation of Cardiorespiratory Functions: Insights into the Dorsomedial and Perifornical Pathways. *Biology*, 13(11), 933. <https://doi.org/10.3390/biology13110933>

Abstract: The dorsomedial hypothalamus nucleus (DMH) plays a pivotal role in the orchestration of sympathetic nervous system activities. Through its projections to the brainstem and pontomedullary nuclei, it controls heart rate, contractility, blood pressure, and respiratory activity, such as timing and volumes. The DMH integrates inputs from higher brain centers and processes these signals in order to modulate autonomic outflow accordingly. It has been demonstrated to be of particular significance in the context of stress responses, where it orchestrates the physiological adaptations that are necessary for all adaptive responses. The perifornical region (PeF), which is closely associated with the DMH, also makes a contribution to autonomic regulation. The involvement of the PeF region in autonomic control is evidenced by its function in coordinating the autonomic and endocrine responses to stress, frequently in conjunction with the DMH. The DMH and PeF do not function in an isolated manner; rather, they are components of a comprehensive hypothalamic network that integrates several autonomic responses. This neural network could serve as a target for developing therapeutic strategies in cardiovascular diseases.

Keywords: autonomic nervous system; cardiorespiratory control; defense response; dorsomedial hypothalamic nucleus and perifornical area; stress.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA