



FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Fisiología Humana, Histología Humana,
Anatomía Patológica y Educación Física y Deportiva

TESIS DOCTORAL

“MECANISMOS SUPRAENCEFÁLICOS INVOLUCRADOS EN EL CONTROL DE LA ACTIVIDAD LARÍNGEA”

Tesis doctoral presentada por

Marta González García

Dirigida por

Prof. Dr. Manuel Víctor López González
Prof. Dr. Marc Stefan Dawid-Milner

Doctorado en Biomedicina, Investigación Traslacional, y
Nuevas Tecnologías en Salud

Málaga, 2024



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTORA: Marta González García

 <https://orcid.org/0000-0003-4085-7757>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



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

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

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.

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 PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña MARTA GONZÁLEZ GARCÍA

Estudiante del programa de doctorado BIOMEDICINA, INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL, Y NUEVAS TECNOLOGÍAS EN SALUD de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: MECANISMOS SUPRAENCEFÁLICOS INVOLUCRADOS EN EL CONTROL DE LA ACTIVIDAD LARÍNGEA

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 deberá hacer constar el nombre de todos)

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), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a 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 al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 24 de MAYO de 2024

Fdo.: MARTA GONZÁLEZ GARCÍA Doctorando/a	Fdo.: MARC STEFAN DAWID-MILNER Tutor/a
Fdo.: MARC STEFAN DAWID-MILNER Y MANUEL VÍCTOR LÓPEZ GONZÁLEZ	





Dr. Manuel Víctor López González, Profesor Permanente Laboral del Dpto. 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. **Marta González García** 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: “***Mecanismos Supraencefálicos involucrados en el Control de la Actividad 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.

Director de la Tesis Doctoral

Fdo. Dr. Manuel Víctor López González





Dr. Marc Stefan Dawid Milner, Profesor Titular del Dpto. 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. **Marta González García** ha realizado bajo mi dirección y tutorización, 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: ***“Mecanismos Supraencefálicos involucrados en el Control de la Actividad 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.

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



A mi hijo,
A mis padres,
A mi hermana,
A mi futuro marido.



"Las palabras son, en mi no tan humilde opinión,
nuestra más inagotable fuente de magia, capaces
de infringir daño y de remediarlo."

Albus Dumbledore

Harry Potter y las Reliquias de la Muerte



AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más profunda gratitud a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de esta tesis doctoral y que han aportado su granito de arena hasta el día de hoy.

Al **Prof. Dr. Manuel Víctor López González**, por todo. Por creer en mí. Por su tiempo y esfuerzo, por compartir conmigo toda su experiencia y conocimientos. Gracias por enseñarme lo que es la docencia y lo bonito que es enseñar. Esta tesis ha sido una oportunidad de crecimiento académico, laboral y, sobre todo, personal a su lado.

Al **Prof. Dr. Marc Stefan Dawid Milner**, mi más sincero agradecimiento por su dedicación, por brindarme tantas oportunidades de aprendizaje y por inculcarme tantos valores. Gracias por construir un espectacular ambiente de trabajo que nos hace disfrutar de la docencia y la investigación.

A la futura doctora **Dña. Laura Carrillo Franco**, por acompañarme en todo este proceso y ser una parte fundamental de él. Gracias por todo lo aprendido a su lado y por todas las experiencias compartidas, tanto dentro como fuera del laboratorio.

A la **Prof Dra. Isabel Rocha** por su constante apoyo, sus consejos, su entusiasmo y sus ideas. Sin todo ello no hubiese sido posible culminar con éxito este viaje. Mucho obligada.

A **Claudia y Beatriz**, por su amistad. Por ser una parte fundamental de este trabajo gracias a su apoyo incondicional, por creer en mí y por enseñarme tanto en estos años.

A todos mis compañeros y amigos del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina, a los que ya no están con nosotros y a los que han ido llegando. Gracias por acogerme desde el primer momento y por hacerme sentir como en casa.

A la **Universidad de Málaga**, la cual me ha visto crecer en los últimos 15 años. Agradecer todas las oportunidades que me ha brindado y que han hecho posible este trabajo.

Por último, y no menos importante, quiero dedicar este trabajo a toda mi familia, en especial a **Juan** y a mi hijo **Alejandro**, por compartir este camino conmigo, por su paciencia, comprensión y apoyo hasta el último día. A mis **padres** y mi **hermana** por el apoyo y cariño recibidos y, sobre todo, por la confianza que siempre han tenido en mí. Habéis sido fundamentales en la realización y consecución de esta tesis doctoral.



ÍNDICE

I. THESIS SUMMARY	1
II. INTRODUCCIÓN	40
2.1. La laringe como instrumento de la vocalización.....	42
2.1.1 Cartílagos laríngeos	43
2.1.2 Musculatura laríngea	45
2.1.3 Diferencias interespecies	50
2.1.4 Inervación de la laringe	50
2.1.5 Cuerdas vocales	52
2.1.6 Presión subglótica	54
2.2. Producción vocal.....	56
2.3. Producción vocal en roedores.....	59
2.4. Control central de la vocalización.....	62
2.4.1 Sustancia Gris Periacueductal	63
2.4.1.1. Aferencias de la SGP	65
2.4.1.2. Eferencias de la SGP	68
2.4.1.3 Organización anatómico-funcional de la SGP	71
2.4.1.4 Propiedades neuroquímicas de la SGP	73
2.4.1.5 SGP y control de la actividad laríngea y la vocalización	76
2.4.2 Grupo Respiratorio Pontino	77
2.4.2.1. Complejo parabraquial	77
2.4.2.2. Núcleo Kölliker-Fuse	78
2.4.3 Complejo Post-inspiratorio (PiCo)	79
2.4.4 Núcleo parafacial lateral	80
2.4.5. Grupo Respiratorio Dorsal	80
2.4.6. Grupo Respiratorio Ventral	81
2.4.6.1. Complejo pre-Bötzing y Bötzing	82
2.4.6.2. Núcleo ambiguo	83
2.4.6.3. Núcleo Retroambiguo	87
2.5 FoxP2 como marcador relacionado con respiración y vocalización.....	91
2.6. Aspectos fisiopatológicos.....	94

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	96
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	98
4.1. Animal de experimentación	98
4.2. Preparación quirúrgica	99
4.3. Variables registradas, almacenamiento y estudio de señales	102
4.4. Material técnico para el registro de variables	104
4.4.1. Material técnico protocolo neuroanatómico	106
4.5. Fármacos	108
4.6. Protocolo neuromorfológico	109
4.6.1. Procesamiento del tejido	111
4.6.2. Caracterización de la expresión a nivel bulbar de la proteína c-Fos por la estimulación eléctrica de la SGPdl. Doble marcaje c-Fos/TH	112
4.6.3. Caracterización de la expresión a nivel bulbar de la proteína FoxP2 por la estimulación eléctrica de la SGPdl. Doble marcaje FoxP2/TH	113
4.6.4. Caracterización de la expresión a nivel bulbar de las proteínas cFos y FoxP2 por la estimulación eléctrica de la SGPdl. Doble marcaje inmunofluorescente cFos/FoxP2	114
4.6.5. Cuantificación del marcaje inmunohistiquímico	115
4.6.6. Cuantificación del marcaje de inmunofluorescencia	116
4.7. Registro de la actividad eléctrica neuronal	117
4.8. Protocolo neurofuncional	122
4.8.1. Registro de la actividad neuronal del nA Y nRA durante la estimulación eléctrica de la SGPdl	122
4.8.2. Interacción de dIPAG y nA. Caracterización de la respuesta de presión subglótica evocada por la estimulación eléctrica y química de la SGPdl.	123
4.9. Procesamiento histológico	125
4.10. Tratamiento estadístico	126

V. RESULTADOS	128
5.1. Interacción de la SGPdl y el nA: experimentos c-Fos/FoxP2/TH-ir.....	128
5.1.1. Distribución de FoxP2-ir	128
5.1.2. Distribución de c-Fos-ir	129
5.1.3. Co-expresión de las proteínas c-Fos y FoxP2	130
5.2. Interacción de la SGPdl y el nA: experimentos de registro neuronal.....	135
5.3. Interacción de la SGPdl y el nA: experimentos con estimulación eléctrica/química y presión subglótica.....	148
5.3.1. Estimulación eléctrica de la SGPdl y medición de presión subglótica	148
5.3.2. Estimulación química de la SGPdl y medición de presión subglótica	155
VI. DISCUSIÓN	164
6.1. Consideraciones generales.....	165
6.2. Consideraciones metodológicas, actualización y aproximación quirúrgica.....	171
6.3. Interacción de la SGPdl y el nA: experimentos c-Fos/FoxP2/TH-ir...	174
6.3.1. Expresión de c-Fos y doble marcaje con TH	174
6.3.2. Expresión de FoxP2 y doble marcaje con TH	178
6.3.3. Doble marcaje inmunofluorescente c-Fos/FoxP2	181
6.4. Registro neuronal.....	183
6.5. Interacción de la SGPdl y el nA: experimentos con estimulación eléctrica/química y presión subglótica.....	187
6.5.1. Efecto de la estimulación eléctrica en la SGPdl sobre la presión subglótica	190
6.5.2. Efecto de la estimulación química en la SGPdl sobre la presión subglótica	191
VII. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	195
VIII. BIBLIOGRAFÍA	199

IX. ANEXOS	251
9.1. Anexo 1. Abreviaturas.....	251
9.2. Anexo 2. Índice de figuras y tablas.....	252
9.3. Anexo 3. Publicaciones que avalan la tesis doctoral.....	254



THESIS SUMMARY

1. THESIS SUMMARY

1.1. INTRODUCTION

Chemical microstimulation of the mesencephalic Periaqueductal Gray Matter (PAG) has revealed that the different columns within the PAG coordinate different types of responses depending on the stimulus [1, 3, 8, 24], allowing the modulation of an autonomic response dependent on the type of stress and the individual's subjective perception of a threat or stressful stimulus. For this purpose, the PAG presents many afferences and efferences projections. The most important afferences have their origin from the prefrontal cortex, amygdala and hypothalamus [7, 20, 23, 40, 46, 47]. The PAG, in turn, projects to the pontomedullary cardiorespiratory nuclei involved in cardiorespiratory rhythmogenesis that allows the development of different patterns of cardiorespiratory and motor responses depending on the type of stimulus [8, 9, 21, 26].

Moreover, the PAG assumes a pivotal role in the regulation of vocalizations [18, 42]. Chemical microstimulation within the PAG (lateral or ventrolateral columns) produces vocalisations in cats [44], monkey [19], birds [36] and humans [17] corresponding with the sound part of human speech. This is facilitated by its connectivity with the laryngeal motor cortex [6, 19] and with nucleus retroambiguus (nRA) [17, 48]. The nRA is positioned caudal to the pre-Bötzinger complex and contains inspiratory premotor neurons in its rostral section called rostral ventral respiratory group, and expiratory premotor neurons in its caudal section, called caudal ventral respiratory group (cVRG) [21, 29]. These nRA premotor neurons are the perfect target to convert passive breathing into active breathing to generate motor activities that produce changes in abdominal pressure, in addition to modifying the activity of the motor neurons that are located in the nucleus Ambiguus (nA) and that control the patency of the pharynx and larynx [4, 12, 16, 43, 45]. In turn, the dorsolateral Periaqueductal Gray matter (dlPAG) column controls fight/flight, or coping/fighting behavioural responses, triggering a defence response that is haemodynamically characterised by hypertension, tachycardia and redistribution of blood flow to the skeletal muscles of the extremities from the abdominal and visceral area. In addition, the response is accompanied by mydriasis, tachypnoea and increased tidal volume.

This allows the animal to cope with environmental stress situations that require a rapid cardiorespiratory response [26, 30, 47].

Regarding respiration and vocalization, it is important to emphasize the need for precise control of the larynx to achieve perfect coordination between both functions. The larynx performs three pivotal functions: respiration, protection (cough and swallowing reflexes) and phonation. Each of these laryngeal functions involves distinctive movements of the vocal folds [27, 34]. The contraction and relaxation of the laryngeal muscles actively modulate the opening and closing of the vocal folds, thereby intricately regulating the egress of air and the subglottic pressure, which denotes the air pressure build up beneath the vocal folds within the subglottic region of the trachea. Proper synchronization between subglottic pressure and glottic opening profoundly influences proficient phonation and optimum vocal quality. Vocal fold movements are characterized as adduction and abduction. Therefore, during vocal fold closure, subglottic pressure escalates due to the muscular contraction of respiratory muscles and vocal fold occlusion [17]. The motor neurons that govern the laryngeal musculature primarily reside within the nA of the medulla oblongata [15]. The nA can be anatomically partitioned into three principal domains: the compact formation, housing motor neurons innervating the oesophagus; the semi-compact formation, accommodating motor neurons that innervate the pharynx and the cricothyroid muscle, the latter being supplied by the superior laryngeal nerve; and the loose formation, harbouring motor neurons that innervate the remaining laryngeal muscles, excluding the cricothyroid [2, 33].

In previous works, we and others have demonstrated how the parabrachial complex (PBc) and the A5 region (A5) of the pons have a role in the defence response evoked from dIPAG [9, 13, 26] and in modifying the activity of laryngeal motoneurons [22]. In that latter work, the activity of the laryngeal motor neurons of nA and the reflex mechanisms involved in respiratory laryngeal responses were characterized through the technique of the “isolated glottis in situ”. This technique has some advantages, as it separates the lower airways from the larynx, facilitates the evaluation of the changes in neuro-muscular tone and abolishes the influence of the changes of airflow activating laryngeal reflexes [5, 22]. Thus, the PAG seems to modulate the activity of several

pontomedullary structures responsible for generating the complete array of laryngeal-respiratory motor patterns imperative for defensive and for vocal production [12, 43].

Furthermore, some studies in animal models that communicate vocally and/or learn to speak such as mice, birds or humans, have shown that the transcription factor FoxP2 (Forkhead box protein P2) is involved in the acquisition of fine motor skills necessary for the production of species-specific vocalisations. These studies show that FoxP2 has a highly conserved role through evolution in the development of language in these species, particularly in mammals [10, 11, 37, 38]. Although FoxP2 protein is expressed in various body tissues during development (pulmonary, nervous, cardiovascular and intestinal), it has a particularly strong presence in brain regions involved in cognitive function, learning, language production and comprehension [31, 39]. A high expression of FoxP2 protein at PAG, PBc and A5 region has also been described [41].

However, the relation between PAG and nA is not well defined. Therefore, the main objective of this work was to characterize the anatomo-functional interactions between mesencephalic and medullary neuronal circuits, especially from dIPAG region that possibly control direct or indirectly the activity of nA laryngeal motor neurons in the rat. To this end, we have analysed the pattern of double staining c-Fos or FoxP2 immunoreactivity (c-Fos-ir, FoxP2-ir) and Tyrosine Hydroxylase (TH-ir), throughout the rostro-caudal extent of the nA region of anesthetized male Sprague–Dawley rats during dIPAG electrical stimulation. Secondly, to confirm functional interactions between the dIPAG and the nA, extracellular recordings of putative nA neurons were obtained during dIPAG stimulation. Subsequently, in a final phase of our study, we have updated the "isolated glottis *in situ*" technique from previous work and been able to measure subglottic pressure by stimulating the dIPAG both electrically and chemically. Thus, we were able to verify how dIPAG plays a role in upper airway patency during dIPAG evoked defence behaviour in anaesthetised animals.

1.2. MATERIAL AND METHODS

1.2.1. Animals and housing

Experiments were conducted on 31 adult male SPF Sprague-Dawley rats weighing between 250-350 g, procured from Charles River (Barcelona, Spain). The rats were housed in groups of six per cage, residing in a climate-controlled chamber maintained at a temperature of 22-24° C, and adhering to a 12:12 hour light-dark cycle with lights on at 8:00 am. These animals were maintained in the Animal House at the University of Malaga, with unrestricted access to food and water.

1.2.2. General procedures

The surgical interventions employed in this study were based on the methodologies described in previous publications [9, 25].

All surgical procedures were performed under anaesthesia induced by sodium pentobarbitone (initial dose of 60 mg kg⁻¹ i.p., supplemented with 2 mg kg⁻¹ i.v. as needed). Cannulation of the femoral artery and vein was carried out for the purpose of arterial blood pressure measurement and drug administration, respectively. To enable the measurement of respiratory flow using a Fleish pneumotachograph and pleural pressure utilizing an air-filled catheter, both the trachea and oesophagus were cannulated. The animals spontaneously breathed a humidified mixture of oxygen-enriched room air. To gauge end-tidal CO₂ levels during the experiment, a fast response CO₂ analyser (ADC FM1, The Analytical Development Co. Ltd., Great Amwell, UK) was employed, and values ranged between 3 to 5%. Throughout the experimental procedures, measures were taken to maintain the animals' body temperature at 37°C utilizing a heated surgical table and a servo-controlled heating pad that monitored rectal temperature, thereby reducing the risk of hypothermia. Anaesthesia levels were continuously monitored during the procedures and throughout the duration of the experiment. This was achieved by assessing any potential alterations in cardiovascular variables under resting conditions and evaluating the absence of a significant withdrawal reflex upon paw pinching. To ensure stability and immobility, the animals' heads were securely fixed in a stereotaxic frame, with the upper incisor bar positioned 3.3 mm below the interaural line.

1.2.3. Interaction of dIPAG and nA: c-Fos/FoxP2/TH-ir experiments

In a group of 10 animals, a hole was drilled into the skull to provide access to the right dIPAG. A concentric bipolar electrode (Rhodes Medical electrodes, SNE-100) was positioned in the right dIPAG. The stereotaxic coordinates to locate the right dIPAG were from -4.0 mm caudal to bregma, 0.6 lateral to midline and 4.5 to 5 mm depth from the surface of the calota (approaching with an angle of 30°) based on the coordinates provided by the atlas of Paxinos and Watson [35]. The right dIPAG was stimulated once using 1 millisecond pulses, ranging from 30-50 μ A, at a frequency of 100 Hertz for a duration of 5 seconds, in order to elicit the classical defence response evoked by this region. Following this, guanethidine (10 milligrams per kilogram intravenous) was administered to suppress sympathetically mediated cardiovascular responses.

Following this, in one subgroup of animals (n=5), the right dIPAG was stimulated using trains of 1 millisecond pulses, between 30-50 μ A, at a frequency of 100 Hertz for 5 seconds, every 60 seconds for a period of one hour. The other subgroup of animals (n=5) did not receive any stimulation and served as the control group.

One hour after the completion of the experiments, the animals were deeply anesthetized and subjected to perfusion through the ascending aorta using a phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) solution, followed immediately by a solution of 4% paraformaldehyde in 0.1M PBS (pH 7.4) to serve as the fixative. The brains were rapidly extracted and subjected to additional fixation by immersion in the same fixative solution for 24 hours at 4°C. Subsequently, the brains were cryoprotected using 30% phosphate-buffered sucrose for several days. The brainstem was then sectioned into 30 μ m coronal sections obtained with a freezing microtome (CM 1325, Leica, Wetzlar, Germany). Sampling was performed by selecting every fifth section with a random starting point, and these sections were further processed to assess c-Fos/FoxP2/TH-ir at the level of nA.

c-Fos-TH double immunohistochemistry

Sections collected from control and stimulated rats were processed under identical *free-floating* immunohistochemical conditions. The sections were rinsed in 0.1 M PBS (pH 7.4) and pre-treated during 15 minutes in 3% H₂O₂ to eliminate endogenous

peroxidase activity. After a second round of washing in PBS saline, sections were incubated overnight at room temperature (RT), using a mouse anti-c-Fos monoclonal primary antibody (1:1000 dilution in PBS containing 0.3% Triton X-100 0.2% Azida 0.02%; Santa Cruz Biotech, ref SC-271243). A biotinylated secondary antibody (1:500 dilution; goat anti-mouse; Vector Laboratories) and ExtrAvidin Peroxidase (1:2000 dilution; Sigma-Aldrich) were used for subsequent incubations, of 1 hour at RT each. After washing in PBS (pH 7.4), staining was carried out with 3,3'-diaminobenzidine (DAB; 25mg in 100 ml Tris-HCl, pH 7.4 and 0.002% H₂O₂; Sigma-Aldrich) in the presence of nickel sulphate (1%) to produce a dark reaction product. In order to locate the nA more accurately, TH-ir was only used as a visual reference for helping to locate the ventral medulla. The same sections were then incubated overnight at RT with a polyclonal primary antibody against the tyrosine-hydroxylase enzyme (1:5000 dilution; anti-rabbit; Sigma-Aldrich, ref T2928), followed by are-incubated 1h at RT in a biotonylated secondary antibody (1:500 dilution; goat anti-rabbit; Vector Laboratories). The TH-ir was revealed only by reacting DAB to produce a brown labelling. Sections were dehydrated and coverslipped with DPX mounting medium.

FoxP2 -TH double immunohistochemistry

This double labelling was performed under the same protocol as for c-Fos-TH-ir but using a sheep anti-FoxP2 primary antibody (1:1000 dilution; RD Systems, ref AF5647) and a biotinylated secondary antibody (1:500 dilution; rabbit anti-sheep; Vector Laboratories).

Double immunofluorescent labelling cFos/FoxP2

To study the co-expression of cFos and FoxP2 in the nA by dIPAG stimulation, double immunofluorescence was performed using a mouse monoclonal anti-c-Fos primary antibody (1:250 dilution in PBS containing 0.3% Triton X-100 0.2% Azide 0.02%; Santa Cruz) and an anti-FoxP2 primary antibody (1:100 dilution in PBS containing 0.3% Triton X-100 0.2% Azide 0.02%; made in sheep species; RD Systems). .For cFos immunoreactivity, slices were incubated in an Alexa Fluor 488 secondary antibody conjugated with goat anti-IgG-mouse, made in goat species, and diluted in PBS 0.3% Triton X-100 (dilution 1:250; Vector Laboratories) and with a biotinylated anti-sheep secondary antibody for FoxP2 (1:100 dilution in PBS

containing 0.3% Triton X-100 0.2% Azide 0.02%; made in rabbit species; Vector Laboratories). As with the immunohistochemistry studies, sections obtained from both control and stimulated rats were processed under identical conditions for free floating double immunofluorescence. Sections were selected every 180 μm in a systematic and random sampling.

Cell counting and statistical analysis

The rostrocaudal level of each brain section was determined using the Paxinos and Watson rat brain atlas [40]. The cell bodies displaying c-Fos-ir or FoxP2-ir were identified by the presence of a dark nucleus and were quantified bilaterally in the sections containing the nA using a BX61VS optical microscope (Olympus), an Olympus VS software for brightfield image acquisition and QuPath Software. All data were presented as mean \pm SEM. To compare the differences between groups, a one-way analysis of variance (ANOVA) was employed for statistical analyses. The significance level was set at $p < 0.05$.

Cell quantification along the nA was executed in accordance with the categorization into three primary subdivisions (*compact*, *semicompact*, and *loose formation*). To this end, distances from Bregma, as per the Paxinos Atlas [35], were employed to guide the selection of slices across the three domains of the nA. Specifically, the criterion for demarcating cells within the *compact region* of the nA spanned from Bregma -12.00 mm to -12.84 mm; the *semi-compact region* extended from Bregma -12.84 mm to -13.44 mm; and the *loose formation* region encompassed Bregma -13.44 mm to -14.16 mm.

To study the co-expression of cFos and FoxP2 proteins in nA, cFos-positive-TH-negative, FoxP2-positive-TH-negative and cFos/FoxP2-positive immunolabelled cells were quantified bilaterally in both stimulus and control rats. Sections were imaged with a fluorescence confocal microscope (Leica Stellaris 8). Cell quantification along the nA was performed in the same way as for the immunohistochemistry studies.

1.2.4. Interaction of dIPAG and nA: neuronal unit recording experiments

In 5 animals a stimulation bipolar electrode (Rhodes Medical Electrodes, SNE-100) was stereotaxically positioned in the right dIPAG. For initial localization of the dIPAG, 1 ms pulses, 50 μ A at 100 Hz were given to evoke the characteristic cardiorespiratory response. During neuronal recording the stimulus was reduced to short trains of up to 10 pulses (0.1 ms given at 1 Hz). This markedly reduced or abolished the changes in blood pressure evoked by continuous stimulation.

Extracellular recordings were taken from ipsilateral neurons in the vicinity of nA with tungsten electrodes (A-M Systems, DC impedances between 8-10 M Ω). Extracellular potentials were amplified conventionally (Neurolog). All data were stored and the off-line analysis was done using a computer A/D system with data capture and analysis software (CED 1401, Spike2, Sigavg).

Extracellular recordings from single neurons were distinguished from that of multiple neurons by analysis of spike shape, height and successive spike intervals. The analysis of neuronal discharge was obtained with interspike interval histograms and represented as triggered event rate histograms with or without electrical stimulation. Neuronal cardiovascular or respiratory patterns of discharge were inferred from trigger time histograms using systolic blood pressure or the maximum inflexion of expiratory flow as the event markers. The recorded cells were identified as putative nA neurons when they fulfilled the following criteria: during the experiments, stereotaxic coordinates and the patterns of the cardiorespiratory responses to electrical stimulation through the recording electrode was used as an index of the location of the nA. The last recording site in each experiment was marked with an electrical lesion (250 μ A DC for 20 s); the other recording sites were deduced from their stereotaxic coordinates relative to the marked site.

1.2.5. Interaction of dIPAG and nA: electrical/chemical stimulation and subglottic pressure measurement

In 21 animals, divided in 3 groups, the described general procedures were modified. A double tracheal cannulation was carried out. One cannula was placed upwards in direction of the glottis for the “glottis isolated in situ” technique. A second cannula was placed downwards in the direction of the carina for measuring respiratory flow. That allows us the recording of subglottic pressure and respiratory airflow separately [22]. Subglottic pressure changes are related to changes in laryngeal resistance (glottic opening and closing) because it is the only structure that can influence this variable. In fact, to avoid subglottic pressure changes due to tongue movements, which are possible during PAG stimulation, we fixed the tongue to rule out this variable.

It was of our particular interest to reapply this technique to measure changes in subglottic pressure associated with the cardiorespiratory response evoked from dIPAG stimulation. For this purpose, we have maintained the original design, updating the means of obtaining the subglottic pressure variable thanks to an aneroid transducer (ADInstrument model FE141, ± 0.03 psi) that allows us pass a stream of humidified warm medical air upwards through the larynx at a constant rate of 30-70 ml/min with a thermal mass digital air flow meter controller (Bronkhorst Hi-Tec F-201CV-AGD-22-V). Thus, at constant air flow, changes in pressure indicate changes in laryngeal resistance. In addition, we have upgraded both the data processing software (LabChartPro) and the signal acquisition hardware (PowerLab 16/30). Thanks to these updates we have been able to improve the sensitivity and stability of the subglottic pressure signal. In fact, in our study, we have included for statistical analysis only data from animals in which stable recordings were observed before, during and after dIPAG stimulation.

dIPAG electrical stimulation and subglottic pressure measurement

In a subset of 7 animals, a burr hole was drilled into the skull of each animal to access to the right dIPAG. The right dIPAG was stimulated with 1 ms pulses, 30-50 μ A given at 100 Hz for 5 s by positioning a concentric bipolar electrode (SNE-100; Rhodes Medical Electrodes, Summerland, CA, USA).

dIPAG chemical stimulation and subglottic pressure measurement

In 14 animals, a burr hole was drilled into the skull of each animal to access to the right dIPAG. Microinjections of a solution of PBS (50nl, pH 7.4±0.1, 5-s duration) (n=7), or glutamate (0,25M, 50nl) (n=7), through a stereotaxically positioned single glass micropipette (Hamilton 1.0µL Model 7001 Knurled Hub (KH) Neuros Syringe) were performed in the same coordinates cited above. Evans blue was used to dissolve all drugs and served to mark microinjection sites. Microinjections of PBS-Evans blue alone were used for control purposes. Microinjection volumes of 50 nl were programmed with a micropump controller (Ultra Micro Pump II, Micro 4; World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA), driving 1 µl microsyringes attached to the micropump. Only one microinjection was delivered in each animal.

Electrical lesions (250 µA DC for 20 seconds) or Evans blue serve to locate dIPAG electrical stimulation/microinjections sites, respectively. Brains were perfused with 10 % formal saline and serially sectioned (50 µm) at the level of the midbrain. The midbrain was counterstained with Neutral Red.

Different physiological parameters were analysed in each group of experiments under the following protocol:

- (a) Study of laryngeal and cardiorespiratory parameters at rest.
- (b) Study of laryngeal and cardiorespiratory changes during dIPAG stimulation (electrical/chemical).

In each animal airflow, pleural pressure (as an index of inspiratory activity), subglottic pressure and arterial pressure were monitored and stored on PC. Measurements were made of instantaneous respiratory frequency, subglottic pressure, mean blood arterial pressure and instantaneous heart rate. In all experiments baseline values of the parameters were measured immediately prior to dIPAG electrical/chemical stimulation and after (4 min after electrical stimulation and 30 min after chemical stimulation). Changes in mean arterial blood pressure or heart rate were assessed by measuring the peak rise in blood pressure or heart rate observed during the 5 seconds electrical stimulation of the dIPAG or the maximum cardiovascular response in the chemical stimulation experiments. Stimulus-evoked

changes in respiratory parameters were measured as the average response observed during the 5 seconds electrical stimulation of the dIPAG, or the maximum respiratory response in the chemical stimulation experiments. The parameter monitoring and the offline analysis was done using LabChartPro (PowerLab System, ADInstruments®/ LabChart Software, version 8.0, Sydney, Australia).

Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm SEM. For statistical comparisons, once the statistical normality (Kolmogorov-Smirnov test) and the homoscedasticity (Bartlett's test) of the data were verified, a paired-sample test was applied to compare the control with the evoked response period for each animal. One-way ANOVA was used to compare different groups of animals. At each time point, $p < 0.05$ was regarded as significant. Only data from animals in which the histology showed that the microelectrodes were positioned within the dIPAG were used for statistical procedures.

1.3. RESULTS

1.3.1. Interaction of dIPAG and nA: c-Fos/FoxP2/TH-ir experiments

Distribution of FoxP2-ir

Control animals

In non-stimulated animals no significant differences were observed regarding the number of FoxP2-ir profiles between ipsilateral and contralateral sides in any of the three principal domains of the nA (Table 1, Fig 2).

Electrically stimulated animals

Both, loose formation ($p < 0,001$) and semicompact formation ($p < 0,05$) presented a significant increase in FoxP2-ir profiles in the ipsilateral side compared with the contralateral side in electrically stimulated animals (Table 1, Figs 1, 2).

Control vs stimulated animals

No differences were found between control and electrically stimulated animals when comparing the amplitude of the differences between the number and distribution

of ipsilateral or contralateral FoxP2-ir neurons within any of the domains in the nA nuclei (Table 1, Figs 1, 2).

Distribution of c-Fos-ir

Control animals

A higher amount of c-Fos-ir profiles were observed in both the loose formation and semicompact formation in the ipsilateral side compared with the contralateral side ($p < 0.01$) in non-stimulated animals (Table 1, Fig 2).

Electrically stimulated animals

An significant ipsilateral predominance for c-Fos-ir staining in all the three domains of nA were observed in electrically stimulated animals: loose formation ($p < 0,001$), semicompact formation ($p < 0,001$) and compact formation ($p < 0,05$) (Table 1, Figs 1, 2).

Control vs stimulated animals

When comparing the amplitude of the differences of the c-Fos-ir expression in ipsilateral and contralateral sides in control and stimulated groups, a significant higher increase was observed in both the loose formation ($p = 0.032$) and the compact formation ($p = 0.002$) (Table 1, Figs 1, 2).

Distribution of co-expression of c-Fos-ir/FoxP2-ir

The co-expression of c-Fos-ir/FoxP2-ir was analysed in the loose formation, as this was the only region containing laryngeal motor neurons where electrical stimulation resulted in a significant increase in c-Fos-ir expression (Table 1, Figs 3).

Control animals

26.2% of the total FoxP2-positive cells had c-Fos-ir co-expression on the ipsilateral side; while on the contralateral side 21.3% of the total FoxP2-positive cells co-expressed c-Fos-ir.

Electrically stimulated animals

34,35% of the total FoxP2-positive cells had c-Fos-ir co-expression on the ipsilateral side; while on the contralateral side 25,7% of the total FoxP2-positive cells co-expressed c-Fos-ir.

Control vs stimulated animals

When comparing the amplitude of the differences (delta) between the control and stimulated groups with respect to co-expression between ipsilateral and contralateral regions, significant differences ($p < 0.001$) were observed between the two groups.

1.3.2. Interaction of dIPAG and nA: neuronal unit recording experiments

Extracellular unitary neuronal recording was performed in 5 adult rats in the region of the nA and its proximity. The recording covered an area from +1.25 cm anterior to Obex (-13.15 cm posterior to Bregma), to -0.5 cm posterior to Obex (-14.90 cm posterior to bregma) rostrocaudally, and from 1.5 cm to 2.5 cm lateral to the midline. The results are summarised in Table 2.

160 cells were recorded extracellularly located in the different subregions of the nA and in nearby regions that were characterised by histological study. All recorded neurons showed a spontaneous pattern of activity, except for 1 neuron that was silent and activated by stimulation of the dIPAG. The activity of 99/160 neurons were affected from the dIPAG (62 %) (Table 2).

Neurons were grouped by activity and location into 6 different groups: inspiratory neurons with increasing pattern of discharge, inspiratory neurons with decreasing pattern of discharge, E1 expiratory neurons, E2 expiratory neurons, cardiovascular neurons and neurons without cardiorespiratory modulation.

A. Inspiratory neurons with decreasing pattern of discharge

There were 21 inspiratory neurons with a mean depth of $2226.67 \pm 115.8 \mu\text{m}$ and an anteroposterior position of $+0.58 \pm 0.087 \text{ mm}$ anterior to obex and 1.83 ± 0.051

mm lateral to the midline. Its histological location corresponds to the nA, loose formation. Its resting discharge frequency was 46.4 ± 9.91 Hz. Its discharge frequency upon dIPAG stimulation (1 Hz) was 46.38 ± 10.08 , There are no significant differences when comparing the frequency changes to the different stimulations. However, in 16 neurons we observed an increase or decrease in discharge frequency upon dIPAG stimulation. One of them shows inhibition for the first 40 ms after dIPAG stimulation.

B. Inspiratory neurons with increasing pattern of discharge

Fifteen cells were recorded with a mean depth of 2609.80 ± 132.04 μm and an anteroposterior position of $+0.78 \pm 0.091$ mm anterior to obex and 2.05 ± 0.033 mm lateral to the midline. Its histological location corresponds to the rVRG. Its resting discharge frequency was 34.25 ± 9.59 Hz. Its discharge frequency upon dIPAG stimulation was 33.70 ± 8.89 Hz. There are no significant differences when comparing the frequency changes to the different stimulations. However, 7 neurons modified their discharge frequency upon dIPAG stimulation One of them presented inhibition during the first 100 ms after dIPAG stimulation.

C. Expiratory E1 neurons.

Fifteen E1 expiratory neurons were recorded with a mean depth of 2475.33 ± 91.75 μm and an anteroposterior position of $+0.24 \pm 0.089$ mm anterior to obex and 1.85 ± 0.036 mm lateral to the midline. Its histological location corresponds to the Loose formation of the nA. Its mean resting discharge frequency was 16.90 ± 4.02 Hz. Its discharge frequency upon dIPAG stimulation was 16.98 ± 3.84 Hz. There are no significant differences when comparing the frequency changes to the different stimulations. However, 4 neurons modified their discharge frequency upon dIPAG stimulation. This neuronal group is particularly affected by dIPAG stimulation (1 Hz): 6 neurons show a post-stimulus inhibition. In one case activation was observed at 5.6 ms. When two correction factors were used, the first depending on the approximate position of the stimulation electrode in the SGPdl and the second also depending on the size of the animal and the position of the recording electrode in the nA, an approximate distance between the two study areas of 6.6 - 7.7 mm was calculated, so that a conduction velocity of the activated axon between 1.18 and 1.37 m/s could be calculated. Excitation is observed in 3 cases. In two of them it appears between 15

and 75 ms and in another one between 60 and 90 ms. A conduction velocity between 0.11 and 0.13 m/s could be calculated, which could be indicative of a polysynaptic response. In another case, a post-inhibitory activation appears at 31 ms.

D. Expiratory E2 neurons.

Seven E2 expiratory neurons were recorded with a mean depth of 2229.43 ± 268.44 μm and an anteroposterior position of $+0.55 \pm 0.221$ mm anterior to obex and 1.83 ± 0.071 mm lateral to the midline. Its histological location corresponds to the Loose formation of the nA. Its mean resting discharge frequency was 12.80 ± 4.62 Hz. Its discharge frequency upon stimulation of the dIPAG was 10.98 ± 4.01 . There are no significant differences when comparing the frequency changes to the different stimulations. However, 2 neurons showed a decrease in discharge frequency upon dIPAG stimulation. 2 neurons show a post-stimulus inhibition with an average duration of 135 ms. In 3 cases activation was observed at 3.3 ms (3-4 ms) with a conduction velocity of the activated axon between 2 and 2.33 m/s. In 1 case, excitation was observed at 12 ms, with inhibition appearing between 40 and 80 ms. An axon conduction velocity of 0.55 - 0.64 m/s could be calculated.

E. Cardiovascular neurons.

Forty-four neurons with a clear cardiovascular profile were recorded with a mean depth of 2955.05 ± 67.1 μm and an anteroposterior position of $+0.54 \pm 0.076$ mm anterior to obex and 2.16 ± 0.034 mm lateral to the midline. Its histological location corresponds to the CVL. Its mean resting discharge frequency was 15.97 ± 2.27 Hz. Its discharge frequency upon dIPAG stimulation was $16.43 \pm 2.3 \pm 2.3$ Hz. There are no significant differences when comparing the frequency changes to the different stimulations. However, 21 neurons modified their discharge frequency upon dIPAG stimulation. 10 neurons show a post-stimulus inhibition with an average duration of 105 ms. In 2 other cases inhibition starts at 20 and 60 ms after dIPAG stimulation and lasts up to 140 ms. In 9 cases a mean activation was observed at 7.6 ms (4-15 ms). The conduction velocity of the activated axon was between 0.87 and 1.01 m/s. In 5 of these previously described neurons, inhibition appears after activation. In 1 case an excitation is observed at 5 ms followed by an inhibition lasting 150 ms. In another case

excitation appears after 15 ms. An axon conduction velocity of 0.44 - 0.51 m/s could be calculated.

F. Neurons without cardiorespiratory modulation.

There were 54 neurons without a clearly defined profile with a mean depth of $2834.30 \pm 63.04 \mu\text{m}$ and an anteroposterior position of $+0.55 \pm 0.069 \text{ mm}$ anterior to obex and $2.1 \pm 0.028 \text{ mm}$ lateral to the midline. Its mean resting discharge frequency was $21.82 \pm 2.46 \text{ Hz}$. Its discharge frequency upon dIPAG stimulation was $21.69 \pm 2.65 \text{ Hz}$. There are no significant differences when comparing the frequency changes to the different stimulations. However, 25 neurons modified their discharge upon SGPdl stimulation.

In this group, 8 neurons show a post-stimulus inhibition with an average duration of 185 ms. In 4 other cases inhibition starts between 20 and 75 ms after the SGPdl stimulus and lasts until 130 ms. In 6 cases a mean activation was observed at 17.4 ms (8-34 ms) with a calculated activated axon conduction velocity between 0.38 and 0.44 m/s. In 6 of these previously described neurons, inhibition appears after activation. In 1 case an excitation is observed at 4.5 ms followed by an inhibition lasting 300 ms. In two other cases excitation appears at 4 ms, calculating an axon conduction velocity of 1.65 - 1.9 m/s, and in another case at 20 ms (conduction velocity between 0.33 and 0.38 m/s).

G. Silent neuron

A silent neuron was recorded with a depth of $2320 \mu\text{m}$ and an anteroposterior position of +1 mm anterior to obex and 1.85 mm lateral to the midline. The neuron could be studied because it showed orthodromic activation from the dIPAG. The latency of orthodromic activity from the dIPAG was 4.5 ms, so that a conduction velocity of the activated axon between 1.47 and 1.7 m/s could be calculated.

1.3.3. Interaction of dIPAG and nA: electrical/chemical stimulation and subglottic pressure measurement

dIPAG electrical stimulation and subglottic pressure measurement

In all animals (n=7), the dIPAG electrical stimulation elicited a cardiorespiratory response characterized by tachypnoea ($p < 0,01$), a decrease in laryngeal resistance (subglottal pressure) ($p < 0,01$) and a pressor response ($p < 0,001$) accompanied with tachycardia ($p < 0,001$) (Table 3, Fig 4).

dIPAG PBS microinjections and subglottic pressure measurement

Microinjections of PBS within the dIPAG (n=7) did not produce changes in any of the resting cardiorespiratory parameters (Table 3, Figs 3, 5).

dIPAG Glutamate microinjections and subglottic pressure measurement

Glutamate microinjections within the dIPAG (n=7) evoked a decrease of laryngeal resistance (subglottal pressure) ($p < 0,001$) accompanied with an inspiratory facilitatory response consisted of an increase in respiratory rate ($p < 0,001$), together with a pressor ($p < 0,001$) and tachycardic response ($p < 0,001$) (Table 3, Figs 3, 4, 5).

dIPAG PBS vs Glutamate microinjections and subglottic pressure measurement

When comparing the amplitude of the differences at the laryngeal and cardiorespiratory responses between PBS and Glutamate microinjected animals, higher values in delta heart rate ($0,29 \pm 2,5$ to $45,57 \pm 3,9$; $p = 0,001$), delta blood pressure ($0,00 \pm 1,0$ to $10,57 \pm 0,82$; $p = 0,001$), delta subglottic pressure ($0,05 \pm 0,05$ to $-4,60 \pm 0,24$; $p = 0,001$), and delta respiratory rate ($1 \pm 0,69$ to $29,57 \pm 8,7$; $p = 0,001$) were observed in stimulated animals (Fig 5).

1.4. DISCUSSION

The results of our study demonstrated, using neuromorphological and electroneurophysiological techniques, the existence of functional interactions between the dIPAG, a mesencephalic region known for its involvement in cardiorespiratory regulation, and the nA, a medullary region containing the majority of the motor neurons that govern the laryngeal musculature. Firstly, we demonstrated that electrical stimulation of dIPAG induces a significant increase in cFos-ir expression in the *loose formation* and *compact formation* domains of the nA. Also, we show that the *loose formation* and *semicompact formation* regions are the nA subdivisions with the highest expression of FoxP2-ir, while the *compact* region shows the lowest expression. No significant changes in FoxP2 expression occur after dIPAG stimulation in either region. Furthermore, we described that the co-expression of FoxP2/c-Fos-ir was significant higher in the stimulated animals (37% of the cells FoxP2 positive turn to be c-Fos-ir within the ipsilateral loose formation during dIPAG stimulation). Secondly, a high number (62%) of extracellularly recorded neurones within the nA and vicinity regions modified their activity on electrical stimulation of the dIPAG. Finally, using the "isolated glottis *in situ*" technique together with classical electrophysiological techniques, we demonstrate for the first time that dIPAG is involved in the control of laryngeal resistance.

All these results suggest that, in our experimental conditions, the dIPAG modulates, directly or indirectly, the activity of neurons located within the loose formation of the nA, thereby influencing the striated laryngeal muscles of the upper airway, during the concomitant cardiorespiratory changes evoked by dIPAG electrical or chemical stimulation.

1.4.1. Interaction of dIPAG and nA: c-Fos and FoxP2 expression

The neuronal cell bodies responsible for innervating the intrinsic muscles of the larynx are situated within nA. This cell-column comprises neurons oriented in a rostrocaudal direction and is positioned in the ventrolateral region of the medulla oblongata. Its spatial extent ranges from the motor nucleus of the facial nerve to at least the level of the pyramidal decussation [2]. We could divide the nA into three main parts or domains: *the compact formation*, with motor neurons innervating the

oesophagus; the *semi-compact formation*, with motor neurons innervating the pharynx and the cricothyroid muscle of the larynx, i.e. that which is innervated by the superior laryngeal nerve; and the *loose formation*, with motor neurons innervating the laryngeal muscles except the cricothyroid. It is therefore accepted that laryngeal neurons are located the caudal part of the nA (*semi-compact and loose formation*). Thus, the nA, in addition to innervating the laryngeal muscles, also provides motor innervation to the oesophagus and pharynx [14, 33, 49].

In the present study, the guanethidine, a sympatholytic agent, was administered to prevent secondary c-Fos expression resulting from alterations in arterial blood pressure. Thus, despite the blockage of the cardiovascular changes, the nA presents a significant increase of ipsilateral c-Fos-ir within the three principal domains of the nA after electrical stimulation of the dIPAG. When comparing the differences between stimulated and control animals in the increase of cFos-ir between ipsilateral and contralateral side, only the *loose formation* and *compact formation* presents significant changes in their activity

Therefore, both populations of neurons within the nA seem likely to be activated directly or indirectly from the dIPAG and not secondarily to blood pressure changes evoked from the dIPAG during electrical stimulation. Furthermore, the analysis of cFOS-ir within the nRA, indicates that the dIPAG is not affecting the activity of these nRA neurons. Thus, suggesting that the dIPAG may not play a significant role in the vocalisations emitted during stressful or dangerous situations. Moreover, the changes in c-Fos expression in these regions may be due to the need to maintain a tachypnoeic response developed in the classical defence response vehiculated by this mesencephalic region.

When examining the data of FoxP2 nuclei, we confirmed a high level of expression at the level of *semicompact formation* (controls the vocal fold tension) and *loose formation* (regulates the subglottic pressure during vibration) [28], giving a role to the neurons of these domains in the production of a laryngeal-respiratory motor patterns necessities for the correct production of species-specific vocalisations. It should be noticed that FoxP2 expression levels were not modified by electrical stimulation of the dIPAG. Regarding these quantitative data from FoxP2-ir, it should

be noted that they are in line with previous studies in which numerical approximations were made within these domains [33], confirming that the expression of this transcription factor is a characteristic rather than an expression of cellular activity. Furthermore, when analysing the co-expression of c-Fos-ir/FoxP2-ir, it was observed that during dIPAG stimulation, the 37% of neurons FoxP2 positive presented co-expression with c-FOS-ir, while in the contralateral side was only of 25,7%. When comparing the differences between stimulated and control animals in the increase of co-expression between ipsilateral and contralateral side, significant differences were observed ($p < 0,001$).

1.4.2. Interaction of dIPAG and nA: neural recording

Once the morpho-functional relationship between the dIPAG and the nA was analysed, we wanted to confirm the possible electrophysiological interactions between both regions. To this end, we recorded extracellularly putative nA cells during dIPAG electrical stimulation.

160 putative neurons from the nA and its vicinity regions were registered. All were spontaneously active. Depending on their histological position, their discharge pattern and their correlation with cardiovascular or respiratory function, we have chosen to divide them into 6 different groups:

- A. Inspiratory neurons with decreasing pattern of discharge (n=21) /loose formation
- B. Inspiratory neurons with increasing pattern of discharge (=15) /rVRG
- C. Expiratory E1 neurons. (n=15) /loose formation
- D. Expiratory E2 neurons. (n=7) /loose formation
- E. Cardiovascular neurons. (n=44) / CVL
- F. Neurons without cardiorespiratory modulation. (n= 54)

A significant number of these recorded neurones, in all 6 regions, modified their pattern of discharge from dIPAG stimulation (62%). Thus, confirming the importance of the connections between dIPAG and these medullary regions. 1 neuron was shown to be orthodromically activated, on the basis of short constant latency responses and the collision test. Antidromically activated cells were spontaneously active while

orthodromically activated cells were silent which is an indication of the origin of the somatas. By definition, dIPAG cells were silent. The presence of activated or facilitated cells is an indication of the existence of polysynaptic circuits acting on the nA region. The association of these activations with inhibitions or disfacilitations illustrates the complexity of the different types of synaptic connections. All these data show electrophysiological evidence of interactions between dIPAG and all these medullary regions.

1.4.3. Interaction of dIPAG and nA: electrical/chemical stimulation experiments and subglottic pressure

In our conditions, electrical stimulation was used primarily to locate dIPAG and to study laryngeal patency through the measure of the subglottal pressure. In a second group of animals, we have developed chemical microstimulation with glutamate microinjections within dIPAG. The results obtained with electrical stimulation are difficult to interpret in isolation. However, if we consider both, these results and the results obtained with chemical stimulation, the effects suggested that the elicited laryngeal and cardiorespiratory responses can be attributed to the activation of cell bodies located within the dIPAG, but not to the activation of axons of passage. Both, the chemical and electrical stimulation of the dIPAG produced a sympathoexcitatory response characterized by hypertension, tachycardia and tachypnoea. All these changes were accompanied with a reduction in subglottal pressure. The magnitude of the changes in subglottal pressure and cardiorespiratory variables were similar, except the arterial pressure, using both methods of stimulation

The decrease in subglottic pressure obtained in our experimental conditions suggests that the dIPAG, through direct and indirect connections with pontine (PBc/KF, A5) and medullary respiratory nuclei (nRA, nA), decreases laryngeal resistance. We can hypothesise that central respiratory mechanisms are activated during tachypnoea evoked by the defence response. This may override any increase in laryngeal adductor activity that would be expected if the animal intended to vocalize, resulting in a decrease in laryngeal resistance during tachypnoea. In a recent publication [32], it was described how the PAG could facilitate inspiration by projecting to the preBötzing complex and to the nRA, respectively.

Thus, in conclusion, the dIPAG has a role in modifying the activity of laryngeal motoneurons located within the nA and, accordingly, the striated laryngeal muscles of the upper airway during the defence response. Future works are needed to dilucidated if dIPAG could modify the increase of the activity of laryngeal inspiratory neurons and reducing the activity of expiratory ones to facilitate the tachypnoeic evoked response during the defence response evoked from dIPAG stimulation.

1.5. REFERENCES

1. Bandler R, Keay KA, Floyd N, Price J (2000). Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. *Brain Res Bull* 53:95–104. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(00\)00313-0](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(00)00313-0)
2. Bieger D, Hopkins DA (1987). Viscerotopic representation of the upper alimentary tract in the medulla oblongata in the rat: the nucleus ambiguus. *J Comp Neurol* 262:546-562. <https://doi.org/10.1002/cne.902620408>
3. Carrive P (1993). The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behav Brain Res* 58:27–47. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(93\)90088-8](https://doi.org/10.1016/0166-4328(93)90088-8)
4. 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. *J Neurosci* 42:8252-8261. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0813-22.2022>
5. Dawid-Milner MS, Lara JP, Milan A, González-Barón S (1993). Activity of inspiratory neurones of the ambiguous complex during cough in the spontaneously breathing decerebrate cat. *Exp Physiol* 78:835–838. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1993.sp003730>
6. Dichter BK, Breshears JD, Leonard MK, Chang EF (2018). The control of vocal pitch in human laryngeal motor cortex. *Cell* 174:21-31. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.016>
7. Evans DA, Stempel AV, Vale R, Ruehle S, Lefler Y, Branco T (2018). A synaptic threshold mechanism for computing escape decisions. *Nature* 558:590-594. [doi:10.1038/s41586-018-0244-6](https://doi.org/10.1038/s41586-018-0244-6).
8. Faull OK, Subramanian HH, Ezra M, Pattinson KTS (2019). The midbrain periaqueductal gray as an integrative and interoceptive neural structure for breathing. *Neurosci Biobehav Rev* 98:135–144. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.12.020>
9. González-García M, Carrillo-Franco L, Peinado-Aragónés CA, Díaz-Casares A, Gago B, López-González MV, Dawid-Milner MS (2023). Impact of the glutamatergic neurotransmission within the A5 region on the cardiorespiratory

- response evoked from the midbrain dIPAG. *Pflugers Arch* 475:505–516.
<https://doi.org/10.1007/s00424-022-02777-6>
10. Haesler S, Rochefort C, Georgi B, Licznanski P, Osten P, Scharff C (2007). Incomplete and inaccurate vocal imitation after knockdown of FoxP2 in songbird basal ganglia nucleus Area X. *eLife* 5:e321.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050321>
 11. Haesler S, Wada K, Nshdejan A, Morrisey EE, Lints T, Jarvis ED, Scharff C (2004). FoxP2 expression in avian vocal learners and non-learners. *J Neurosci* 24:3164–3175. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4369-03.2004>
 12. Hartmann K, Brecht M (2020). A Functionally and Anatomically Bipartite Vocal Pattern Generator in the Rat Brain Stem. *iScience* 23:101804.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101804>
 13. Hayward LF, Castellanos M, Davenport PW (2004) Parabrachial neurons mediate dorsal periaqueductal gray evoked respiratory responses in the rat. *J Appl Physiol* 96:1146–1154. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00903>
 14. Hernández-Morato I, Pascual-Font A, Ramírez C, Matarranz-Echeverría J, McHanwell S, Vázquez T, Sañudo JR, Valderrama-Canales FJ (2013). Somatotopy of the neurons innervating the cricothyroid, posterior cricoarytenoid, and thyroarytenoid muscles of the rat's larynx. *Anat Rec (Hoboken)* 296:470–479. <https://doi.org/10.1002/ar.22643>
 15. Hernandez-Morato I, Pitman MJ, Sharma S (2016). Muscle specific nucleus ambiguus neurons isolation and culturing. *J Neurosci Methods* 273:33–39.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.07.014>
 16. Holstege G (1989). Anatomical study of the final common pathway for vocalization in the cat. *J Comp Neurol*, 284: 242–252.
<https://doi.org/10.1002/cne.902840208>
 17. Holstege G, Subramanian HH (2016). Two different motor systems are needed to generate human speech. *J Comp Neurol* 524:558–1577.
<https://doi.org/10.1002/cne.23898>
 18. Jürgens U (2002). Neural pathways underlying vocal control. *Neurosci Biobehav* 26:235–258. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(01\)00068-9](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(01)00068-9)
 19. Jürgens U (2009). The neural control of vocalization in mammals: a review. *J Voice* 23:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2007.07.005>

20. Koutsikou S, Watson TC, Crook JJ, Leith JL, Lawrenson CL, Apps R, Lumb BM (2015). The Periaqueductal Gray Orchestrates Sensory and Motor Circuits at Multiple Levels of the Neuraxis. *J Neurosci* 35:14132-47. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0261-15.2015>
21. Krohn F, Novello M, van der Giessen RS, De Zeeuw CI, Pel JJM, Bosman LWJ (2023). The integrated brain network that controls respiration. *Elife* 12:e83654. <https://doi.org/10.7554/eLife.83654>
22. Lara JP, Dawid-Milner MS, López MV, Montes C, Spyer KM, González-Barón S (2002). Laryngeal effects of stimulation of rostral and ventral pons in the anaesthetized rat. *Brain Res* 934:97–106. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)02364-8](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)02364-8)
23. LeDoux J (2012). Rethinking the emotional brain. *Neuron* 73:653–676. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.004>
24. Linnman C, Moulton EA, Barmettler G, Becerra L, Borsook D (2012). Neuroimaging of the periaqueductal gray: state of the field. *Neuroimage* 60:505–522. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.11.095>
25. López-González MV, Díaz-Casares A, Peinado-Aragonés CA, Lara JP, Barbancho MA, Dawid-Milner MS (2013). Neurons of the A5 region are required for the tachycardia evoked by electrical stimulation of the hypothalamic defence area in anaesthetized rats. *Exp Physiol* 98:1279–1294. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2013.072538>
26. López-González MV, González-García M, Peinado-Aragonés CA, Barbancho MÁ, Díaz-Casares A, Dawid-Milner MS (2020). Pontine A5 region modulation of the cardiorespiratory response evoked from the midbrain dorsolateral periaqueductal grey. *J Physiol Biochem* 76:561–572. <https://doi.org/10.1007/s13105-020-00761-1>
27. Ludlow CL (2011). Central nervous system control of interactions between vocalization and respiration in mammals. *Head Neck* 33:S21–S25. <https://doi.org/10.1002/hed.21904>
28. Lungova V, Thibeault SL (2020). Mechanisms of larynx and vocal fold development and pathogenesis. *Cell Mol Life Sci* 77:3781-3795. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03506-x>

29. Merrill EG (1970). The lateral respiratory neurones of the medulla: their associations with nucleus ambiguus, nucleus retroambiguus, the spinal accessory nucleus and the spinal cord. *Brain Res* 24:11–28. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(70\)90271-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(70)90271-4)
30. Motta SC, Carobrez AP, Canteras NS (2017). The periaqueductal gray and primal emotional processing critical to influence complex defensive responses, fear learning and reward seeking. *Neurosci Biobehav Rev* 76:39-47. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.10.012>
31. Nudel R, Newbury DF (2013). FoxP2. *Wiley Interdiscip Rev Cogn Sci* 5:547-560. <https://doi.org/10.1002/wcs.1247>
32. 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 (New York, N.Y.)*, 383(6687), eadi8081. <https://doi.org/10.1126/science.adi8081>
33. Pascual-Font A, Hernández-Morato I, McHanwell S, Vázquez T, Marañillo E, Sañudo J, Valderrama-Canales FJ (2011). The central projections of the laryngeal nerves in the rat. *J Anat* 219:217–228. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2011.01390.x>
34. Pathak S, Slovarp L, Clary MS, Jetté ME (2020). Laryngeal Chemoreflex in Health and Disease: A Review. *Chem Senses* 45:823-831. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjaa069>
35. Paxinos G, Watson C (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th Ed. San Diego, Elsevier Academic Press.
36. Schmidt MF, Wild JM (2014) The respiratory-vocal system of songbirds: anatomy, physiology, and neural control. *Prog Brain Res* 212:297-335. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63488-7.00015-X>
37. Schulz SB, Haesler S, Scharff C, Rochefort C (2010). Knockdown of FoxP2 alters spine density in Area X of the zebra finch. *Genes Brain Behav* 9:732-40. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2010.00607.x>
38. Shu W et al (2005). Altered ultrasonic vocalization in mice with a disruption in the Foxp2 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:9643–9648. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503739102>

39. Shu W, Yang H, Zhang L, Lu MM, Morrisey EE (2001). Characterization of a new subfamily of winged-helix/forkhead (Fox) genes that are expressed in the lung and act as transcriptional repressors. *J Biol Chem* 276:27488–27497. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100636200>
40. Singh U et al (2022). Neuroanatomical organization and functional roles of PVN MC4R pathways in physiological and behavioral regulations. *Mol Metab* 55:101401. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101401>
41. Stanić D, Dhingra RR, Dutschmann M (2018). Expression of the transcription factor FoxP2 in brainstem respiratory circuits of adult rat is restricted to upper-airway pre-motor areas. *Respir Physiol Neurobiol* 250:14-18. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2018.01.014>
42. Subramanian HH, Balnave RJ, Holstege G (2021). Microstimulation in Different Parts of the Periaqueductal Gray Generates Different Types of Vocalizations in the Cat. *J Voice* 35:804.e9–804.e25. <https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2020.01.022>
43. Subramanian HH, Holstege G (2009). The nucleus retroambiguus control of respiration. *J Neurosci* 29:3824–3832. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0607-09.2009>
44. Subramanian HH, Holstege G (2014). 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* 212:351-84. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63488-7.00017-3>
45. Subramanian HH, Huang ZG, Silburn PA, Balnave RJ, 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. *J Comp Neurol* 526:229-242. <https://doi.org/10.1002/cne.24318>
46. Tovote P (2016). Midbrain circuits for defensive behaviour. *Nature* 534:206-12. [doi:10.1038/nature17996](https://doi.org/10.1038/nature17996)
47. Trevizan-Baú P, Dhingra RR, Furuya WI, Stanić D, Mazzone SB, Dutschmann M (2021). Forebrain projection neurons target functionally diverse respiratory control areas in the midbrain, pons, and medulla oblongata. *J Comp Neurol* 529:2243–2264. <https://doi.org/10.1002/cne.25091>

48. Vanderhorst VG, Terasawa E, Ralston HJ, Holstege G (2000). Monosynaptic projections from the lateral periaqueductal gray to the nucleus retroambiguus in the rhesus monkey: implications for vocalization and reproductive behavior. *J Comp Neurol* 424:251-268. [https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20000821\)424:2%3C251::AID-CNE5%3E3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20000821)424:2%3C251::AID-CNE5%3E3.0.CO;2-D)
49. 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>

Table 1

Relative quantification and distribution of c-Fos and FoxP2 immunoreactive cells (cFos-ir and FoxP2-ir) within the nA and in not stimulated animals (control) and dIPAG electrically stimulated animals (stimulated). Both groups are spontaneously breathing rats in which sympathetically mediated cardiovascular changes were abolished with guanethidine. The nA has been divided into its 3 classical domains (loose, semi-compact and compact) and ipsilateral and contralateral sides were also analysed.

NEUROMORPHOLOGICAL STUDY					
		CONTROL (n=5)		STIMULATED (n=5)	
		Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral
LOOSE FORMATION	c-Fos-ir cells	29.6 ± 5.1**	18.2 ± 2.7	42.8 ± 5.8***	22.6 ± 4.9
	FoxP2-ir cells	115 ± 18.9	93.4 ± 14.8	115.4 ± 15.5*	88.8 ± 17.6
	Delta c-Fos-ir	11.4 ± 2.4		20.2 ± 2.4†	
	Delta FoxP2-ir	21.6 ± 8.1		26.6 ± 2.1	
SEMICOMPACT FORMATION	c-Fos-ir cells	23.6 ± 3.8**	14.6 ± 3.3	31 ± 3.3***	16.8 ± 2.4
	FoxP2-ir cells	105 ± 34.8	75.3 ± 26.6	104.5 ± 26.2*	81.5 ± 24.0
	Delta c-Fos-ir	9 ± 1.7		14.2 ± 1.8	
	Delta FoxP2-ir	29.8 ± 12.6		23 ± 5.4	
COMPACT FORMATION	c-Fos-ir cells	1.6 ± 0.2	1.4 ± 0.2	3.4 ± 0.8*	0.4 ± 0.4
	FoxP2-ir cells	10.8 ± 2.3	4.5 ± 0.9	10 ± 4.7	6.5 ± 3.7
	Delta c-Fos-ir	0.2 ± 0.2		3 ± 0.8†	
	Delta FoxP2-ir	6.3 ± 1.8		3.5 ± 1.2	
LOOSE FORMATION	Co-Expression FoxP2/c-Fos	26,2%	21,3%	36,9%**	25,7%
	Delta	4,9		11,2††	

Notes: Data are expressed as mean ± SEM. Asterisks show differences between ipsilateral and contralateral sides in control or stimulated animals. (* p<0.05; ** p<0.01; ***p<0.001). Daggers show differences between the delta differences between control and stimulated groups († p< 0.05).



Table 2

Summary of results from extracellular neuronal recordings of putative cells located within the nA and its vicinity during dIPAG stimulation Registered cells have been divided into its 6 different groups.

NEUROELECTROPHYSIOLOGICAL STUDY						
	N	PROF (µm)	POSITION (mm)	FREQ. REST (Hz)	FREQ. SGPdl (Hz)	ACTIVITY MODIFIED
INSP DECREASE	21	2226,67 ± 115,8	+0,58 ± 0,087 ant 1,83± 0,051 lat	46,4 ± 9,91	46,38 ± 10,08	76 %
INSP INCREASE	15	2609,80 ± 132,04	+0,78 ± 0,091 ant 2,05± 0,033 lat	34,25 ± 9,59	33,70 ± 8,89	47 %
E1	15	2475,33 ± 91,75	+0,24 ± 0,089 1,85± 0,036	16,90 ± 4,02	16,98 ± 3,84	67 %
E2	7	2229,43 ± 268,44	+0,55 ± 0,221 1,83± 0,071	12,80 ± 4,62	10,98 ± 4,01	86 %
CV	44	2955,05 ± 67,1	+0,54 ± 0,076 2,16± 0,034	15,97 ± 2,27	16,43 ± 2,3	52 %
S/M	54	2834,30 ± 63,04	+0,55 ± 0,069 1,8± 0,028	21,82 ± 2,46	21,69 ± 2,65	46 %

Data are expressed as mean ± SEM.

Table 3

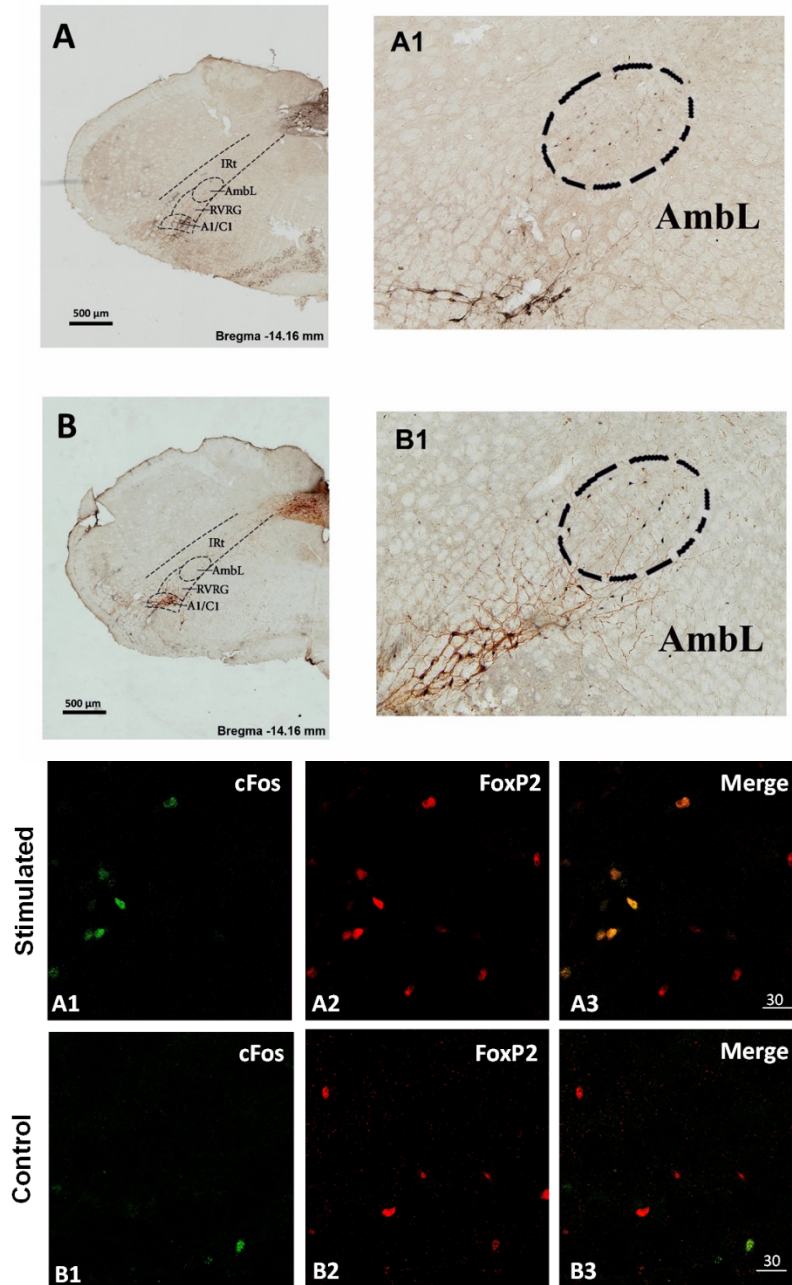
Laryngeal and cardiorespiratory parameters measured **before** electrical or chemical stimulation of dIPAG (**Rest**), **during** electrical or chemical stimulation (microinjections of PBS or Glutamate) within the dIPAG (**Stimulation**) and 4 minutes **after** electrical or 30 minutes **after** chemical stimulation of dIPAG (**Recovery**).

NEUROPHARMACOLOGICAL STUDY			
ELECTRICAL	Rest	Stimulation	Recovery
dIPAG (n=7)			
RR (rpm)	104 ± 9	145 ± 15**	105 ± 9
TE (s ⁻¹)	0.343 ± 0.028	0.233 ± 0.021**	0.341 ± 0.025
TI (s ⁻¹)	0.261 ± 0.021	0.209 ± 0.026*	0.259 ± 0.019
SGP (cmH ₂ O)	8.1 ± 1.3	3.3 ± 0.3**	8.1 ± 1.4
BP (mmHg)	106 ± 3	148 ± 6***	104 ± 4
HR (bpm)	408 ± 10	435 ± 10***	410 ± 7
PBS	Rest	Stimulation	Recovery
dIPAG (n=7)			
RR (rpm)	85 ± 7	86 ± 7	85 ± 7
TE (s ⁻¹)	0.394 ± 0.001	0.385 ± 0.002	0.393 ± 0.001
TI (s ⁻¹)	0.311 ± 0.001	0.312 ± 0.001	0.312 ± 0.001
SGP (cmH ₂ O)	10.4 ± 0.6	10.5 ± 0.6	10.4 ± 0.6
BP (mmHg)	103 ± 3	104 ± 2	103 ± 2
HR (bpm)	394 ± 8	395 ± 7	393 ± 10
GLUTAMATE	Rest	Stimulation	Recovery
dIPAG (n=7)			
RR (rpm)	81 ± 5	111 ± 13***	83 ± 6
TE (s ⁻¹)	0.474 ± 0.038	0.346 ± 0.037***	0.472 ± 0.035
TI (s ⁻¹)	0.287 ± 0.009	0.244 ± 0.023*	0.286 ± 0.008
SGP (cmH ₂ O)	9.4 ± 0.4	4.6 ± 0.4***	9.8 ± 0.6
BP (mmHg)	105 ± 3	116 ± 4***	107 ± 4
HR (bpm)	391 ± 8	436 ± 8***	393 ± 10

Notes: Data are expressed as mean ± SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 Stimulation vs Rest. RR, Respiratory Rate; TE, Expiratory Time; TI, Inspiratory Time; SGP, Subglottic Pressure; BP, Blood Pressure; HR, Heart Rate.

Figure 1

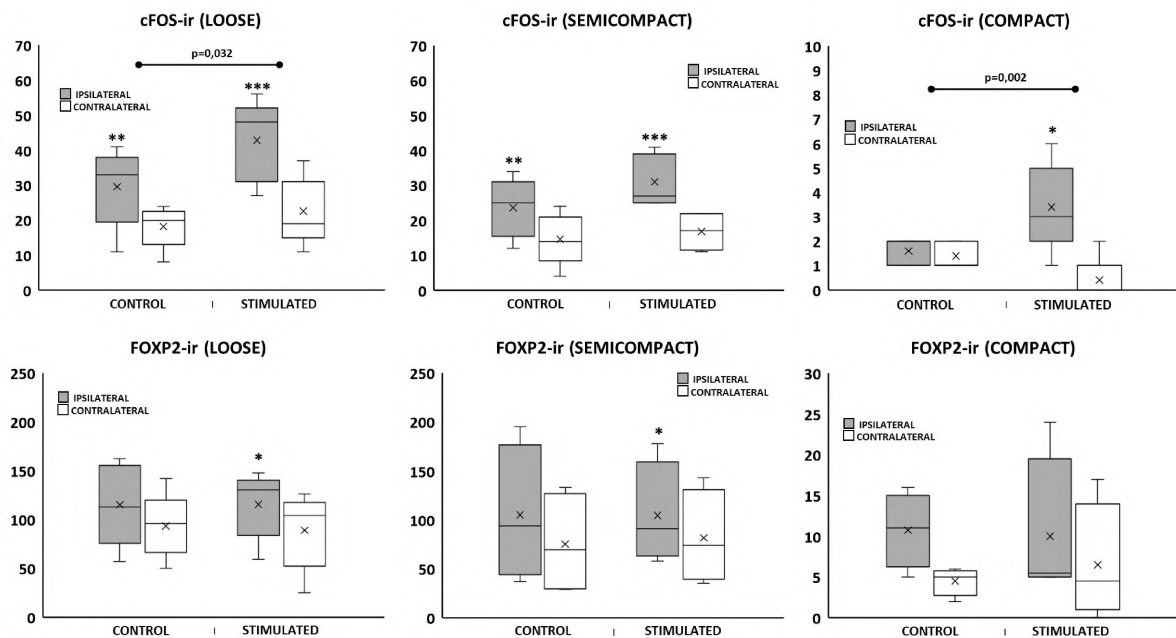
Top: Photomicrographs of coronal sections of the medulla oblongata (stimulated animal). **Down:** photomicrographs showing co-expression of FoxP2-ir/c-Fos-ir within the Loose Formation of the nA.



Notes: **Top:** it includes the loose formation of the nucleus Ambiguus (nA) (Bregma -14.16mm), showing immunoreactivity (ir) for Tyrosine Hydroxylase (TH) and either FoxP2 (A, A1) or c-Fos (B, B1). A1: enlarge representative ipsilateral side FoxP2/TH-ir cells; B1: enlarge representative ipsilateral side c-Fos/TH-ir cells. C1/A1, adrenaline/noradrenaline cells; RVRG, rostral ventral respiratory group; AmbL, ambiguus nucleus (Loose formation); IRt, intermediate reticular nucleus.

Figure 2

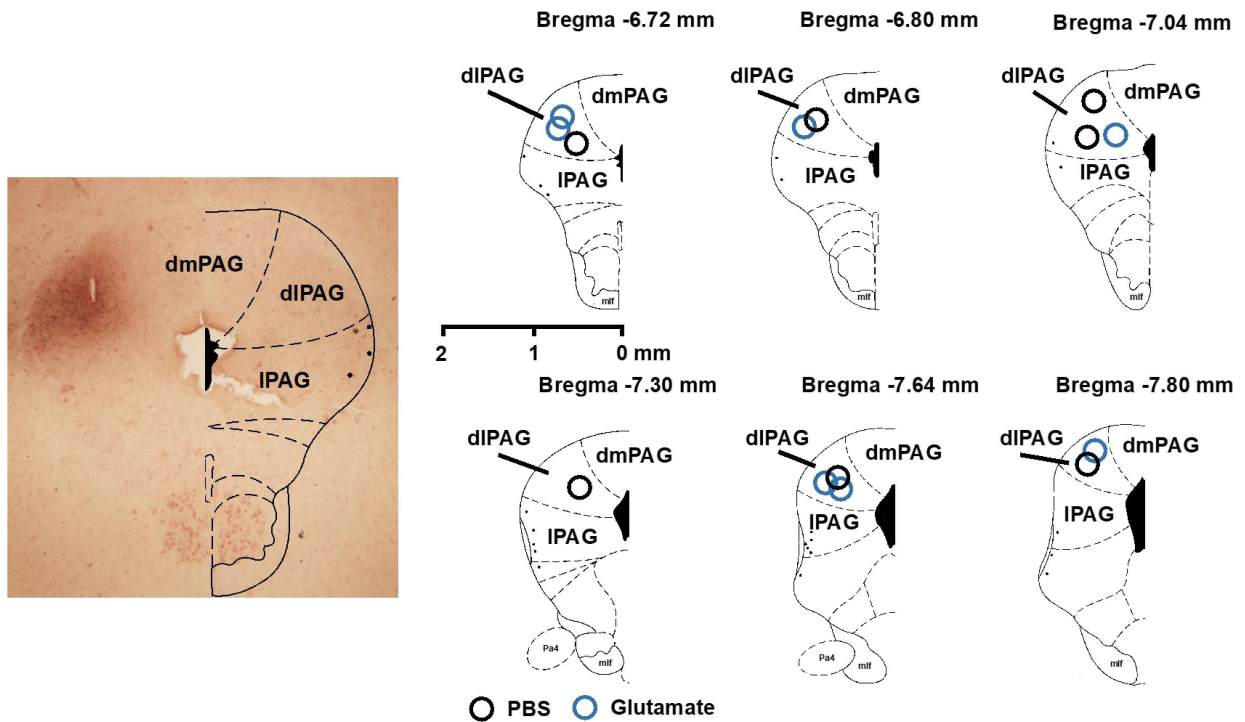
Box-Whisker graphs showing *c-Fos* and *FoxP2-ir* experiments results



Notes: Box-Whisker graphs showing the significant delta change for the number of immunolabelled cells for *c-Fos-ir* or *FoxP2-ir* between ipsilateral and contralateral sides, comparing control and dIPAG stimulated (stimulated) animals within the three domains of the nucleus Ambiguus (nA). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ ipsilateral (filled box) vs contralateral (empty box).

Figure 3

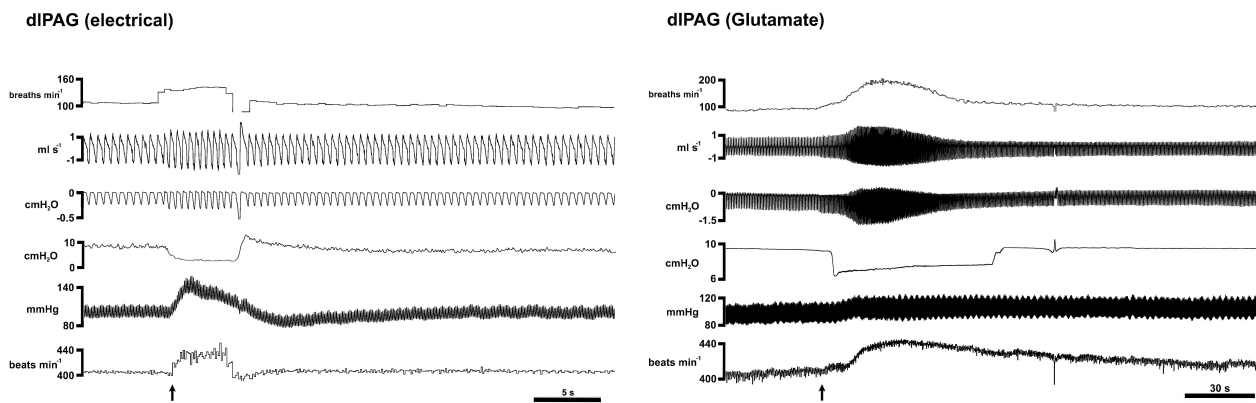
Semi-schematic line drawings of coronal sections from rostral (top left) to caudal (bottom right) areas through the dIPAG



Notes: to illustrate the arrangement for chemical microinjections of PBS-Evans Blue (blue circle) or glutamate (black circle) within the dIPAG. dmPAG, dorso-medial periaqueductal grey; dIPAG, dorso-lateral periaqueductal grey; IPAG, lateral periaqueductal grey; vIPAG, ventro-lateral periaqueductal grey. (mlf) medial longitudinal fasciculus. (Pa4) paratrochlear nucleus.

Figure 4

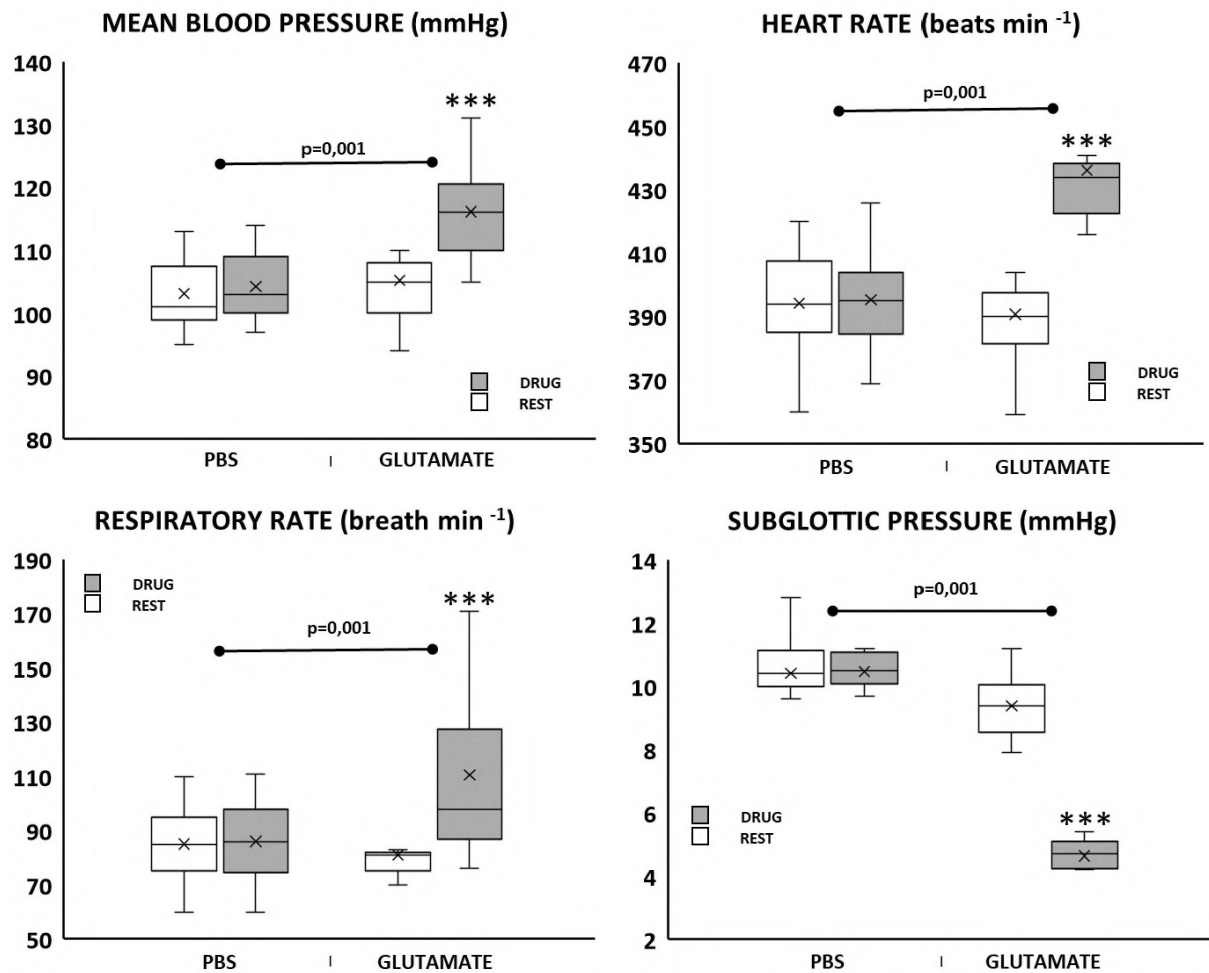
Laryngeal and cardiorespiratory response evoked to dIPAG electrical and glutamate stimulation



Notes: instantaneous respiratory rate (upper trace, breaths min⁻¹), respiratory flow (ml/s), pleural pressure (cm H₂O), subglottic pressure (cmH₂O), blood pressure (mmHg) and instantaneous heart rate (beats min⁻¹) in a spontaneously breathing rat showing the laryngeal and cardiorespiratory response evoked to dIPAG electrical stimulation (A) and dIPAG glutamate stimulation (B). Black arrow shows the onset of the dIPAG stimulation.

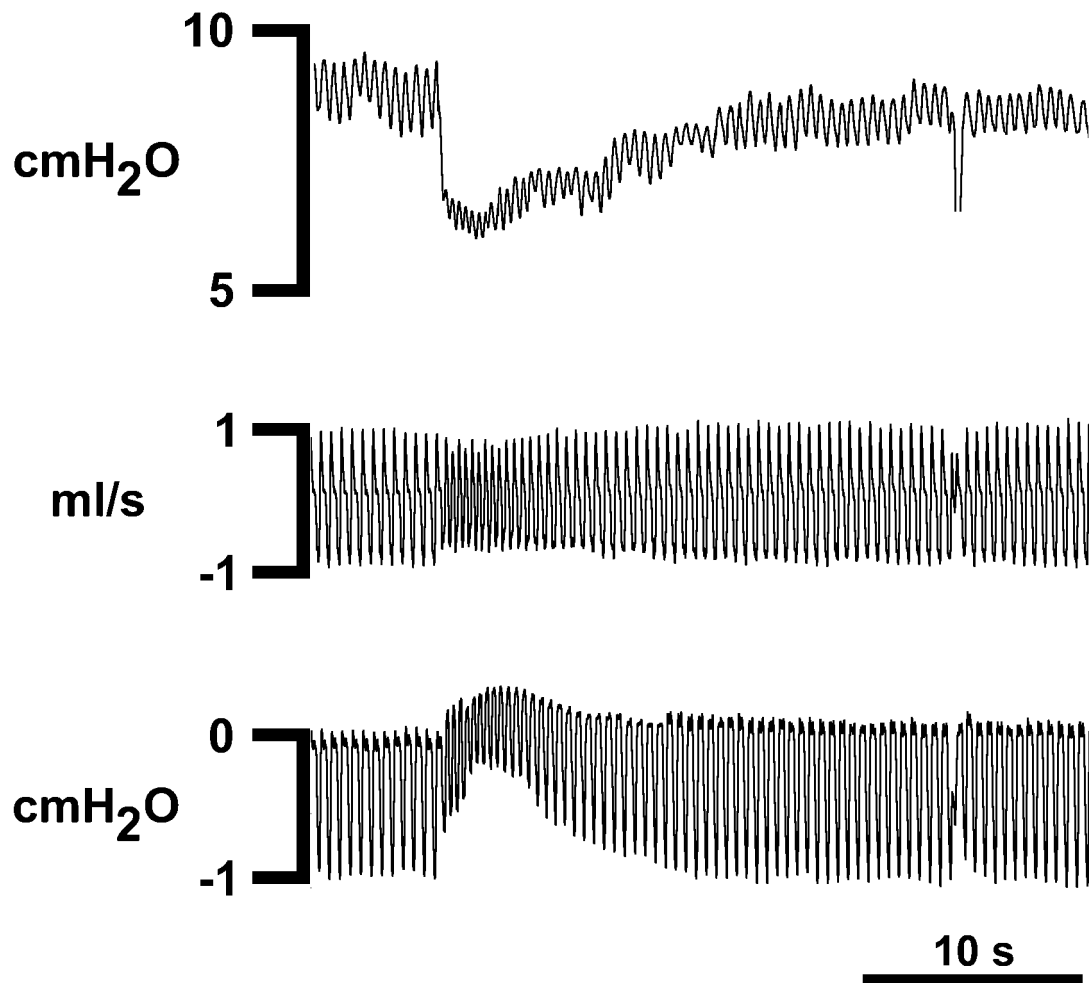
Figure 5

Box-Whisker graphs with laryngeal and cardiorespiratory responses



Notes: Box-Whisker graphs showing the significant delta change for laryngeal and cardiorespiratory responses (mean blood pressure, heart rate, respiratory rate and subglottic pressure) between Rest (empty box) and Stimulation (filled box) states comparing PBS-Evans blue or glutamate microinjections within the dIPAG. *** $p < 0.001$ Stimulation vs Rest.

Supplementary material. From top to bottom: subglottic pressure (cmH₂O), respiratory flow (ml/s) and pleural pressure (cm H₂O) in a spontaneously breathing rat showing the respiratory modulatory effect over the laryngeal response evoked to dIPAG electrical stimulation.



INTRODUCCIÓN



2. INTRODUCCIÓN

La emisión vocal en animales es un fenómeno que implica complejas interacciones entre distintas regiones cerebrales. La capacidad de emitir sonidos y comunicarse es crucial para el ser humano y también para la gran mayoría de las especies. En el caso de los seres humanos, la comunicación es excepcionalmente compleja abarcando aspectos culturales y sociales, mientras que en los animales está vinculada principalmente a la supervivencia y la reproducción. Aunque ambos comparten la capacidad de transmitir información, la forma y el alcance de esta comunicación varían significativamente.

Es importante distinguir varios conceptos relacionados con este proceso de comunicación. La fonación se refiere al proceso de producción de sonidos mediante la vibración de las cuerdas vocales para crear sonidos básicos. La vocalización, por su parte, implica la articulación o producción de sonidos específicos para comunicarse, representando una combinación de sonidos. Por último, el habla es la expresión más completa y compleja del lenguaje, que abarca la comunicación significativa a través de palabras y frases, y representa el nivel más alto en la jerarquía de la comunicación verbal.

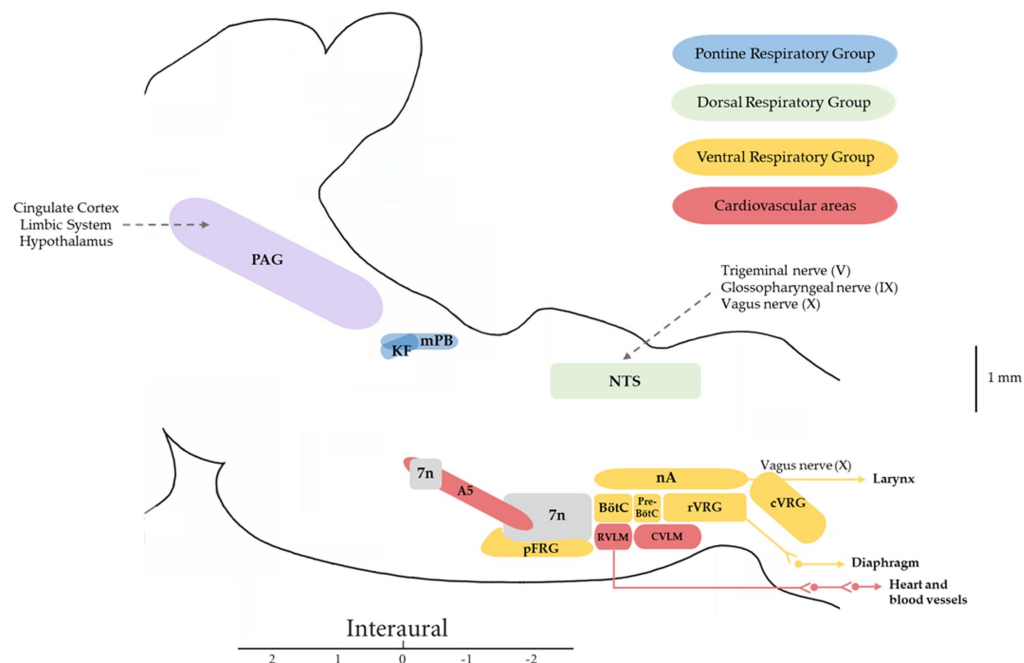
Con el objetivo de comprender mejor el desarrollo del habla en los seres humanos, se han estudiado diversos aspectos de la vocalización en diferentes mamíferos, desde ratas hasta simios. La vocalización requiere de una coordinación exquisita entre fonación y respiración, en las que interviene una amplia red neuronal incluyendo regiones anteriores del encéfalo, mesencefálicas, y pontomedulares (Jürgens, 2009; Tschida et al., 2019) (Figura 1).

El sistema respiratorio no solo suministra el oxígeno necesario para satisfacer las demandas metabólicas a lo largo de la vida, sino que también desempeña un papel fundamental en todo este proceso de vocalización (Del Negro et al., 2018). Los músculos de la caja torácica son los encargados de proporcionar la fuerza necesaria para que se produzca, en un primer momento, la inspiración, siendo los principales músculos inspiratorios el diafragma y los músculos intercostales externos (De Troyer y Estenne, 1984; De Troyer et al., 1998; De Troyer

et al., 2005; Torres-Tamayo et al., 2018; Welch et al., 2019; LoMauro y Aliverti, 2021). Mientras que, durante la espiración activa, son los músculos espiratorios, concretamente, los intercostales internos y abdominales, los que se activan (De Troyer et al., 2005; Welch et al., 2019; Krohn et al., 2023).

Figura 1

Esquema de las principales regiones mesencefálicas y pontomedulares implicadas en el control cardiorrespiratorio y laríngeo.



Nota: la sustancia gris periacueductal (SGP) modula la actividad en curso en los circuitos respiratorios pontomedulares en respuesta a la información conductual y cognitiva; el grupo respiratorio pontino (GRP) incluye el núcleo de Kolliker-Fuse (KF) y el parabraquial medial (PBm) y está implicado en el control de la desconexión entre la inspiración y la espiración; el grupo respiratorio dorsal (GRD) incluye el núcleo del tracto solitario (NTS), recibe información sensorial de los pulmones y los quimiorreceptores e interviene en el control de la inspiración; el grupo respiratorio ventral (VRG) incluye el complejo pre-Botzinger (Pre-BotC) implicado en la generación de la respiración rítmica, el complejo Botzinger (BotC) con neuronas espiratorias, el núcleo retrotrapezoidal y el grupo respiratorio parafacial (RTN/pFRG) con neuronas quimiosensibles, núcleo ambiguo (nA) donde se localizan las motoneuronas laríngeas, grupo respiratorio ventral rostral (rVRG) con neuronas inspiratorias y grupo respiratorio ventral caudal (cVRG) con neuronas espiratorias. La región A5, el bulbo rostro-ventral-lateral (RVLM) y la médula caudal-ventral-lateral (CVLM) son regiones implicadas en el control cardiovascular.

La producción vocal se basa en movimientos respiratorios, lo que significa que los circuitos centrales implicados en la vocalización están acoplados a las neuronas generadoras de patrones respiratorios, es decir, todo el circuito vocal está integrado en el circuito respiratorio (Riede et al., 2019). Estas conexiones centrales responsables de la vocalización se encuentran altamente integradas y coordinadas, siendo la Sustancia Gris Periacueductal (SGP) y el núcleo Ambiguo (nA) dos de las áreas más importante involucradas. La primera de ellas se encuentra en la región mesencefálica del tronco del encéfalo y desempeña un papel fundamental en la regulación e integración de la respuesta de defensa y la vocalización gracias su gran interconexión, tanto con el cerebro anterior como con la protuberancia. La segunda se encarga de la regulación y activación de los músculos involucrados en estas emisiones vocales, ya que en ella se localizan las motoneuronas laríngeas.

La vocalización, en definitiva, es un fenómeno intrínseco a muchas especies e implica una intrincada red de conexiones cerebrales que coordinan la producción de sonidos característicos. En este complejo sistema, la laringe desempeña un papel crucial, siendo el órgano responsable de modular el flujo de aire desde los pulmones hacia las cuerdas vocales. La comprensión de las interacciones cerebrales implicadas y el funcionamiento de la laringe durante la emisión vocal es esencial para entender los mecanismos implicados en el proceso comunicativo. En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de las dos regiones mencionadas anteriormente: la SGP y el nA. Hemos estudiado la interacción entre estas estructuras y su influencia sobre la presión subglótica, presión generada por el flujo respiratorio por debajo de las cuerdas vocales, que es una variable fundamental para la vocalización.

A continuación, mostraremos brevemente los conocimientos actuales existentes acerca del papel que tienen estas estructuras en distintas respuestas del animal y cómo influyen en la respuesta laríngea relacionada con la vocalización.

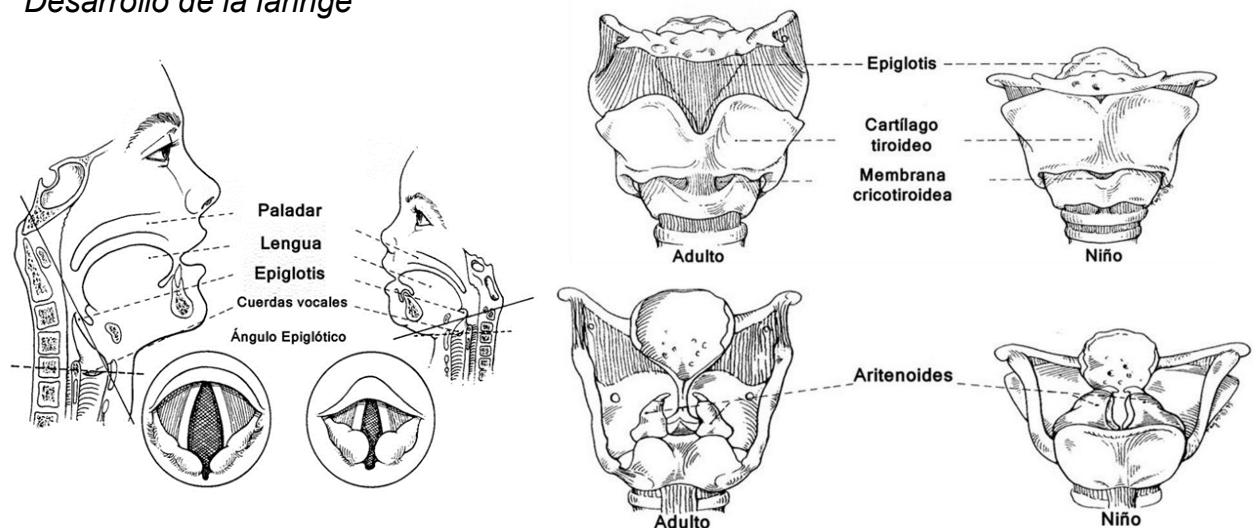
2.1. LA LARINGE COMO INSTRUMENTO DE LA VOCALIZACIÓN

La laringe es un órgano tubular que se encuentra en la parte anterior del cuello, a la altura de C4-C7 en adultos. Es un órgano multifuncional que no solo participa en la respiración, sino que también desempeña un papel crucial en la producción de los sonidos del habla y la comunicación, al tiempo que protege las vías respiratorias.

El desarrollo de la laringe podemos dividirlo en dos etapas. La primera abarca desde el nacimiento hasta los 2 años, momento en el que la laringe se encuentra a la altura de las vértebras cervicales C1-C4, lo que permite una coordinación respiración-deglución correcta en los bebés. En la segunda etapa, a partir de los 2 años, la laringe desciende hasta C4-C7, posición que permite aumentar el rango fonatorio a cambio de separar las funciones de deglución y respiración (Figura 2).

Figura 2

Desarrollo de la laringe



Nota: los recién nacidos y lactantes presentan diferencias anatómicas de la vía aérea, tamaño y posicionamiento de los cartílagos laríngeos, con respecto a los adultos. De "Airway Management: Principles and Practice" por Benumof Jonathan, L., 1st Edition 1996, Preface.

Desde el punto de vista estructural, podemos dividir la laringe en tres áreas distintas: el área supraglótica, zona que abarca desde la epiglotis hasta las bandas ventriculares o los falsos pliegues vocales; el área glótica, donde se encuentran las cuerdas vocales y, por último, el área subglótica, formada por la parte inferior de la laringe, desde la glotis hasta el inicio de la tráquea.

En cuanto a su estructura básica, la laringe está formada por cartílagos, por membranas y ligamentos, por músculos laríngeos, intrínsecos y extrínsecos y, por una mucosa que reviste todas las cavidades que forman la laringe.

2.1.1. Cartílagos laríngeos

El esqueleto de la laringe está formado por 9 cartílagos (tres de ellos pareados) que la dotan de flexibilidad y estabilidad al mismo tiempo. Los cartílagos tiroideos y cricoides son los más grandes y proporcionan un soporte estructural. El primero funciona como un escudo que protege la laringe y se encuentra unido al hueso hioides a través de ligamentos. En la zona inferior, se articula con el cricoides, articulación que permite la basculación del cartílago tiroideos, lo que afecta a la elongación de las cuerdas vocales durante la fonación. Sobre este cartílago cricoides se articulan también los aritenoides y, sobre éstos, los cartílagos corniculados y cuneiformes. Esta articulación cricoaritenoidea es la que influye en la tensión de los pliegues vocales, así como su abducción (apertura glótica) o aducción (cierre glótico). La epiglotis es otro cartílago que forma parte de la laringe, pero interviene solo en la protección de las vías aéreas (Figura 3).

Estudios anatómicos-descriptivos han revelado una gran similitud tanto en la estructura como en la función de la laringe y cuerdas vocales en humanos y roedores, ya que ambas especies comparten los cartílagos epiglotis, tiroideos, cricoides y aritenoides. Sin embargo, los humanos cuentan también con los cartílagos cuneiformes y corniculados y, específico de los roedores, encontramos el cartílago alar, el cual se encuentra por encima de la fijación ventral de las cuerdas vocales y, según las últimas investigaciones, estaría implicado en la vocalización ultrasónica propia de estos roedores (Marques et al., 2007; Thomas et al., 2008, 2009; Mahrt et al., 2016; Riede et al., 2017).

Figura 3*Cartílagos laríngeos*

Nota: (A) Cartílago epiglotis (B) Carillas articulares del cartílago cricoides y vista general de la estructura cartilaginosa de la laringe (C) Cartílago cricoides (D) Cartílagos aritenoides y articulación cricoaritenoides (E) Movimiento de basculación del cartílago tiroideo sobre el cartílago cricoides (F) Movimiento de aducción y abducción de las cuerdas vocales gracias al movimiento de la articulación cricoaritenoides. De "Gray. Anatomía básica" por Drake, R.L., Vogl, W., Mitchell, A., 3ª Edición 2023.

2.1.2. Musculatura laríngea

La laringe es una estructura móvil gracias a los cartílagos descritos anteriormente, a una musculatura extrínseca que se encarga de movilizar la laringe en bloque (ascenso o descenso) y a una musculatura intrínseca que influye en la apertura y cierre de las cuerdas vocales, así como en su elongación o acortamiento durante la fonación (Figura 4a y Figura 4b).

La musculatura extrínseca de la laringe se compone de músculos que están ubicados fuera de la misma, pero que tienen conexiones y acciones que afectan directamente a esta estructura. Estos músculos contribuyen al movimiento y la posición de la laringe en el cuello.

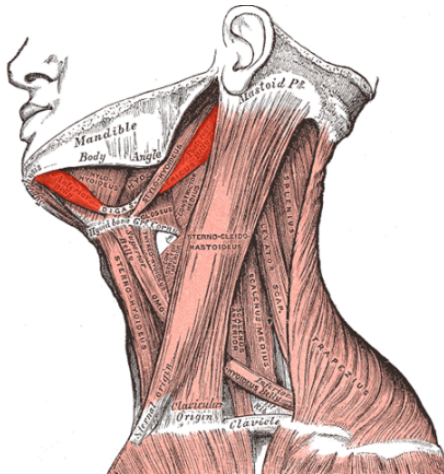
Por encima de la laringe nos encontramos con los músculos suprahioides, los cuales se encargan de la elevación de la laringe, por lo que están involucrados en la deglución. Estos músculos son: músculos digástrico, milohioideo, genihioides y estilohioideo. Por otro lado, debajo de la laringe nos encontramos con los músculos infrahioides, los cuales influyen en la estabilización del hueso hioides y la laringe. Estos músculos son el esternotiroideo, el tirohioides y el omohioideo.

Aunque estos músculos no están directamente involucrados en la fonación y la producción de sonidos en la laringe, sí contribuyen al control de la posición y el movimiento de la laringe durante la deglución, la respiración y otras actividades relacionadas. Además, la coordinación de esta musculatura extrínseca con la musculatura intrínseca es esencial para mantener funciones vocales y respiratorias adecuadas (Lungova y Thibeault, 2020).

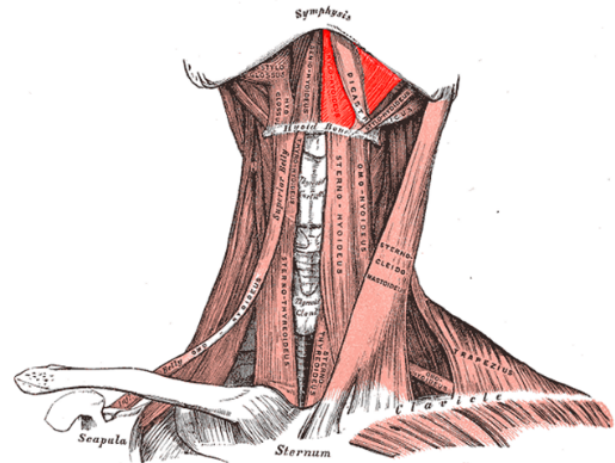
Figura 4a

Musculatura extrínseca de la laringe (músculos suprahioides)

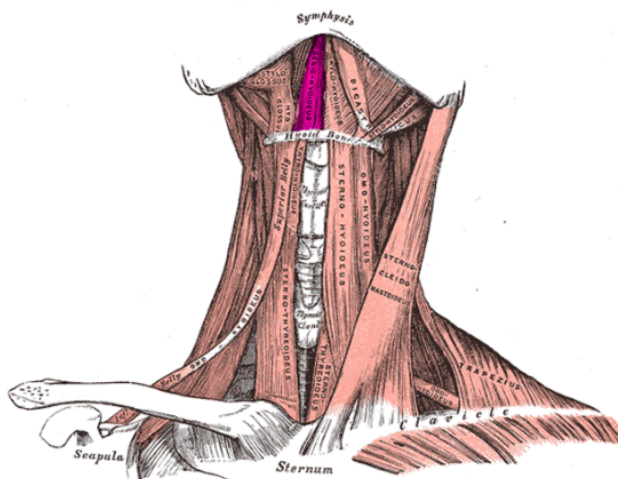
A



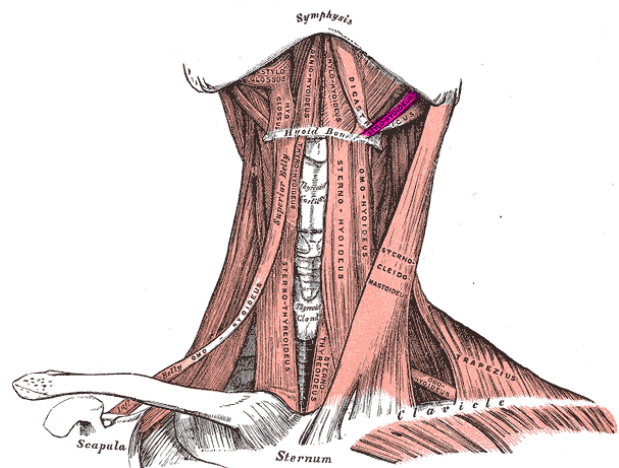
B



C



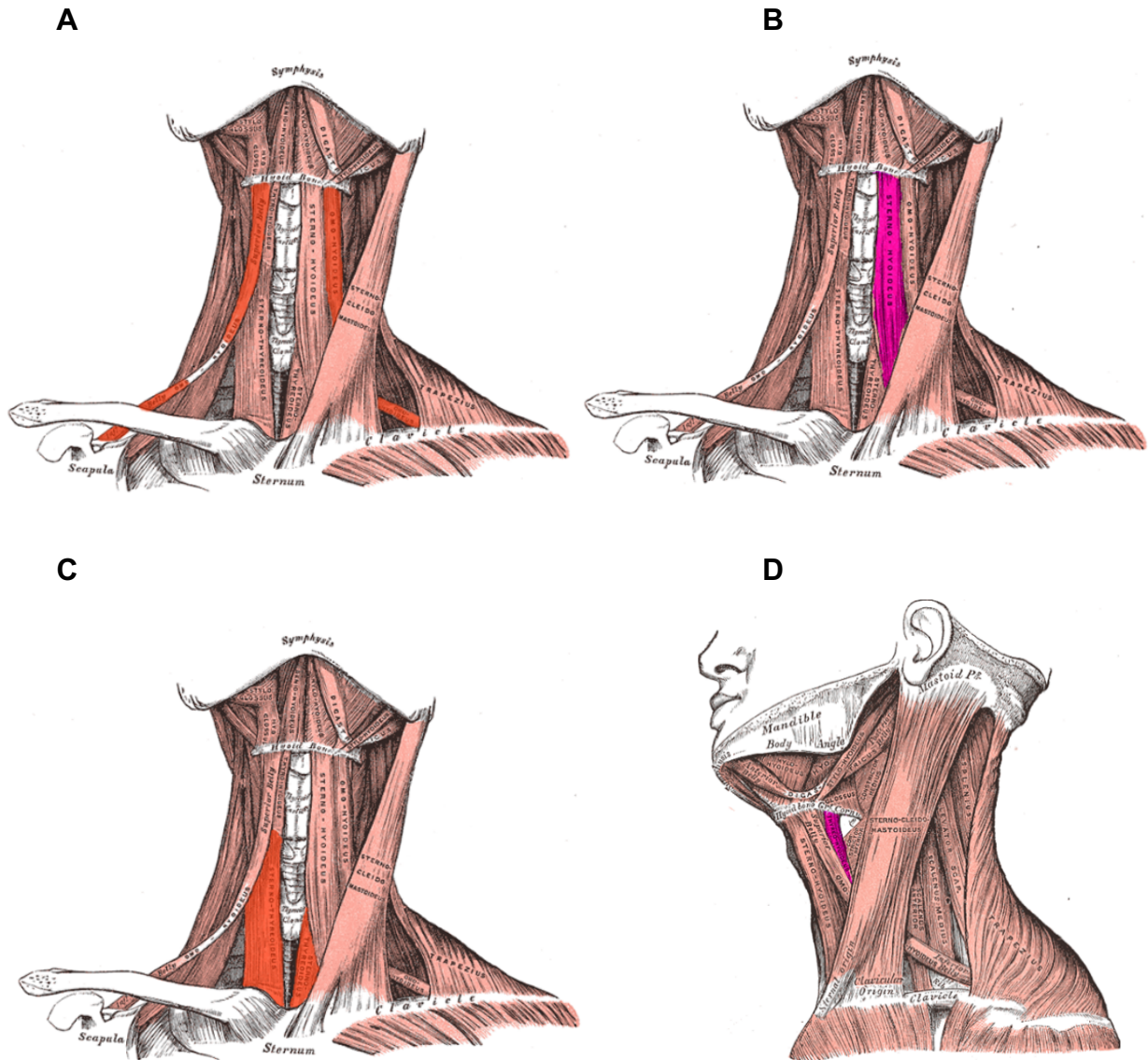
D



Nota: (A) Vista lateral del cuello, se distingue el músculo digástrico. (B) Vista anterior de la región cervical anterior, se distingue el milohioideo. (C) Vista anterior de la región cervical anterior, se distingue el músculo geniohioides. (D) Vista frontal de cuello, se destaca el músculo estilohioideo. De "Anatomía del cuerpo humano" por Gray, H., 20ª Edición 1918.

Figura 4b

Musculatura extrínseca de la laringe (músculos infrahioideos)

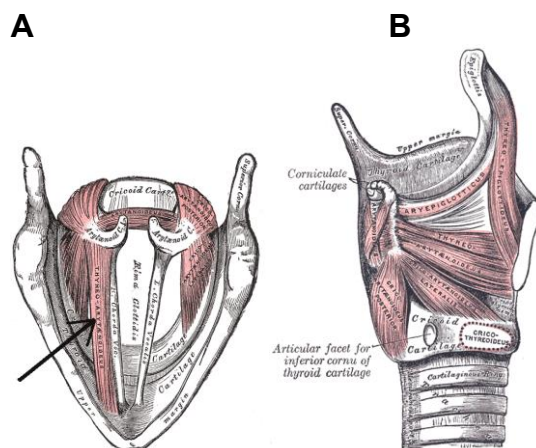


Nota: (A) Vista anterior del cuello, se distingue el músculo omohioideo. (B) Vista anterior del cuello, se distingue el músculo esternohioideo. (C) Vista anterior del cuello, se distingue el músculo esternotiroideo (D) Vista lateral del cuello, se distingue el músculo tirohioideo. De “Anatomía del cuerpo humano” por Gray, H., 20ª Edición 1918.

Con musculatura intrínseca de la laringe nos referimos a aquellos músculos que se encuentran dentro de la propia laringe y que desempeñan un papel crucial en la producción del sonido. Estos músculos son responsables de controlar la tensión, longitud y posición de las cuerdas vocales, lo que afecta directamente a la calidad y al tono de la voz (Figura 5).

Figura 5

Musculatura intrínseca de la laringe



Nota: (A) Vista superior de la laringe, se distingue el músculo tiroaritenideo. (B) Vista lateral de la laringe, se distinguen los músculos cricotiroideos, músculos cricoaritenoides posterior, músculos cricoaritenoides lateral, músculos interaritenoides y músculos aritenopiglóticos. De “Anatomía del cuerpo humano” por Gray, H., 20ª Edición 1918.

Entre los músculos intrínsecos encontramos el músculo tiroaritenideo o músculo vocal, el cual se origina en la cara interna del cartílago tiroides y se inserta en la apófisis muscular del cartílago aritenoides, por lo que se encarga de acercar los cartílagos aritenoides hacia el cartílago tiroides y, por tanto, de elongar y acortar los pliegues vocales

El músculo cricoaritenideo lateral, el cual se inserta en las porciones laterales del borde superior del arco del cartílago cricoides y se dirige hasta la porción anterolateral de la apófisis muscular del cartílago aritenoides. Se encarga de ejercer tracción sobre las apófisis musculares de los cartílagos aritenoides y hacen que estas apófisis se alejen mientras que acercan las apófisis vocales del

cartílago, lo que hace que los pliegues vocales se acerquen y se estreche la glotis. Es un músculo involucrado tanto en la producción de sonidos como en la deglución

El músculo ariaritenoso o interaritenoso, tiene su origen e inserción en la cara posterior de los cartílagos aritenoides. Su contracción acerca estos cartílagos hacia la línea media, lo que produce un estrechamiento de la hendidura glótica. En este caso, dependiendo de la dirección de las fibras musculares distinguimos entre músculo interaritenoso transverso u oblicuo

El músculo cricotiroides, el cual se origina en la cara interna del anillo del cartílago cricoides y se inserta en el borde inferior del cartílago tiroideos. Es el músculo fundamental responsable de la tensión de las cuerdas vocales, ya que su acción provoca una basculación del cartílago tiroideos hacia delante, lo que aumenta el diámetro anteroposterior de laringe y, por tanto, incrementa la tensión en las cuerdas vocales.

Por último, el músculo cricoaritenoso posterior se origina en la cara posterior de la lámina del cartílago cricoides y se inserta en la apófisis muscular de los cartílagos aritenoides. Al contraer este músculo, las apófisis musculares giran hacia la línea media, lo que hace que las apófisis vocales se separen y, por tanto, se separen las cuerdas vocales. Es el único músculo abductor, por lo que es un músculo fundamental en la respiración (Noordzij y Ossoff, 2006).

Durante la respiración, el aire fluye mejor durante la abducción de las cuerdas vocales. Por lo tanto, es razonable afirmar que el músculo cricoaritenoso posterior es el mayor responsable de una respiración óptima. Otros autores mencionan que, durante la respiración, los cartílagos aritenoides se encuentran separados para mantener la dilatación de la zona glótica y permitir el paso del aire, por lo que se podría pensar que la apertura se mantiene por la acción del músculo cricoaritenoso posterior; sin embargo, también es importante pensar que, con una contracción continua de este músculo estriado, éste se fatigaría. Por tanto, una de las maneras de que la glotis permanezca abierta una vez que cesa la contracción sería gracias a la elasticidad laríngea que mencionábamos anteriormente. Esa elasticidad volvería a abrir la zona glótica sin que persista la actividad muscular gracias a un fenómeno físico por la fuerza descendente del peso del árbol

respiratorio y la reacción hacia arriba y hacia fuera del sistema elástico de la laringe. Ambas fuerzas dan como resultado la basculación de las aritenoides hacia abajo, manteniendo la glotis en abducción durante la respiración (Regner et al., 2012; Saran et al., 2023).

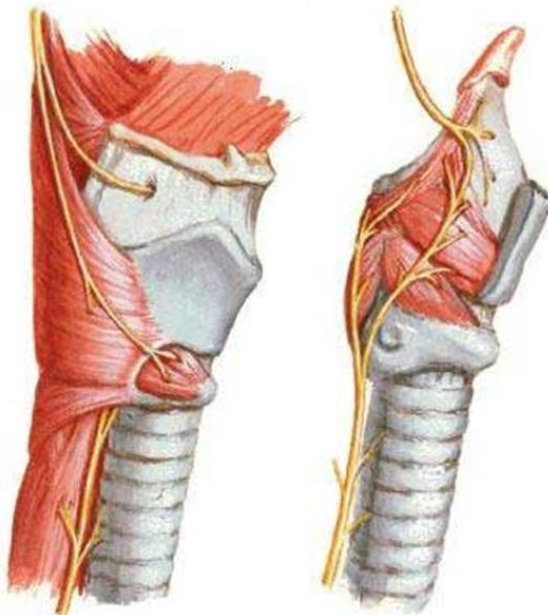
2.1.3. Diferencias interespecies

En cuanto a las diferencias y similitudes de los músculos que forman parte de la laringe en roedores y humanos, se sabe que los músculos laríngeos intrínsecos comunes son el cricoaritenoideo posterior, el tiroaritenoideo, el cricoaritenoideo lateral y el cricotiroideo. Los músculos interaritenoides transversos y oblicuos son específicos de los humanos, mientras que los roedores cuentan con un delgado par de músculos llamados cricoaritenoides superiores, que conectan la superficie dorsal de los cartílagos aritenoides con la prominencia de la línea media del cartílago cricoideo y ayudan en la aducción de las cuerdas vocales, por lo que, probablemente, cumplen la misma función que los músculos interaritenoides en humanos (Inagi et al., 1998; Thomas et al., 2008).

Estos músculos trabajan en conjunto para controlar la posición, la tensión y la longitud de las cuerdas vocales, lo que afecta directamente a la producción del sonido y a la calidad de la voz. La coordinación precisa entre los músculos implicados permite ajustes finos en la apertura glótica. Durante la fonación y la respiración, esta coordinación se adapta para controlar el flujo de aire a través de la laringe y regular la producción de sonido.

2.1.4. Inervación de la laringe

Esta actividad y coordinación entre los músculos implicados en la emisión vocal depende de la inervación de los distintos sistemas involucrados (Figura 6). En un primer lugar, el fuelle es proporcionado por el sistema respiratorio, musculatura que está controlada por las motoneuronas del asta anterior de la médula espinal torácica (musculatura inspiratoria) y lumbar superior (musculatura espiratoria). En segundo lugar, la actividad laríngea está controlada tanto por el nervio vago (musculatura intrínseca) como por el nervio hipogloso, el plexo faríngeo y los nervios cervicales (musculatura extrínseca).

Figura 6*Inervación de la laringe*

Nota: visión lateral región de la laringe. En la parte superior de la imagen se puede ver el nervio laríngeo superior, mientras que en la parte inferior encontramos nervio laríngeo recurrente. De “Atlas de anatomía humana” de Netter, F.H., 4ª Edición 2007.

En el caso del nervio vago, es un par nervioso que forma parte del sistema nervioso autónomo, pero sus motoneuronas también están sujetas a cierto grado de influencia cortical, permitiendo una regulación voluntaria de algunas funciones laríngeas, como la fonación. Es un nervio que vehiculiza información, tanto sensitiva como motora, de la musculatura intrínseca a través de los nervios laríngeos superiores y los laríngeos recurrentes. Concretamente, la rama externa del nervio laríngeo superior proporciona la inervación motora del músculo cricotiroides y está involucrado en el control de la tensión de las cuerdas vocales afectando, por tanto, a la frecuencia y tono del sonido durante la fonación (Uludag, 2017). Por otra parte, la rama interna proporciona inervación somatosensorial de supraglotis y glotis, función relacionada con la protección de las vías aéreas. Los nervios laríngeos recurrentes proporcionan inervación motora del resto de musculatura intrínseca (tiroaritenoides, cricoaritenoides lateral, cricoaritenoides posterior e interaritenoides) e inervación sensorial de la tráquea superior y la subglotis (Allen, 2023).

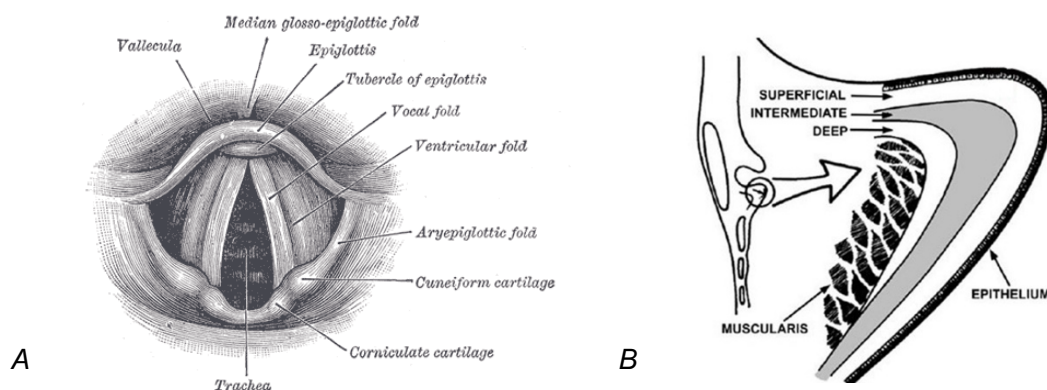
Un último elemento importante dentro de la vocalización sería la articulación, a través de la cual tanto los animales como el ser humano pueden realizar distintos tipos de emisiones vocales. Esta articulación está regulada por motoneuronas del núcleo facial y trigémino, asta ventral de la médula espinal cervical superior, nA rostral y núcleo del hipogloso (Jürgens, 1982).

2.1.5. Cuerdas vocales

Las cuerdas vocales son una estructura fundamental en la producción de sonidos. Se extienden desde el cartílago tiroides hasta los aritenoides (Figura 7). La porción más profunda está formada por el músculo tiroaritenideo o músculo vocal, el cual permite un control preciso de estos pliegues vocales. Después del músculo encontramos la lámina propia, que podemos subdividirla en 3 capas: superficial (espacio de Reinke), intermedia y profunda. Estas dos últimas capas forman el ligamento vocal. La capa más externa está formada por epitelio escamoso, células que están adaptadas para soportar la vibración fonatoria y que forman una barrera protectora contra lesiones e irritantes externos (Miri, 2014; Levendoski et al., 2014).

Figura 7

Esquema de las cuerdas vocales



Nota: (A) Esquema de la vista de las cuerdas vocales con un laringoscopio. (B) Dibujo esquemático de las capas que forman parte de las cuerdas vocales. Adaptada de “Anatomía del cuerpo humano” por Gray, H., 20ª Edición 1918 y “Cellular physiology of the vocal folds”. Por Gray, S.D., 2000.

Esta diferencia en la composición de las diferentes capas que conforman las cuerdas vocales es fundamental para entender su funcionamiento dentro de la vocalización. Las cuerdas vocales están controladas por la musculatura que se ha mencionado anteriormente, de manera activa, por la contracción del músculo tiroaritenoides y, de forma pasiva, con el resto de los músculos laríngeos (Lungova y Thibeault, 2020).

Uno de los modelos animales más utilizados en estudios relacionados con la laringe es el de rata y ratón. Además, se considera un buen modelo para el estudio de las cuerdas vocales, ya que tienen una composición similar a las del humano, pudiéndose dividir en las mismas capas y recubriéndolas una mucosa con composición similar. La dificultad de usar este tipo de modelos animales radica en el tamaño tan pequeño de una estructura como es la laringe, lo que dificulta cualquier intervención y procedimiento quirúrgico (Fernandes et al., 2022). Además, el modelo de rata es también una herramienta útil para comprender los mecanismos periféricos y centrales de la fisiología laríngea (Lenell et al., 2021).

Durante una respiración normal y no forzada, la glotis adopta una forma triangular y no hay movimiento de las cuerdas vocales ni de laringe. Sin embargo, hay estudios con electromiografía que han demostrado que, en los momentos en los que la respiración es más forzada por un aumento en la demanda de oxígeno, es necesario un aumento también de la actividad del músculo cricoaritenoides posterior y que esta actividad del músculo se da con anterioridad a la contracción diafragmática (Sasaki et al., 1973; Kirchner, 1994).

El ciclo vibratorio se divide en las fases abierta y cerrada. La fase abierta indica el momento en que las cuerdas vocales están parcialmente abiertas. Esta fase se divide a su vez en apertura y cierre. La fase de apertura coincide con el momento en el que los pliegues vocales se alejan entre sí, mientras que la fase de cierre es el momento en el que los pliegues vocales comienzan a juntarse. En condiciones normales, las cuerdas vocales suelen separarse a una velocidad mayor que a la que se aproximan (Noordzij y Ossoff, 2006).

La fase cerrada del ciclo vibratorio indica el momento en que los pliegues vocales membranosos están completamente cerrados y comprende dos fases: fase

de preparación, momento en el que no se llega a producir un cierre completo de la glotis, pero hay una reducción progresiva del flujo de aire y un aumento de presión subglótica y de velocidad del flujo; la segunda es la fase de ejecución o ataque, momento en el que hay un cierre glótico completo (o casi completo) porque el músculo cricoaritenideo posterior cesa su actividad junto con la activación del resto de músculos aductores. Este cierre glótico provoca un aumento de la presión subglótica y del flujo aéreo, por lo que, por el efecto Bernouilli, succiona el borde libre de la cuerda vocal y aumenta la aducción (Sasaki, 1988; Chanaud y Ludlow, 1992; García-Tapia, 1996).

Existen otros parámetros fisiológicos importantes de los pliegues vocales: la onda mucosa del pliegue vocal, que representa una ondulación de la membrana mucosa durante el ciclo glotal. Durante la fonación normal, la onda mucosa se desplaza en dirección inferior-superior. La velocidad de la onda oscila entre 0,5 y 1 m/s. La simetría del comportamiento vibratorio de las cuerdas vocales es otro parámetro importante ya que cualquier asimetría representa un proceso patológico. Por último, también hay que tener en cuenta la periodicidad de los ciclos glóticos, que denota una repetición regular de los ciclos vibratorios de forma que cada ciclo tiene la misma amplitud y duración. Cualquier desviación de los ciclos vibratorios periódicos se conoce como aperiodicidad (Svec et al., 2007).

2.1.6. Presión subglótica

No cabe duda de que el sistema respiratorio desempeña un papel fundamental en la vocalización (Del Negro et al., 2018). Sin embargo, estas emisiones vocales no dependen de un flujo de aire normal utilizado durante la respiración, sino que requieren una mayor presión de aire para que puedan generarse dichos sonidos (Riede et al., 2019).

La presión subglótica es aquella que se ejerce dentro de la tráquea, por debajo de la glotis, por la acumulación de aire que proviene de los pulmones. Es un factor primordial para controlar el inicio, el desplazamiento y la intensidad de la voz. Viene determinada por la fuerza con la que se contraen los músculos respiratorios y, por tanto, expande o comprime la cavidad torácica durante la

inspiración y la espiración, y está determinada también por el espacio glótico, de manera que esta presión subglótica aumenta con el incremento de la presión pulmonar y con la aducción de las cuerdas vocales (Titze, 1988; Riede et al., 2020).

Esta presión subglótica va aumentando contra las cuerdas vocales cerradas hasta que acaba abriendo la glotis. En su apertura máxima, el labio superior del pliegue vocal continúa moviéndose lateralmente, mientras que el labio inferior comienza a moverse medialmente. Finalmente, el labio superior también comienza a moverse medialmente. El movimiento medial de los pliegues vocales es el resultado de una fuerza pasiva de retroceso (debido a la elasticidad innata de los pliegues vocales), una caída de la presión subglótica y la presión negativa causada por el efecto Bernoulli. Esta presión negativa empuja las cuerdas vocales una hacia otra. El contacto inicial se produce en el labio inferior de las cuerdas vocales. El área de contacto de los pliegues vocales aumenta hasta que la presión subglótica es lo suficientemente alta como para separar los pliegues vocales (Riede et al., 2020).

Este ciclo aeromecánico se repite una y otra vez, dando lugar a la fonación y a la aparición de una onda que viaja a través de la mucosa desde la superficie inferior a la superior de los pliegues vocales, conocida como onda mucosa de la que hemos hablado anteriormente. Esta onda mucosa sólo está presente si hay una membrana mucosa flexible que cubra el pliegue vocal. La velocidad a la que se desplaza la onda mucosa aumenta con el alargamiento de las cuerdas vocales (Titze et al., 1993; Jiang et al., 1998;), con un mayor flujo de aire (Jiang et al., 1998), con una mayor presión subglótica y con la contracción de los músculos laríngeos, lo que se asocia a un aumento de la frecuencia fundamental (Nasri et al., 1994).

2.2. PRODUCCIÓN VOCAL

La voz surge por un flujo de aire continuo generado durante la espiración y que proviene de los pulmones. Existen diferentes teorías que explican el mecanismo a través del cual se produce la voz a través de las cuerdas vocales. La primera teoría la introdujo Husson en 1953, quien consideraba el músculo tiroaritenosoideo como el principal motor de la fonación, sin embargo, se rechazó por falta de fundamento y se aceptaron otras dos teorías, la teoría mioelástica-aerodinámica de Van den Berg en 1958 y la teoría mucocondulatoria de Perelló en 1962 (García-Tapia, 1996). Los principios de ambas teorías son similares: la frecuencia fundamental a la que vibran las cuerdas vocales está determinada por la masa de la cuerda vocal, la viscoelasticidad de la cuerda vocal y la presión subglótica; la vibración vocal se explica por el principio de Bernoulli, según el cual, la presión de un fluido incompresible disminuye con el aumento de velocidad de sus moléculas y la velocidad de ese fluido confinado aumenta en función del estrechamiento del área de su sección (ecuación de continuidad). Además, el aire fluye desde la zona de altas presiones hasta la zona de bajas presiones (Nasri et al., 1994).

Otra teoría surgió en 1975, cuando Hirano dividió la cuerda vocal en tres planos con propiedades mecánicas diferentes que permiten el deslizamiento de una sobre otra, produciéndose la onda mucosa. La cubierta es flexible, no se contrae y tiene gran elasticidad, no obstante, el cuerpo es más rígido y posee propiedades contráctiles. La tensión depende del acoplamiento de una capa sobre otra y su rigidez varía según la contracción del músculo tiroaritenosoideo (Hirano y Bless, 1993).

Durante la fonación, las cuerdas vocales actúan como un transductor de energía que convierte la energía aerodinámica que proviene de los pulmones en energía acústica. Esta transformación se produce en la región de la glotis, sin embargo, en la producción vocal tiene una gran influencia otras estructuras tanto subglóticas como supraglóticas. Para una fonación normal, se requiere un apoyo respiratorio adecuado, un cierre glótico apropiado, una cobertura normal de las cuerdas vocales y un control adecuado de la longitud y tensión de éstas. Con la

apertura y cierre glótico conseguimos modular esa corriente de aire durante la fonación, lo que da lugar a la voz (Titze, 1988; Hirano et al., 1999).

Para la producción vocal son fundamentales tres aspectos: la respiración, el movimiento de las cuerdas vocales y la postura del tracto vocal superior. Todas estas acciones deben coordinarse para producir una adecuada vocalización en el ser humano (Titze et al., 2000). Una respiración disfuncional o dificultades para integrarse en el proceso de la vocalización puede afectar negativamente a la producción de sonido en humanos y roedores (Riede et al. 2015; Hülsmann et al. 2019).

Según algunos estudios, la velocidad de la onda mucosa aumenta cuando las cuerdas vocales se elongan, cuando hay un incremento en el flujo y en la presión subglótica, así como una contracción de la musculatura laríngea. Ese aumento de velocidad se relaciona con un aumento también de la frecuencia fundamental (Titze et al., 1993; Nasri et al., 1994; Jiang et al., 1998).

Las cuerdas vocales normales pueden producir tres patrones vibratorios típicos: falsete, voz modal y aleteo glótico. En el falsete o voz ligera, no se produce el cierre glótico completo. Durante esta voz aguda, sólo vibra el borde superior de la cuerda vocal. En la voz modal, se produce un cierre glótico completo y da lugar a la mayor parte de la gama de frecuencias medias de la voz. Durante este patrón vibratorio la mucosa del pliegue vocal vibra independientemente del músculo vocal subyacente. El aleteo glótico, o fonación de muy baja frecuencia, se caracteriza por una fase cerrada, que es relativamente larga en comparación con la fase abierta. En este caso, la cubierta mucosa y el músculo subyacente vibran como una unidad (Noordzij y Ossoff, 2006).

La frecuencia fundamental de las vocalizaciones humanas es más reducida que en roedores. Esta frecuencia se encuentra entre 100 y 3.000 Hz (Mahrt et al., 2016; Titze et al., 2016). En los humanos, esta frecuencia fundamental viene determinada por la masa (que puede cambiar según la composición de la lámina propia), la tensión de las cuerdas vocales (regulada por la contracción y relajación de los músculos laríngeos tiroaritenoides, cricoaritenoides posterior y el cricotiroideo) y la presión subglótica durante la vibración. Esta frecuencia

fundamental pasa por el tracto vocal supralaríngeo (formado por las vías respiratorias orales y nasales), que actúa como filtro acústico variable en el tiempo que suprime el paso de la energía sonora a determinadas frecuencias, mientras que permite el paso de otras, dando lugar a los formantes. Estos formantes están determinados por la forma, longitud y volumen del tracto vocal (Riede et al., 2017; Zhang et al., 2020).

2.3. PRODUCCIÓN VOCAL EN ROEDORES

Al igual que los humanos, los roedores utilizan la laringe para la producción de sonidos, aunque de forma diferente, de modo que es posible la producción de ultrasonidos. Ambos tienen un control preciso y unas propiedades de cuerdas vocales similares. Las vocalizaciones audibles de las ratas son el resultado de la vibración de las cuerdas vocales, con un funcionamiento similar al del ser humano. Con vocalizaciones audibles nos referimos a aquellas que están constituidas por una frecuencia fundamental y múltiples armónicos. Mientras que las vocalizaciones ultrasónicas consisten en un sonido de una sola frecuencia y pocos o ningún armónico (Mahrt et al., 2016).

Los roedores producen vocalizaciones ultrasónicas que oscilan entre 100 y 120.000 Hz, vocalizaciones que tienen un papel crucial en comportamientos sociales como el apareamiento o la defensa territorial. A pesar de las investigaciones que se han hecho hasta ahora, todavía se conoce poco acerca de cómo afecta el control nervioso y la aerodinámica a la producción de ese tipo de sonidos. La desaparición de las vocalizaciones ultrasónicas tras la interrupción de la inervación a los músculos laríngeos (Roberts, 1975; Thiessen et al., 1980) y la generación de ultrasonidos a partir de laringes extirpadas (Johnson et al., 2010; Berquist, 2013; Mahrt et al., 2016) indican que la laringe es el lugar de producción del sonido. Sin embargo, la comprensión de la evolución y los mecanismos fisiológicos de cómo la energía aerodinámica se convierte en sonido sigue siendo controvertida y, a menudo, desvinculada de los detalles anatómicos (Riede et al., 2017).

Se sabe que los ultrasonidos que emiten los roedores se emiten durante la fase espiratoria del ciclo respiratorio (Roberts, 1975; Fryszak y Neafsey, 1991; Hofer y Shair, 1992; Hegoburu et al., 2011). La duración de la fase espiratoria está correlacionada con la duración de este tipo de vocalizaciones y es significativamente más larga que las fases espiratorias silenciosas (Hegoburu et al., 2011; Boulanger-Bertolus et al., 2017), lo que sugiere que la emisión de ultrasonidos alarga la fase espiratoria y es posible que la duración de éstos esté limitada por la necesidad fisiológica de respirar (Lungova y Thibeault, 2020).

Se ha investigado acerca de la estructura anatómica responsable de la producción de esos ultrasonidos y se ha encontrado que la sección de los nervios que inervan la laringe afecta a su emisión (Roberts, 1975; Wetzel et al., 1980). Además, gracias a observaciones endoscópicas de las cuerdas vocales se ha podido comprobar que durante la emisión de ultrasonidos las cuerdas vocales no vibran, sino que dejan una apertura de 1-2 mm en la parte posterior (Boulanger-Bertolus y Mouly, 2021). Estas observaciones llevaron a los investigadores a sugerir que las vocalizaciones ultrasónicas se producen a través de un mecanismo similar a un silbato en la laringe. El flujo de aire se perturba al pasar por un primer orificio, formado por la parte posterior de las cuerdas vocales y, cuando este flujo de aire perturbado pasa por el segundo orificio, formado por la epiglotis y la base de la lengua, estas inestabilidades crean vórtices responsables de la onda sonora (Riede, 2013; Henrywood et al., 2013). Esta hipótesis fue muy aceptada hasta que mediante estudios en laringes extirpadas de ratones demostraron que podían seguir generando ultrasonidos cuando se extirpaba la epiglotis (Mahrt et al., 2016). Estos mismos autores sugirieron entonces que la vocalización de ultrasonidos podría producirse entonces por un chorro de aire procedente de la glotis que incidiera en la pared interna del cartílago tiroideo (Boulanger-Bertolus y Mouly, 2021).

Por otro lado, hubo autores que rechazaron esta hipótesis por su improbabilidad, ya que no existe esa superficie plana en la laringe de la rata, por lo que propusieron que el chorro de salida podría proyectarse sobre otra estructura que permitiese la generación de ultrasonidos a través del mecanismo “*edge tone*” con la bolsa ventral que se forma entre las cuerdas vocales y el borde alar. Esta es la teoría más aceptada hasta el momento (Lungova y Thibeault, 2020). A pesar de esto, Håkansson et al. (2022) volvieron a confirmar la hipótesis previa del chorro de aire sobre la pared tiroidea en rata utilizando laringe in vitro y reconstrucciones tridimensionales de vías respiratorias con simulaciones de dinámica de fluidos, demostrando, además, que el relleno de la bolsa ventral con esferas de aluminio no impedía la producción de ultrasonidos.

En ambos modelos la frecuencia del sonido emitido dependía de la distancia entre la glotis y el cartílago: a mayor distancia, menor era la frecuencia. Esto es

coherente con la disminución de frecuencia fundamental a medida que la rata crece. Además, esa frecuencia también dependía de la velocidad del flujo de aire y del diámetro de este, algo que el animal puede modular con su respiración y con los músculos laríngeos (Boulangier-Bertolus y Mouly, 2021).

Según las últimas investigaciones de la morfología funcional de la anatomía laríngea de los roedores, hay al menos seis estructuras únicas en las laringes de roedores que comúnmente producen ultrasonidos, todas ellas en la región supraglótica. (I) La presencia de una bolsa ventral soportada por (II) un margen rostro-ventral dorsalmente doblado del cartílago tiroides; (III) los bordes laterales caudales anchos de la epiglotis que rodean la región supraglótica, (IV) el cartílago alar, (V) una amplia apófisis rostral del cartílago tiroides y (VI) una protuberancia en la superficie medial del cartílago tiroides, que también sirve de anclaje para las cuerdas vocales (Riede et al., 2017).

Otros estudios recientes han comprobado la existencia de una pequeña porción del músculo tiroaritenideo que se une a los extremos del cartílago alar, lo que sugiere la posibilidad de un control activo de la posición del borde alar. La contracción de la porción alar del músculo tiroaritenideo movería el borde alar hacia la glotis y reduciría la distancia entre el borde alar y el glótico. Este movimiento también afectaría probablemente al tamaño de la cavidad de la bolsa ventral. Como es bien sabido en la interpretación de la flauta, la frecuencia fundamental está determinada no sólo por la velocidad del flujo de aire, sino también por la distancia entre la salida del chorro (glotis) y el borde (borde alar). Ajustar la distancia entre la glotis y el borde alar ayuda a producir condiciones óptimas para notas de mayor frecuencia (Coltman, 1976). Las altas frecuencias de llamada podrían verse favorecidas por una menor longitud glotal o distancia entre el borde glotal y el alar, y/o por un menor volumen de la bolsa ventral (Riede et al., 2017).

2.4. CONTROL CENTRAL DE LA VOCALIZACIÓN

La producción del habla en los seres humanos comparte una base fisiológica y acústica común con la emisión vocal de otros vertebrados. Sin embargo, tiene características específicas debido a que la estabilidad de las oscilaciones en las cuerdas vocales laríngeas, responsables de regular el flujo de aire desde los pulmones, resulta de un control neural mejorado y altamente especializado de estos músculos en los humanos (Jürgens, 2002a). La investigación indica que la estabilidad mejorada en la fonación humana resulta de una reducción evolutiva en la complejidad anatómica. A diferencia de los simios y primates, los humanos han experimentado una pérdida de estructuras como sacos laríngeos o membranas vocales, que contribuyeron a la inestabilidad vocal en primates no humanos (Nishimura et al., 2022).

Una contracción secuencial precisa de los músculos respiratorios es crucial y requiere control desde los núcleos ubicados en el tronco del encéfalo, control que es necesario para optimizar el flujo de aire mediante la adaptación del control muscular satisfaciendo los requisitos respiratorios o de vocalización. Es necesario que se produzca una espiración meticulosa y prolongada para establecer una presión de flujo de aire adecuada y suficiente, asegurando una presión subglótica propicia para la vocalización, para lo cual es necesario un control del patrón e intensidad de la activación de las motoneuronas en estructuras respiratorias, laríngeas, orofaríngeas y craneofaciales (Ellenberger and Feldman, 1988; Ludlow, 2011; Butler et al., 2014; Shinozaki et al., 2019; Jensen et al., 2020).

La coordinación de todos estos procesos del habla se lleva a cabo gracias a una red que se origina en la corteza motora laríngea y que se extiende hasta la región mesencefálica conocida como la SGP en mamíferos. La SGP es la encargada de modificar la actividad de las estructuras pontomedulares, responsables de generar patrones motores esenciales para el control de la laringe durante la respiración y la vocalización.

A continuación, haremos un repaso por los principales núcleos implicados en el control central de la vocalización, muchos de ellos compartidos, como ya

hemos dicho anteriormente, con el control de la respiración. Nos centraremos en los núcleos situados en el tronco del encéfalo. Concretamente, empezaremos con el mesencéfalo (SGP), continuaremos con la protuberancia (Grupo Respiratorio Pontino) y finalizaremos describiendo las regiones más importantes del bulbo (Grupos Respiratorios Dorsal y Ventral).

2.4.1. Sustancia Gris Periacueductal

La SGP es una interfaz tanto anatómica como funcional entre el prosencéfalo y la protuberancia, con los cuales presenta una gran interconexión que le permite integrar las respuestas activas y pasivas ante estímulos internos o externos. Desempeña un papel fundamental en la regulación e integración en el comportamiento defensivo en mamíferos, en su respuesta autonómica y en el procesamiento de estímulos dolorosos. Coordina diferentes patrones de respuestas cardiorrespiratorias, motoras y nociceptivas que varían en función del tipo de estrés y de la percepción subjetiva del propio individuo ante la supuesta amenaza (Carvalho et al., 1987; Mortensen et al., 1994; Keay y Bandler, 2001; Dampney, 2016). Gracias a sus conexiones con centros superiores, es un área que participa en el control de comportamientos defensivos, emocionales, sociales, sexuales y autonómicos, así como en la integración y modulación de sensaciones desagradables, como el dolor, la picazón o el impulso de toser (Bandler et al., 2000; Linnman et al., 2012; Motta et al., 2017; Klingbeil et al., 2021; Vazquez-León et al., 2023; Zhang et al., 2024) (Figura 8).

En un principio, la división de la SGP se basó en una organización columnar formada por la SGP dorsal, lateral y ventral. Hoy en día, y a gracias a estudios realizados en primates y roedores, se ha demostrado que la SGP podemos dividirla en 4 columnas longitudinales principales: dorsomedial (SGPdm), dorsolateral (SGPdI), lateral (SGPI) y ventrolateral (SGPvl), y que cada una de ellas tiene propiedades químicas, funcionales y de conectividad diferentes (Carrive, 1993; Bandler y cols., 2000; Keay y Bandler, 2001; Vianna y Brandao, 2003). La columna ventrolateral es la encargada de los comportamientos defensivos, la hipersensibilidad, la hipotensión, la bradicardia y la analgesia mediada por opiáceos. Por el contrario, la columna dorsal promueve conductas activas de

afrontamiento y lucha, hipertensión, taquicardia y analgesia no opiácea (Linnman et al., 2012; Vaughn et al., 2022).

Se han llevado a cabo estudios que confirman la participación de la SGP en el control de la vocalización en mamíferos. En estos estudios se describen lesiones bilaterales en la SGP que causan mutismo, no sólo en animales sino también en humanos (Esposito et al., 1999; Jürgens, 1994, 2002b, 2009; Kittelberger et al., 2006). Otros demuestran que estimulaciones eléctricas o químicas de la misma zona producen emisiones vocales (Bandler y Carrive, 1988; Schuller y Radtke-Schuller, 1990; Lu y Jurgens, 1993; Zhang et al., 1994; Kyuhou y Gemba, 1998). Es, por tanto, un área fundamental para el control de la vocalización (Magoun et al., 1937; Zhang et al., 1994; Esposito et al., 1999; Jürgens, 2002a; Subramanian et al., 2021), sobre todo por su fuerte proyección a la parte caudal del Grupo Respiratorio Ventral (GRV), única área del cerebro que se dirige directamente a todas las áreas motoras necesarias para la vocalización (VanderHorst et al., 2000; Holstege y Subramanian, 2016). Esta vía es especialmente relevante para las vocalizaciones emocionales, como llorar y reír, que no dependen del área de Broca, como lo hace el habla humana (Holstege y Subramanian, 2016).

A nivel clínico, se sabe que su funcionamiento está afectado en distintos desórdenes neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer y la atrofia multisistémica. Además, la estimulación de la SGP ha sido utilizada para controlar el dolor neuropático y existen evidencias recientes que sugieren que podría ser útil para reducir o aliviar la hipertensión refractaria (Carrive, 1993; Bandler y Shipley, 1994; Behbehani, 1995; Bandler et al., 2000; Keay y Bandler, 2001; Haxhiu et al., 2002; Holstege, 2005; Zhang et al., 2007; Heinricher et al., 2009; Jürgens, 2009; Chung et al., 2020)

Todas estas funciones descritas tienen su origen en la gran capacidad de integrar y modular la información, tanto aferente como eferente, que recibe esta área desde muy distintas localizaciones, las cuales describimos a continuación.

2.4.1.1. Aferencias de la SGP

A nivel general, la SGP es un área que recibe numerosas aferencias desde el **prosencefalo** (corteza prefrontal, amígdala e hipotálamo), **protuberancia**, **bulbo** y **neuronas sensitivas** del asta dorsal y **núcleo del trigémino** (Holstege, 1996; Faull et al., 2019; Subramanian et al., 2008; Subramanian y Holstege, 2009) (Lavezzi et al., 2021; González García et al., 2023).

Aferencias desde regiones superiores

Desde zonas superiores, la SGP recibe inputs de información con diferentes patrones de entrada a las distintas columnas que la forman. De manera más concreta, recibe inputs tanto corticales como subcorticales que envían información de entrada de diversas modalidades (sensoriomotora, nociceptiva, emocional, homeostasis...) que permiten a la SGP participar en la modulación e integración de diferentes funciones (Trevizan-Baú et al., 2021a).

Se han descrito entradas muy potentes desde el córtex prefrontal, más concretamente, a pared media del córtex prefrontal conecta con la columna dorsolateral de la SGP, las cortezas pre e infralímbicas proyectan de manera profusa hacia las columnas lateral y ventrolateral, el córtex cingulado anterior alcanza la columna lateral, ventrolateral y dorsomedial. Las aferencias desde la amígdala se originan desde el núcleo central y la porción ventrolateral del núcleo basal. Las aferencias desde el hipotálamo se originan desde el núcleo preóptico medial, núcleo anterior, núcleo paraventricular, núcleo ventromedial, núcleo dorsomedial, núcleo posterior, núcleo supramamilar y áreas laterales hipotalámicas (Benarroch 2012; Trevizan-Baú et al., 2021a; Schottelkotte y Crone, 2022).

Dentro de estas proyecciones corticales y subcorticales que recibe la SGP, hay algunas que son exclusivas de la SGPdl. Se han descrito proyecciones directas desde la corteza auditiva primaria y el área 18 (área cortical visual secundaria en rata) (Benzinger y Massopust, 1983). Otros inputs exclusivos hacia la sGPdl desde núcleos con un papel importante en el control de los movimientos oculares son los provenientes del núcleo praepositus hypoglossi y el núcleo periparabigeminal (Klop et al., 2005, 2006). En rata se han descrito proyecciones directas de las neuronas

del córtex prefrontal medial (PFC), en particular desde su porción caudodorsal (córtex cingulado anterior y prelímbico caudal) (Gabbott et al., 2005). Estas regiones corticales también proyectan al núcleo hipotálmico anterior y al VMH (Keay y Bandler, 2001), por lo que también pueden influir indirectamente sobre las neuronas de la SGPdl a través de estas regiones hipotalámicas. Se cree que el córtex prefrontal medial, incluyendo aquellas subregiones que proyectan hacia la SGPdl, está implicado en el razonamiento cognitivo complejo y la interpretación de los estímulos estresantes (Bandler et al., 2000). En primates, las regiones corticales que son homólogas a la porción caudodorsal del córtex prefrontal medial son las zonas 10, 25 y 32, y los estudios anatómicos han demostrado que estas áreas son el origen de una proyección densa a la SGPdl. Asimismo, daños en el córtex prefrontal en humanos afectan su capacidad para predecir las consecuencias de las conductas de riesgo y también reduce las respuestas autonómicas que normalmente se asocian con el estrés emocional en los comportamientos de riesgo (Bandler et al., 2000).

Una de las proyecciones subcorticales más importantes que recibe la SGPdl proviene de zonas del hipotálamo (lateral, dorsomedial y ventromedial) (Motta y cols., 2009; Dampney 2015; Trevizan-Baú et al., 2021a). Lesiones o bloqueos del núcleo dorsal premamilar (PMD) reducen la respuesta defensiva ante la presencia de un depredador o su olor (Markham et al., 2004; Blanchard et al., 2005; Do Monte et al., 2008; Motta et al., 2009). El PMD ventrolateral recibe, por un lado, entradas de información desde el núcleo hipotálmico ventromedial (VMH) que, a su vez, recibe proyecciones desde la amígdala (parte posteroventral del núcleo medial y parte posterior de núcleo basomedial), que se activan ante el olor y la presencia de depredadores (McGregor et al., 2004; Motta et al., 2009). Por otro lado, recibe una entrada importante del área hipotálmica anterior (AHA) (Risold et al., 1994), que junto con el PMD y VMH, son parte del sistema que genera la respuesta de defensa desde el hipotálamo medial (Swanson, 2000). Esta AHA también tiene una proyección directa hacia la SGPdl (Semenenko y Lumb, 1992). La activación de ésta evoca la típica respuesta cardiovascular asociada a la respuesta de defensa (Lumb y Lovick, 1993). Se sabe también que las conexiones bilaterales que establece con el DMH-PeF median las respuestas cardiovasculares evocadas

desde esa área hipotalámica además de ser necesarias para una completa expresión de la respuesta de defensa evocada desde la SGPdl. De hecho, la inhibición de las neuronas del DMH-PeF suprime la respuesta cardiorrespiratoria evocada desde el SGPdl. Por tanto, las interacciones bilaterales entre esas dos regiones son puntos clave para la reacción de defensa del animal, convergiendo ambas vías en neuronas cardiorrespiratorias del tronco del encéfalo implicadas en estas respuestas (Horiuchi et al., 2009; Dampney et al., 2013; López-González et al., 2013, 2020).

Aferencias desde regiones inferiores

La SGP también recibe información sensoriomotora, cardiorrespiratoria y nociceptiva desde distintas regiones inferiores. Concretamente, la información nociceptiva llega hasta la SGPI y SGPvl, organizadas somatotópicamente, desde **la lámina I superficial del asta posterior** y desde el **núcleo caudal del trigémino contralateral**. Por su parte, la zona rostral de la SGP recibe proyecciones trigeminales, mientras que a los niveles más caudales le llegan proyecciones cervicales y lumbares (Chung et al., 2020).

Son muy importantes también las aferencias provenientes desde centros bulbotuberanciales que aportan información cardiorrespiratoria como por ejemplo desde el Núcleo del Tracto Solitario (NTS), principal receptor de la entrada sensorial vagal, el cual proyecta a la SGPvl y medial (Herbert y Saper, 1992; Kawai, 2018), el rafe caudal y los complejos Bötzinger y pre-Bötzinger, que mandan información a la SGPI y SGPvl. Además, la SGP recibe abundantes conexiones, tanto noradrenérgicas (grupos A1 y A2) como adrenérgicas (grupos C1-C3) (Herbert y Saper, 1992; Trevizan-Baú et al., 2021b).

Las conexiones desde regiones protuberanciales provienen principalmente desde el núcleo Kölliker-Fuse (KF) (Yang y Feldman, 2018; Trevizan-Baú et al., 2021b). Aunque también se han descrito desde el locus coeruleus (Jones y Moore, 1977; Jones y Yang, 1985), el Complejo Parabraquial (cPB) (desde sus regiones lateral y medial) (Bianchi et al., 1998) y el Área A5 (López-González et al., 2020; González-García et al., 2023).

2.4.1.2. Eferencias de la SGP

La SGP emite proyecciones hacia una gran diversidad de regiones, tanto superiores como inferiores, que están involucradas en el control de los patrones de respuestas motoras, emocionales, cardiorrespiratorias, nociceptivas y de emisión vocal (Holstege et al., 1996; Subramanian et al., 2008; Subramanian y Holstege, 2010; Faull et al., 2016; Faull et al., 2019).

Proyecciones hacia centros superiores

Las proyecciones hacia centros superiores se dirigen a diversas regiones del prosencéfalo, entre las que se encuentran: cortex, ganglios de la base, sistema límbico, tálamo e hipotálamo. Entre las proyecciones que se dirigen al **tálamo e hipotálamo** (Herbert y Saper, 1992; Yeziarski, 1988), destacan aquellas existentes con los núcleos intralaminar y medial del tálamo. Dichas conexiones podrían servir como una vía de entrada con el córtex prefrontal, amígdala y ganglios basales (Krout y Loewy, 2000). Las proyecciones que emite hacia el hipotálamo se dirigen concretamente a las zonas anterior, medial y posterior de éste (Mantyh, 1983).

En humanos, han sido muy estudiadas las conexiones de la SGP y, en estudios realizados en pacientes que han recibido estimulación profunda de la SGP por dolor neuropático, se han demostrado conexiones ascendentes de la SGP dorsal con la parte posterior ventral del tálamo y la corteza primaria somatosensorial, además de conexiones de la SGP ventral con las cortezas cinguladas prefrontal ventromedial y anterior, amígdala y núcleo accumbens (Sillery y cols., 2005).

Proyecciones hacia centros inferiores

Las proyecciones hacia centros inferiores se dirigen hacia otras **regiones mesencefálicas, protuberancia y bulbo**. La mayoría de estos destinos se trata de centros premotores que, a su vez, contactan con otros centros sensitivos, motores o núcleos autonómicos de esas regiones (Holstege et al., 1996; Dampney et al., 2013).

Las proyecciones eferentes a diferentes núcleos pontinos le permiten coordinar diferentes patrones de respuestas cardiorrespiratorias y motoras ante diferentes tipos de estímulos. Por ejemplo, es capaz de modular, ante estímulos dolorosos y gracias a su conexión con el **locus coeruleus y el bulbo rostro ventro medial**, la excitabilidad nociceptiva del asta posterior y, por tanto, el nivel de excitabilidad de los reflejos espinales (Holstege et al., 1996; Subramanian et al., 2008; Subramanian y Holstege, 2010; Faull et al., 2016; Faull et al., 2019;).

Todas las columnas de la SGP proyectan hacia el cPB, específicamente hacia su núcleo lateral, siendo la SGPdl la única región que proyecta de manera exclusiva hacia subnúcleo parabraquial lateral superior (Krout et al., 1998). Las regiones SGPI y SGPvl mantienen densas proyecciones hacia el KF (Trevizan-Baú et al., 2021b). Otros núcleos pontinos con los que mantiene conexión directa son el locus coeruleus (Luppi et al., 1995; Schwarz et al., 2015) y el área A5 (López-González, 2020; González-García, 2023; Rocha et al., 2024), todas ellas regiones cardiorrespiratorias implicadas en el control autonómico.

Si atendemos a las proyecciones bulbares, hay fuertes proyecciones hacia la línea media del bulbo raquídeo (Dampney et al., 2003; Guyenet, 2006), así como al GRV desde SGPdm, SGPI y SGPvl (Cowie y Holstege, 1992; Gaytan y Pasaro, 1998). Las neuronas de la SGPdl proyectan, por su parte, al núcleo **Cuneiforme** (CnF) (Redgrave et al., 1988). Las cuatro columnas, pero en particular el SGPI y SGPvl, proyectan al complejo pre-Bötzing y al núcleo parafacial lateral (Yang y Feldman, 2018; Biancardi et al., 2021; Trevizan-Baú et al., 2021b). Las conexiones ipsilaterales con el núcleo parafacial son predominantemente glutamatérgicas, mientras que las proyecciones contralaterales tienen una mezcla de fibras glutamatérgicas y GABAérgicas (Biancardi et al., 2021). La SGP también manda proyecciones al complejo Postinspiratorio (PiCo) (Oliveira et al., 2021), al núcleo retrotrapezoide (Rosin et al., 2006), al NTS (VanderHorst et al., 2000; Chen et al., 2021), a los núcleos del rafe dorsal y caudal (Hermann et al., 1997; Ogawa et al., 2014; Pollak-Dorocic et al., 2014; Peyron et al., 2018; Trevizan-Baú et al., 2021b) y a la oliva inferior (Swenson y Castro, 1983; VanderHorst et al., 2000).

2.4.1.3. Organización anatómico-funcional de la SGP

Basándonos en todo el esquema de aferencias y eferencias descritas anteriormente, podemos afirmar que la SGP es un componente esencial de una red neuronal que se activa en respuesta tanto a estímulos internos (v.g. estímulos dolorosos) como a amenazas externas (v.g. presencia de un depredador). Esta red neural incluye varias áreas del córtex prefrontal, el córtex cingulado anterior, la amígdala y el hipotálamo, que conectan específicamente con las distintas columnas que conforman la SGP. Estas conexiones forman circuitos paralelos que son activados en función de las características de los estímulos recibidos e inician diferentes respuestas moduladoras, ya sean dolorosas, autonómicas o motoras. También está involucrada en la termorregulación, los mecanismos de vigilia y sueño, la modulación del dolor neuropático, la micción y la vocalización (de Menezes et al., 2009; Holstege, 2005; Kuner y Kuner, 2021; Subramanian et al., 2021). Además, clínicamente se sabe que es un área que participa en diferentes procesos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer o la atrofia multisistémica (Benarroch et al., 2010; Parvizi et al., 2000).

Los animales han desarrollado varios tipos de estrategias para defenderse de los diferentes tipos de estímulos que suponen una amenaza o estrés. Según Bandler et al., (2000) y Keay y Bandler (2001), estas estrategias pueden ser de afrontamiento activo o pasivo. El comportamiento defensivo activo se caracteriza por un aumento de la actividad somatomotora junto a cambios cardiovasculares y respiratorios que consiguen un aumento en el flujo sanguíneo y del suministro de oxígeno a los músculos esqueléticos. Esta respuesta puede ser activada por estímulos de los que se puede huir y, por tanto, que activen la huida o escape del animal, tales como la presencia de un depredador o dolor cutáneo. Por el contrario, el comportamiento defensivo pasivo se caracteriza por una disminución de la actividad somatomotora, acompañada por cambios cardiovasculares con el descenso de la presión arterial y de la frecuencia cardíaca. Esta respuesta es provocada por estímulos que son ineludibles, tales como dolor de origen profundo en los músculos o vísceras, o hemorragias (Carrive, 1993; Bandler et al., 2000; Keay y Bandler, 2001).

Estudios previos han descrito el papel fundamental de la SGP en la generación de respuestas defensivas innatas. Se ha observado que la estimulación de la SGP en ratas, gatos y ratones mediante métodos eléctricos, químicos y optogenéticos provoca reacciones defensivas (Deng et al., 2016), y que las distintas columnas de la SGP coordinan diferentes tipos de respuestas en función del estímulo (Carrive, 1993; Bandler y Shipley, 1994; Bandler et al., 2000; Keay y Bandler, 2001; Heinricher et al., 2009).

La SGPI y SGPdl participan en la organización de la respuesta de defensa (huída o lucha), la cual se caracteriza hemodinámicamente por hipertensión, taquicardia y redistribución del flujo sanguíneo a los músculos esqueléticos de las extremidades desde la zona abdominal y visceral (Linnman et al., 2012; Faull et al., 2019; Bandler et al., 2000; López-González et al., 2020; González-García et al., 2023). Además, la respuesta viene acompañada de midriasis, taquipnea, aumento de volumen corriente y de vocalizaciones. Además, la SGPdl está involucrada en la modulación del dolor, inhibiendo la respuesta ante un estímulo doloroso (Bandler y Keay, 1996, Xie et al., 2022). Esto permite al animal afrontar situaciones de estrés ambiental y que necesitan una respuesta rápida (López-González, 2020).

Para demostrar lo anterior, se realizaron estudios en rata en los que se provocaron lesiones citotóxicas o inhibiciones farmacogenéticas de la SGPdl. En ellos se produce una disminución de la respuesta de defensa ante depredadores o amenazas, lo que demuestra que estamos ante un área importante en la integración de este tipo de respuesta defensa innata (Gross y Canteras, 2012; Tsang et al., 2023). Estas respuestas simpatoexcitadoras son mediadas por las neuronas del bulbo rostro-ventral-lateral, que activan neuronas preganglionares simpáticas que controlan efectores cardiovasculares (Bandler et al., 2000; Keay y Bandler, 2001; Hayward, 2007; de Menezes, 2009).

Por su parte, la SGPdm está relacionada con el sistema de recompensa y motivación, con la modulación de la respuesta emocional y de la presión arterial. Interviene también en la respuesta de defensa ante una situación peligrosa, de manera que se producen los cambios cardiorrespiratorios necesarios para provocar la respuesta de huida (Bandler y Keay, 1996).

La SGPvl también interviene en esta respuesta de confrontación, pero en este caso se encarga de generar una respuesta de congelación/inmovilidad (Bandler y Keay, 1996; Hermans et al., 2013) cuando, según las circunstancias, lo que el animal busca es la evitación, de manera que es la encargada de generar respuestas pasivas como la paralización (freezing) o la disminución profunda del dolor (Motta et al., 2017). Las neuronas de esta zona inician respuestas simpatoinhibitorias, caracterizadas por disminución de presión arterial y frecuencia cardiaca, asociadas con inmovilidad e hiporeactividad al entorno. Estas respuestas vasodepresoras son mediadas por neuronas del bulbo ventromedial y el núcleo del rafe pálido, que inhiben a las neuronas simpatoexcitadoras del bulbo rostroventrolateral (Vagg et al., 2008).

A nivel respiratorio, se sabe que la SGP es un área que integra y adapta la respiración a diferentes situaciones ambientales, respuestas que son mediadas gracias a las proyecciones que presenta con interneuronas premotoras a nivel de la protuberancia (cPB, KF y A5) y bulbo (núcleo pre-Bötzing, nA y núcleo Retroambiguo (nRA)), como hemos descrito anteriormente (Holstege, 1989; Holstege et al., 1997; Vanderhorst et al., 2000; Subramanian y Holstege, 2013; Subramanian et al., 2008; López-González, 2020; Trevizan-Baú et al., 2021a,b; Rocha et al., 2024). En este sentido, hay estudios que demuestran que la estimulación química de la SGPdl desencadena una respiración activa, como ocurre durante situaciones de lucha y huida, mientras que, la estimulación de la SGPdm y SGPm, produce bradipnea y apneas inspiratorias, respectivamente. Finalmente, la estimulación de la SGPI y la SGPvl induce patrones respiratorios asociados con vocalizaciones (Subramanian et al., 2008).

2.4.1.4 Propiedades neuroquímicas de la SGP

La SGP contiene diferentes tipos de neuronas que utilizan diferentes tipos de neurotransmisores. Se ha descrito la expresión de receptores de todo tipo, como son NMDA (Siegfried y Souza, 1989), GABAA (Behbehani et al., 1990), μ -opioides (Fields, 2004), neuroquinina-1 (Gregg y Siegel, 2003) y TRPV1 (Palazzo et al., 2010). Cada una de las columnas que componen la SGP utiliza un sistema u otro

de neurotransmisión en función de la información integrada y la respuesta que module.

Por ejemplo, con respecto a la modulación del dolor, son varios los tipos de neurotransmisores utilizados por la SGP. Entre ellos el glutamato, ácido g-aminobutírico (GABA), opioides, cannabinoides, dopamina y serotonina (5-HT), participan en el ajuste del fino equilibrio entre la facilitación y la inhibición descendente de la nocicepción. Los agonistas del glutamato o de los receptores ionotrópicos del glutamato microinyectados en el SGPvl elevan los umbrales sensoriales, mientras que los antagonistas glutamatérgicos inducen hiperalgesia. Por el contrario, la inyección de agonistas GABA en el SGPvl produce hiperalgesia, mientras que la inyección de sus antagonistas produce efectos antinociceptivos (Samineni et al., 2017; Nguyen et al., 2023). Además, se han identificado ocho subtipos de receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR1-8) en la SGP, de los cuales mGluR1 y mGluR5 causan hiperalgesia y mGluR2-4 y mGluR6-8 inducen analgesia (Peng et al., 2023).

Con respecto a los opioides, la inyección de agonistas del receptor m-opioide en la SGPvl genera antinocicepción, y los opioides inducen principalmente analgesia a través de la inhibición presináptica de las proyecciones GABAérgicas y serotoninérgicas de la RVM (Vázquez-León et al., 2023).

El receptor cannabinoide 1, que se expresa ampliamente tanto en el SGPdl como en la SGPvl, activa el circuito modulador descendente del dolor. Su activación en la SGPvl induce antinocicepción y antihiperalgesia, mientras que su activación en la SGPdl media en la analgesia inducida por estrés independiente de opioides (Bouchet e Ingram, 2020).

Respecto a la modulación de las respuestas de ataque/defensa moduladas por la SGP, se ha visto como neurotransmisores como el glutamato, el GABA, la serotonina y los opioides endógenos están presentes en la SGP, donde interactúan de forma compleja para regular dichas respuestas defensivas. Se ha demostrado que la alteración de estos sistemas neurotransmisores dentro de la SGP influye en los comportamientos defensivos. Por ejemplo, la inyección de semicarbazida, un inhibidor de la glutamato deshidrogenasa, en la SGPdl induce

comportamientos de inmovilidad, mientras que la administración de bicuculina, un antagonista del receptor GABA-A, en la misma zona provoca respuestas de escape significativas (Borelli et al., 2005). Se ha observado que la activación de los receptores 5-HT_{1A} y μ -opioides en la SGPd produce respuestas de escape significativas. Además, se ha observado que aumenta el umbral de intensidad de corriente eléctrica necesario para evocar la respuesta de escape (Roncon et al., 2017). Por otro lado, las inyecciones de agonistas de receptores cannabinoides en la SGPd disminuyen el comportamiento de congelación asociado al miedo contextual (Resstel et al., 2008). Todos estos hallazgos enfatizan la intrincada interacción entre los neurotransmisores y sus receptores en el GAP, destacando sus importantes contribuciones a la modulación de los comportamientos defensivos.

Para finalizar, al igual que sucede con las conexiones anatómicas, hemos de enfatizar que las propiedades químicas de la SGPd son claramente distintivas respecto de las otras subregiones de la SGP. Esto queda patente, sobre todo, en la diferente expresividad de distintas enzimas involucradas en la síntesis de diferentes neurotransmisores. Destacamos el caso de la NADPH diaforasa o la óxido nítrico sintasa (NOS), marcadores de las neuronas que sintetizan óxido nítrico (Herbert y Saper, 1992; Bandler y Shipley, 1994) que limitan su presencia a la subregión de la SGPd. Del mismo modo, se ha demostrado la presencia exclusiva de la enzima acetilcolinesterasa en la SGPd (Illing y Graybiel, 1986). Por contra, la enzima citocromo oxidasa no está presente en la SGPd, pero sí lo está en el resto de subregiones de la SGP (Conti et al., 1988). Otra característica distintiva de la SGPd es que contiene una densidad mucho mayor de neuronas y terminales GABA que la SGPdm adyacente y la SGPI (Barbaresi, 2005, 2010). También hay una mayor densidad de receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato en la SGPd en comparación con las otras subregiones de la SGP aunque, en este caso, la diferencia es menos marcada que en las neuronas y terminales GABA (Albin et al., 1990; Azkue et al., 1997).

Por último, hay que añadir que se describe una densidad muy baja de terminales inmunorreactivos para la dopamina- β -hidroxilasa en la SGPd y SGPdm en comparación con la SGPI y SGPvl (Herbert y Saper, 1992), lo que indica que

estas subregiones no reciben una inervación adrenérgica significativa. La SGPvl contiene un grupo de neuronas dopaminérgicas (Lu et al., 2006). Recientemente, se ha demostrado que la SGPdl presenta proyecciones excitatorias, ya que éstas presentan terminales axónicas inmunopositivas (+) para el transportador vesicular de glutamato tipo 2 (VGLUT- 2) (Evans et al., 2018; Lefler et al., 2020).

2.4.1.5. SGP y control de la actividad laríngea y la vocalización

Una actividad motora crucial en el contexto de la supervivencia básica es la respiración. Es necesario un aporte constante de oxígeno, por lo que la respiración tiene que ser continua, aunque su frecuencia y profundidad dependan de la situación del individuo. Durante el reposo, por ejemplo, esta respiración es tranquila (eupnea), pero en circunstancias peligrosas, cuando el individuo tiene que luchar o huir, necesita cantidades mucho mayores de oxígeno, producidas por frecuencias y profundidades de respiración mucho mayores (Holstege, 2014).

La SGP, a través de sus proyecciones descendentes hacia centros del tronco del encéfalo, interviene en los sistemas motores involucrados en la respiración. Aunque no tiene proyecciones directas a las motoneuronas preganglionares somáticas o autonómicas, puede modificar su actividad mediante circuitos relacionados con la modulación de interneuronas premotoras (Holstege, 2014). Estudios en los que se realizaron microestimulaciones químicas de la SGP demostraron la producción de vocalizaciones (Bandler et al., 1988; Carrive et al., 1989; Zhang et al., 1994; Subramanian et al., 2008, 2014), mientras que otros estudios en los que se lesionaba esta misma zona producen mutismo, incluso estando intactas las estructuras del cerebro anterior. Esto demuestra que la SGP es un área crítica en la expresión vocal, tanto en gatos como en humanos (Alexander, 2001; Holstege et al., 2016; Subramanian et al., 2021).

La estimulación eléctrica de otras regiones muy interconectadas con la SGP como son el hipotálamo, la amígdala, la corteza prefrontal y el cortex cingulado anterior, también producen vocalizaciones en primates (Holstege et al., 1985; Holstege, 1987; Holstege, 1991; Kuipers et al., 2006). Mientras que, las estimulaciones desde la corteza motora o premotora, las cuales no tienen conexiones directas con la SGP, no producen dichas vocalizaciones (Jürgens,

1974; Kirzinger y Jürgens, 1982). Otros estudios demuestran que las conexiones existentes con el nRA son fundamentales en este papel de coordinación en la generación de vocalizaciones por parte de la SGP (Schadt et al., 2006; Subramanian y Holstege, 2009).

2.4.2. Grupo Respiratorio Pontino

Como se ha demostrado históricamente, la ritmogénesis respiratoria está orquestada por circuitos neuronales de premotoneuronas y motoneuronas situadas en la región caudal del tronco del encéfalo. No obstante, las zonas anteriores también desempeñan un papel fundamental en la modulación respiratoria indispensable para la vocalización. El cPB-KF, también considerado como el Grupo Respiratorio Pontino (GRP), está reconocido como un componente central dentro de estos circuitos respiratorios.

2.4.2.1. Complejo parabraquial

El cPB es una región cerebral muy interconectada con la SGP y que está implicada en la regulación de las funciones cardiovasculares y respiratorias. Este complejo funciona como un núcleo intermedio de información propioceptiva que proyecta a la corteza motora laríngea y al nA (Geerling et al. 2017; Farley, 1992). Se ha demostrado con registros electrofisiológicos la actividad neuronal de esta zona durante la vocalización y es un área involucrada en la coordinación motora laríngea. Además, es una zona que, junto con la SGP, presenta una alta inmunorreactividad a la expresión del gen foxP2, lo que demuestra que son regiones involucradas en la producción de vocalizaciones por su implicación en la modulación del flujo espiratorio (Stanić et al. 2018).

La subdivisión lateral del cPB (cPBI) es una región integradora a nivel protuberancial, contribuyendo a establecer la duración de la inspiración y la espiración (Navarrete-Opazo et al., 2020). Esta función se hace posible gracias a sus proyecciones, tanto aferentes como eferentes. Algunas de estas conexiones son con la amígdala central (Moga et al., 1990; Bianchi et al., 1998; Bienkowski and Rinaman, 2013; Yang et al., 2020), al complejo pre-Bötzing y Bötzing (Yang et al., 2020; Yu et al., 2022; Tan et al., 2010; Yang and Feldman, 2018), al núcleo

parafacial lateral (Biancardi et al., 2021), al KF (Song et al., 2012; Geerling et al., 2017), al GRVc (Gerrits and Holstege, 1996), al rVRG (Holstege, 1989), al nA (Rübsamen and Schweizer, 1986), al núcleo retrotrapezoide (Rosin et al., 2006), al NTS (Bianchi et al., 1998), al locus coeruleus (Robertson et al., 2013; Yang et al., 2020), al rafe dorsal y caudal (Hermann et al., 1997; Bianchi et al., 1998; Lee et al., 2003; Peyron et al., 2018; Kaur et al., 2020), al núcleo paraventricular (Moga et al., 1990; Singh et al., 2022; Geerling et al., 2010) y a la SGP (Bianchi et al., 1998).

La subdivisión medial (PBm) trabaja en conjunto con la región vecina KF, modulando la duración los tiempos inspiratorios y espiratorios. Concretamente, el PBm contiene más neuronas espiratorias que el núcleo KF, el cual tiene más neuronas inspiratorias y de fase (Song et al., 2006). Por tanto, su función principal es modular la duración de la espiración (Zuperku et al., 2017). Al igual que el PBI, el PBm presenta aferencias y eferencias con centros con control cardiorrespiratorio como son los complejos pre-Bötzinger y Bötzinger (Yang y Feldman, 2018; Yang et al., 2020), el KF (Song et al., 2012; Geerling et al., 2017), el núcleo parafacial lateral (Biancardi et al., 2021), Grupo Respiratorio Ventral rostral (GRVr) (Holstege, 1989) y Grupo Respiratorio Ventral caudal (GRVc) (Gerrits and Holstege, 1996; Yokota et al., 2016), nA (Guo et al., 2020), núcleo retrotrapezoide (Rosin et al., 2006), NTS (Herbert et al., 1990; McGovern et al., 2015), amígdala central (Moga et al., 1990; Yang et al., 2020) y SGP (Bianchi et al., 1998),

2.4.2.2. Núcleo Kölliker-Fuse

Otra área implicada en la respiración rítmica es el núcleo KF, el cual influye en el cambio de la inspiración a la espiración (Damasceno et al., 2014; Dutschmann et al., 2021). Estas neuronas muestran actividad relacionada con fases específicas de la respiración, estando activas durante la inspiración y dejando de disparar abruptamente al final de la misma, marcando la transición inspiración-espiración (Ezure and Tanaka, 2006; Dutschmann et al., 2021). Un bloqueo bilateral de esta zona prolonga la actividad inspiratoria del nervio frénico, pero sin bloquear completamente la finalización de la actividad inspiratoria (Dutschmann et al., 2021), por lo que no es un núcleo exclusivo en la terminación de la inspiración, sino que hay otras áreas que también influyen en esa actividad. El KF modula la actividad

del núcleo frénico (Ellenberger et al., 1990b; Yokota et al., 2007; Song et al., 2012; Geerling et al., 2017), del nA, hipogloso y facial (Núñez-Abades et al., 1990; Yokota et al., 2007; Song et al., 2012; Yokota et al., 2015; Geerling et al., 2017). Estas conexiones permiten que las neuronas premotoras del KF activen los músculos implicados en la regulación del flujo de aire, reduciéndolo durante la post-inspiración (Dutschmann and Herbert, 2006).

El KF presenta conexiones tanto aferentes como eferentes con el complejo pre-Bötzing y Bötzing (Ezure et al., 2003; Tan et al., 2010; Yang and Feldman, 2018; Yang et al., 2020), el GRVr (Lipski et al., 1994; Yokota et al., 2016), el GRVc (Holstege, 1989; Jones et al., 2016; Song et al., 2012), el cPB (Song et al., 2012; Geerling et al., 2017), PiCo (Oliveira et al., 2021) y núcleo parafacial lateral (Biancardi et al., 2021), el núcleo retrotrapezoide, el NTS y la SGP (Song et al., 2012; Geerling et al., 2017; Trevizan-Baú et al., 2021b; Rosin et al., 2006; Bochorishvili et al., 2012; Silva et al., 2016a; Herbert et al., 1990; McGovern et al., 2015).

2.4.3. Complejo Post-inspiratorio (PiCo)

Recientemente, se ha identificado una segunda región cerebral involucrada en el control de la postinspiración en la zona ventral de la formación reticular intermedia: el complejo postinspiratorio (PiCo) (Anderson et al., 2016; Toor et al., 2019; Oliveira et al., 2021). Se trata de unas neuronas que pueden generar una actividad rítmica que alcanza su punto máximo durante la postinspiración y que actúan junto con el complejo pre-Bötzing y el núcleo parafacial (Anderson et al., 2016; Anderson and Ramirez, 2017). La estimulación optogenética in vivo confirmó que la actividad del PiCo puede prolongar la postinspiración (Oliveira et al., 2021). Parece probable, por tanto, que el PiCo esté involucrado en el control neural de la postinspiración, pero probablemente más como parte de una red integrada que como generador de patrones primarios (Hülsmann, 2021; Ashhad et al., 2022; Dhingra et al., 2020; Toor et al., 2019).

En cuanto a sus conexiones, el PiCo recibe una fuerte entrada de información desde el KF, la SGP, el NTS caudal e intermedio y el núcleo

paraventricular del hipotálamo (Oliveira et al., 2021) y también recibe proyecciones del complejo pre-Bötzing (Yang and Feldman, 2018). De las eferencias todavía se sabe poco, pero sí se han demostrado proyecciones hacia el complejo pre-Bötzing y el núcleo retrotrapezoide (Lima et al., 2019; Yang et al., 2020).

2.4.4. Núcleo parafacial lateral

El núcleo parafacial lateral puede desencadenar la expiración activa al final del ciclo respiratorio reclutando los músculos abdominales expiratorios a través del GRVc (Janczewski y Feldman, 2006; Huckstepp et al., 2015; Silva et al., 2016b; Pisanski y Pagliardini, 2019).

Es un área que recibe proyecciones de los complejos pre-Bötzing y Bötzing, el GRVr, el KF, la formación reticular, el rafe caudal, los núcleos parabraquiales lateral y medial, la SGP y los núcleos vestibulares (Biancardi et al., 2021). Este núcleo, en embriones de roedores o recién nacidos, es rítmicamente activo en reposo (Onimaru y Homma, 2003; Thoby-Brisson et al., 2009), mientras que disminuye su actividad a medida que va desarrollándose (Oku et al., 2007; van der Heijden y Zoghbi, 2020) hasta que, en adultos, se mantiene silente durante la eupnea, pero se activa rítmicamente durante la hiperpnea (Pagliardini et al., 2011; Huckstepp et al., 2015; de Britto y Moraes, 2017). Esta inactividad puede deberse a la inhibición tónica desde el NTS medial (Silva et al., 2019), mientras que la entrada excitatoria desde el NTS comisural, que transmite la entrada quimiosensible de los cuerpos carotídeos, puede activar neuronas en el núcleo parafacial lateral cuando los niveles de CO₂ en la sangre se encuentran elevados (Morris et al., 2018; Silva et al., 2019).

2.4.5. Grupo Respiratorio Dorsal (GRD)

El GRD está situado en el bulbo dorsomedial, perteneciente a un subnúcleo del NTS, que contiene un grupo clásicamente definido de neuronas con modulación respiratoria, principalmente inspiratorias. Este subnúcleo específico del NTS sirve de punto de entrada donde fibras aferentes de los nervios glossofaríngeo y vago convergen transmitiendo información sensorial desde quimiorreceptores periféricos (que controlan los niveles de gases en sangre) y los mecanorreceptores

pulmonares (que controlan el movimiento muscular y articular). En el GRD establecen sinapsis con neuronas premotoras inspiratorias, la mayoría de las cuales se proyectan hacia las motoneuronas frénicas predominantemente contralaterales (Feher, 2017).

El DRG desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de un ritmo respiratorio estable activando los músculos inspiratorios a intervalos regulares tras la espiración pasiva, permaneciendo inactivo durante ésta. Dentro de esta región existen neuronas tipo "rítmicas"; reciben entradas excitatorias monosinápticas de receptores de estiramiento pulmonar de adaptación lenta, que señalan el volumen pulmonar. Una señal adecuadamente programada para los músculos inspiratorios da lugar a una frecuencia respiratoria que suele oscilar entre 12 y 15 respiraciones por minuto en los seres humanos. Además, recibe señales del Grupo Respiratorio Pontino (PBm-KF), que recibe información de quimiorreceptores y mecanorreceptores centrales, junto con señales de regiones cerebrales superiores. Esta información se evalúa y a continuación se envían señales al GRV, que ajusta sus acciones de ventilación -aumentando la frecuencia o la profundidad o disminuyéndolas- en función de las necesidades musculares y corporales (Bautista et al., 2014; Feher, 2017).

2.4.6. Grupo Respiratorio Ventral

El GRV comprende una columna ventrolateral de neuronas respiratorias, que se subdivide rostrocaudalmente en el nA, nRA, complejo pre-Bötzing y Bötzing (Del negro et al., 2018; Dhingra et al., 2020). En el VRG se encuentran tanto neuronas espiratorias como inspiratorias, cuyas proyecciones se extienden a otras neuronas del tronco del encéfalo o sirven como como neuronas premotoras que proyectan a neuronas motoras respiratorias. Las neuronas espiratorias e inspiratorias están claramente localizadas en el GRVc y en el GRVr respectivamente. El segmento caudal del VRG, junto con el cercano complejo Bötzing, forma el "centro espiratorio" (Bautista et al., 2014).

2.4.6.1. Complejos Pre-Bötzinger y Bötzinger

El complejo pre-Bötzinger está constituido por una red neuronal que aporta la actividad rítmica necesaria para generar inspiración (Smith et al., 1991; Ramirez et al., 1998; Tan et al., 2008; Schwarzacher et al., 2011; Ashhad and Feldman, 2020; Dhingra et al., 2020). En roedores, este complejo neuronal troncoencefálico consta de unas 3000 neuronas, localizadas bilateralmente, tanto inspiratorias como espiratorias (Wallen-Mackenzie et al., 2006; Tan et al., 2008; Yackle et al., 2017), aunque también se han descubierto neuronas inspiratorias similares en las regiones circundantes, por lo que podría suponer una red neuronal más difusa de lo que se había descrito en un principio (Baertsch et al., 2019).

Aunque hay proyecciones directas desde el complejo pre-Bötzinger a múltiples núcleos motores respiratorios, las proyecciones indirectas parecen ser más frecuentes. Por ejemplo, modula al núcleo frénico a través de neuronas situadas en el GRVr (Wu et al., 2017) y a las neuronas motoras torácicas que controlan los músculos abdominales a través del GRVc (Yang and Feldman, 2018). Además, tiene conexiones con el núcleo hipogloso a través de la región parahipoglosal de la formación reticular (Chamberlin et al., 2007; Tan et al., 2010; Yang and Feldman, 2018) y con el núcleo facial a través de la formación reticular intermedia (Moore et al., 2004; Koshiya et al., 2014; Yang and Feldman, 2018; Guo et al., 2020). Además, otras regiones importantes en el control central cardiorrespiratorio como el núcleo retrotrapezoide, el NTS, el hipotálamo lateral y dorsomedial, los núcleos parabraquial lateral y medial y la SGP también reciben aferencias de este complejo (Tan et al., 2010; Koshiya et al., 2014; Yang and Feldman, 2018; Biancardi et al., 2021; Trevizan-Baú et al., 2021b).

En definitiva, el control del diafragma se realiza por motoneuronas del núcleo frénico, mientras que los músculos intercostales y abdominales están inervados desde la médula espinal torácica y lumbar (Wu et al., 2017). La actividad rítmica necesaria para impulsar la inspiración es llevada a cabo por esta red neuronal situada en el complejo pre-Bötzinger (Smith et al., 1991; Tan et al., 2008; Schwarzacher et al., 2011; Ashhad and Feldman, 2020; Dhingra et al., 2020). Dichas neuronas disparan en la fase de inspiración e impulsan indirectamente a los músculos inspiratorios (Smith et al., 1991; Guyenet and Wang, 2001; Moore et al.,

2013; Del Negro et al., 2018; Yang and Feldman, 2018). Su actividad depende de las presiones parciales de O₂ y CO₂ en el torrente sanguíneo, así como de propioceptores y receptores de distensión e irritación del pulmón y caja torácica. Esta información sensorial se transmite al tronco del encéfalo a través del nervio vago hacia el NTS lateral, lugar donde terminan las fibras aferentes del nervio vago (Holstege, 1991; Yokota et al., 2001). La inspiración está también modulada por la activación del KF (Dutschmann and Herbert, 2006; Anderson et al., 2016). Finalmente, el núcleo parafacial lateral se activa durante la espiración activa (Pagliardini et al., 2011; Huckstepp et al., 2015; Del Negro et al., 2018).

El complejo Bötzing, situado en la parte más rostral del GRV, alberga neuronas que inhiben la mayoría de las neuronas inspiratorias durante la espiración, desempeñando un papel importante en el control de la espiración (Smith et al., 2007). El complejo Bötzing incluye neuronas inhibitorias, caracterizadas por propiedades GABAérgicas y glicinérgicas, que presentan patrones de disparo decrecientes (postinspiratorios, post-I) o crecientes (aug-E) durante la espiración (Tian et al., 1998). Se cree que estas neuronas establecen conexiones sinápticas recíprocas con las neuronas del complejo re-Bötzing (Smith et al., 2007). La supresión de la actividad del Bötzing o la interrupción de sinapsis inhibitorias tanto en el complejo Bötzing como en complejo pre-Bötzing deprime significativamente la respiración, lo que subraya el papel crítico de la inhibición recíproca entre complejo Bötzing y complejo pre-Bötzing en la regulación del ritmo respiratorio y la generación de la eupnea (Ausborn et al., 2018). En consecuencia, se ha propuesto que las neuronas del complejo Bötzing y pre-Bötzing constituyen el núcleo esencial de la red respiratoria (Richter y Smith, 2014).

2.4.6.2. Núcleo ambiguo

El nA en rata contiene motoneuronas tanto laríngeas como faríngeas y esofágicas. Es un área que recibe aferencias tanto del GRP como del GRD, los cuales desempeñan un papel modulador (Núñez-Abades et al., 1990). Estas motoneuronas se distribuyen con cierta somatotopía desde la región caudal del tronco del encéfalo hasta el límite con la médula espinal. Concretamente, las

motoneuronas situadas en el nA controlan la musculatura intrínseca de la laringe. Estas motoneuronas laríngeas forman una columna neuronal orientada rostrocaudalmente y situada en la porción ventrolateral del bulbo (Ramón y Cajal, 1909; Lawn, 1966) e inervan la laringe a través del nervio vago. Concretamente a través de sus dos ramas: el nervio laríngeo recurrente y el nervio laríngeo superior. Sin embargo, para la vocalización no solo es importante controlar la laringe, sino que también es necesario controlar el resto de elementos que intervienen en la emisión vocal, como son la respiración o la articulación (Jürgens, 2009).

Organización anatómico-funcional del nA

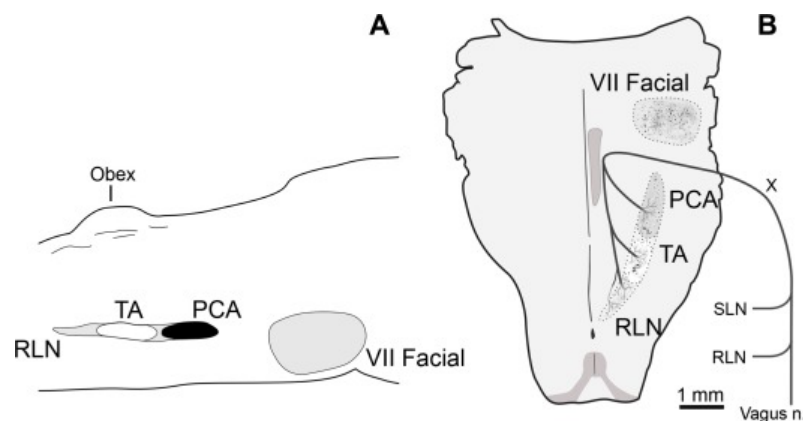
Algunos autores sostienen que las motoneuronas laríngeas que inervan los músculos laríngeos están distribuidas de manera difusa a lo largo del nA, mientras que otros sostienen que se puede observar una clara organización somatotópica. Según estos últimos, podríamos dividir el nA en tres partes principales: la **formación compacta**, con motoneuronas que inervan el esófago; la **formación semicompacta**, con motoneuronas que inervan la faringe y el músculo cricotiroideo a través del nervio laríngeo superior; y la **formación dispersa**, con motoneuronas que inervan el resto de músculos laríngeos, excepto el cricotiroideo, a través del nervio laríngeo recurrente (Bieger y Hopkins, 1987) (Figura 9). Se acepta, por tanto, que las motoneuronas laríngeas se localizan en la parte caudal del nA (formación semicompacta y dispersa). Pero el nA, además de inervar los músculos laríngeos, también proporciona inervación motora al esófago y faringe (Lawn, 1966; Bieger y Hopkins, 1987).

La posición de estas poblaciones neuronales se ajusta a la observada en las proyecciones descritas en la rata para el nervio laríngeo superior y el laríngeo recurrente (Pascual-Font et al., 2011; Weissbrodet al., 2011) y concuerdan también con algunos estudios previos que muestran que en la rata las motoneuronas que inervan los músculos laríngeos intrínsecos constituyen una columna continua con una organización somatotópica rostrocaudal (Portillo y Pasaro, 1988; Van Daele y Cassell, 2009), como también se ha descrito en otros modelos animales (Yoshida et al., 1982, 1985; Davis y Nail, 1984; Okubo et al., 1987). Tomando el obex como referencia (Hamilton & Norgren, 1984), encontramos que las motoneuronas del

nervio laríngeo superior se extienden rostrocaudalmente entre 2590 y 1230 μm dentro de la formación sempicompacta y las motoneuronas del nervio laríngeo recurrente se extienden entre 1800 y 900 μm dentro del formación dispersa, solapándose así en un territorio rostral al obex. Hay consenso general en que los somas de las motoneuronas del nervio laríngeo superior están situados rostralmente con respecto a las del laríngeo recurrente y que ambas poblaciones se solapan (Pascual-Font, 2011).

Figura 9

Ubicación de las motoneuronas laríngeas y faciales dentro del tronco encefálico



Nota: Ubicación de las motoneuronas laríngeas y faciales dentro del tronco encefálico resumida en una vista sagital (A) y horizontal (B). X, nervio vago; VII Facial, Núcleo Facial; NLR, Nervio Laríngeo Recurrente; SLN, Nervio Laríngeo Superior; PCA, Músculo Cricoaritenideo Posterior; TA, Músculo Tiroaritenideo. De “Muscle specific nucleus ambiguus neurons isolation and culturing” por Hernandez-Morato, I., Pitman, M. J., & Sharma, S. (2016). *Journal of neuroscience methods*, 273, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.07.014>

El grado de conservación entre especies de la organización somatotópica de las neuronas laríngeas en el nA también es controvertido. Algunos sostienen que el patrón está fuertemente conservado entre especies (Yoshida et al., 1982, 1985, 1998; Okubo et al., 1987). Sin embargo, debido a las incertidumbres en la homología entre los músculos laríngeos en diferentes especies, esta conservación del patrón somatotópico no siempre es fácil de establecer. En la rata, por ejemplo, la morfología de la laringe es diferente porque no cuentan con el músculo

aritenosoide y su función la desempeña el músculo cricoaritenosoide superior, un músculo que sólo se encuentra en rata (Kobler et al., 1994; Inagi et al., 1998). Esta es una de las diferencias que podrían explicar las diferencias en la organización somatotópica de las motoneuronas laríngeas en rata (Portillo y Pasaro, 1988; Hirasugi et al., 2007). Se han hecho estudios en gato que demuestran que los somas de las motoneuronas que inervan los músculos cricotiroideo, cricoaritenosoide posterior y tiroaritenosoide se localizan en una columna rostrocaudal continua dentro del nA ipsilateral, dispuestas somatotópicamente desde la población más rostral (motoneuronas del cricotiroideo), hasta la población más caudal (motoneuronas del tiroaritenosoide). Hay también pequeñas áreas de solapamiento entre poblaciones de neuronas adyacentes (Hernandez-Morato et al., 2016).

En trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación, se ha caracterizado la actividad de las motoneuronas laríngeas del nA y los mecanismos reflejos implicados en las respuestas laríngeas respiratorias, sugiriendo que el cPB y la región A5 tienen un papel en la modificación de la actividad de las motoneuronas laríngeas localizadas en el nA y, en consecuencia, modifican el tono y la actividad de la musculatura estriada laríngea de la vía aérea superior (Dawid-Milner et al. 1993; Lara et al. 2002). Estudios actuales demuestran que los patrones motores laríngeos y respiratorios se sincronizan de manera precisa, siendo el patrón dominante el respiratorio (Tschida et al. 2019). Esta sincronización garantiza que los patrones motores vocales laríngeos coincidan con la fase postinspiratoria o espiratoria del ciclo respiratorio (Riede et al., 2020).

Características de las neuronas del nA

Con respecto a la forma que tienen estas neuronas del nA, suelen ser estrelladas, sin embargo, en las poblaciones del músculo cricotiroideo y cricoaritenosoide posterior se observan algunos somas fusiformes. Las motoneuronas que corresponden al músculo tiroaritenosoide son de mayor tamaño, las del músculo cricotiroideo son de tamaño intermedio, siendo las más pequeñas las del músculo cricoaritenosoide posterior. Esta variabilidad en el tamaño se ha relacionado con el papel que desempeñan estas neuronas en la fisiología laríngea.

El mayor tamaño de las motoneuronas del músculo tiroaritenoso se asocia a la rápida actividad aductora durante el ciclo respiratorio, mientras que la menor velocidad de contracción de los músculos cricotiroideo y cricoaritenoso posterior podría estar relacionada con el menor tamaño de sus motoneuronas (Hinrichsen y Ryan, 1981; Davis y Nail, 1984; Patrickson et al., 1991; Yoshida et al., 1998). A su vez, Hayakawa et al. (1999) identificaron dos tipos de neuronas que participan en el control del músculo cricoaritenoso posterior. Las más grandes, motoneuronas, probablemente, reciben señales excitatorias y, las más pequeñas, interneuronas, señales inhibitorias.

2.4.6.3. Núcleo Retroambiguo

El nRA es una región del tronco del encéfalo que desempeña un papel fundamental en la regulación de la respiración. Hay estudios en gatos que muestran que una activación de regiones específicas dentro del nRA induce vocalizaciones sin alteraciones concomitantes en la inspiración. Por otro lado, la estimulación en otras áreas del nRA no logra provocar emisión vocal, pero sí aumenta la frecuencia respiratoria al acortar las duraciones tanto de la inspiración como de la espiración. Esto sugiere la existencia de diversos subconjuntos neuronales dentro del nRA que regulan tanto la vocalización como las funciones respiratorias (Subramanian & Holstege, 2009).

Es una zona que se encuentra caudal al complejo pre-Bötz y contiene tanto neuronas premotoras inspiratorias como espiratorias (Merrill, 1970). Históricamente, ha habido controversia a la hora de denominar sus diferentes regiones. Hay autores que han denominado VRG a todas las neuronas respiratorias del nRA (Shannon and Freeman, 1981), mientras que otros se refieren al nRA específicamente como GRVc (Subramanian y Holstege, 2009) o consideran el nRA y GRVc como áreas superpuestas dentro de la formación reticular medular caudal (Jones et al., 2016). Actualmente, hay más autores que utilizan los términos GRVr para la zona que alberga neuronas premotoras inspiratorias y GRVc para aquella que incluye neuronas premotoras espiratorias (Krohn et al., 2023).

El GRVr está constituido por premotoneuronas que proporcionan una entrada monosináptica a las motoneuronas del núcleo motor frénico. Actúa como

el intermediario más importante entre el complejo pre-Bötzinger y las motoneuronas diafragmáticas (Ellenberger and Feldman, 1988; Boulenguez et al., 2007; Buttry and Goshgarian, 2015). Este grupo está asociado específicamente con la fase inspiratoria. Sus premotoneuronas parecen desempeñar un papel dando forma al patrón de salida motora respiratoria, procesando y transmitiendo información sensorial de entrada y coordinando la ventilación con la actividad motora al regular la actividad de los músculos respiratorios (Jensen et al., 2020).

Estas funciones se basan en sus conexiones tanto aferentes como eferentes. El GRVr recibe entradas del complejo Bötzinger (Bryant et al., 1993; Ezure et al., 2003), del núcleo KF (Ellenberger and Feldman, 1990a; Zheng et al., 1998; Yokota et al., 2016), del GRVc (Zheng et al., 1998), del NTS (Ezure and Tanaka, 1996; Zheng et al., 1998), del núcleo retrotrapezoide (Rosin et al., 2006; Bochorishvili et al., 2012; Silva et al., 2016a) y del núcleo parabraquial medial (Yokota et al., 2016).

También tiene eferencias que se dirigen hacia el GRVc (Ellenberger and Feldman, 1990a; Gerrits and Holstege, 1996), el núcleo KF (Ellenberger et al., 1990b; Lipski et al., 1994; Yokota et al., 2016), el nA y los núcleos hipogloso y facial (Zheng et al., 1998; Tschida et al., 2019) y, en menor medida, al núcleo parafacial lateral (Biancardi et al., 2021), la formación reticular (Zheng et al., 1998), el núcleo retrotrapezoide (Rosin et al., 2006), el NTS y el núcleo parabraquial lateral (Ellenberger et al., 1990a; Zheng et al., 1998), el núcleo espinal del trigémino (Zheng et al., 1998), el cerebelo (Gaytán and Pásaro, 1998) y la oliva inferior (Swenson and Castro, 1983a).

En segundo lugar, el GRVc alberga neuronas premotoras espiratorias (Merrill, 1970) y, por lo tanto, es crucial en el control de cualquier actividad relacionada con la espiración, como la vocalización y reflejos como el vómito, la tos y el estornudo (Umezaki et al., 1997; Subramanian and Holstege, 2009).

El GRVc es la diana perfecta para convertir la espiración pasiva en espiración activa y generar actividades motoras que produzcan cambios en la presión abdominal, además de modificar la actividad de las motoneuronas que se localizan en el nA y que controlan el calibre de la faringe y la laringe. Todo esto es

posible gracias a las conexiones que establece con las motoneuronas que inervan el paladar blando, la faringe y la laringe, así como el diafragma y los músculos intercostales, abdominales y pélvicos, los cuales se encargan de controlar y modificar la presión intraabdominal, intratorácica y subglótica. Todo este control que ejerce sobre toda esta gama de motoneuronas es esencial para el control respiratorio y la vocalización (Boers et al., 2006)

El GRVc recibe tanto **entradas** excitatorias como inhibitoras del complejo pre-Bötzing (Gerrits and Holstege, 1996; Tan et al., 2010; Yang and Feldman, 2018) y del complejo Bötzing, el núcleo KF, el núcleo parafacial lateral y el GRVr (Gerrits and Holstege, 1996; Ezure et al., 2003; Song et al., 2012; Silva et al., 2016a). También recibe entradas directas desde el NTS (Gerrits and Holstege, 1996), el núcleo retrotrapezoide (Gerrits and Holstege, 1996; Rosin et al., 2006; Bochorishvili et al., 2012; Silva et al., 2016a), los PBI y PBm (Gerrits and Holstege, 1996) y desde la SGP (VanderHorst et al., 2000; Oka et al., 2008; Subramanian and Holstege, 2009; Holstege and Subramanian, 2016).

A diferencia del GRVr, las neuronas del GRVc no **proyectan** hacia el núcleo frénico, sino que en su lugar modula a las motoneuronas de los músculos abdominales en la médula espinal torácica y las de los músculos de las vías respiratorias superiores en el nA, hipogloso, trigémino y facial (Holstege, 1989; VanderHorst et al., 2001; Ezure et al., 2003; Boers et al., 2006; Holstege and Subramanian, 2016; Jones et al., 2016). Mientras que la vocalización depende de las proyecciones hacia el nA y la médula espinal, los reflejos expulsivos como la toso el estornudo utilizan principalmente solo esta última vía espinal sobre motoneuronas abdominales (Holstege, 1989; Umezaki et al., 1997). Otras eferencias se dirigen a los complejos pre-Bötzing y Bötzing, el núcleo KF, el GRVr, el núcleo retrotrapezoide, el PBI y la SGP (Holstege, 1989; Gang et al., 1995; Zheng et al., 1998; Rosin et al., 2006; Jones et al., 2016).

A modo de resumen, el nRA (GRVr y GRVc) está involucrado en la vocalización, la inspiración, la espiración forzada, la tos o el estornudo, el vómito, el parto y el comportamiento de apareamiento, incluso tiene un papel importante en la micción y la eyaculación. Aún no está claro si las interneuronas premotoras de la

nRA sólo se proyectan a un grupo específico de motoneuronas o si se proyectan a varios grupos de motoneuronas, implicadas en una de las actividades motoras específicas mencionadas anteriormente (Holstege, 2014).

2.5. FoxP2 COMO MARCADOR RELACIONADO CON RESPIRACIÓN Y VOCALIZACIÓN

FoxP2 (Forkhead box protein P2) es un factor de transcripción muy relacionado con la respiración y la vocalización, ya que es fundamental para el desarrollo de cerebro. Concretamente, está relacionado con en el lenguaje y el habla, así como con el desarrollo de los pulmones. Es por ello por lo que presenta una elevada expresión en todas estas zonas descritas anteriormente.

Este gen fue descubierto por primera vez en 1998 en un pedigrí de tres generaciones de una familia británica asociado a un trastorno del desarrollo del lenguaje que se denominó trastorno específico del lenguaje (TEL) (Vargha-Khadem et al., 1998). Se observó que diversos miembros de la familia presentaban dificultades en la producción de secuencias orales complejas y gramaticalmente correctas (apraxia del lenguaje) asociadas con una mutación en el gen FoxP2 (Lai et al., 2001; Turner et al., 2013). Dicha mutación es una mutación heterocigótica sin sentido que produce una sustitución de arginina por histidina (R553H). Esto afecta a la estructura de la proteína FoxP2, alterando su función normal, asociándose con problemas en el desarrollo del lenguaje, incluyendo dificultades en la coordinación motora orofacial, la producción de sonidos y la comprensión del lenguaje. Desde entonces, se han descrito casos similares e independientes. Se han definido varias alteraciones en el gen FoxP2 y, las afecciones causadas por dichas alteraciones suelen incluir un amplio espectro de déficits, entre ellos: problemas del habla y el lenguaje, dispraxia verbal, bajo coeficiente intelectual, retraso en el desarrollo y anomalías cerebrales (Reuters et al., 2017; Morgan et al., 2023).

El gen FoxP2 codifica una proteína que pertenece a la familia de los factores de transcripción FoxP. La proteína FoxP2 se expresa en diversos tejidos corporales durante el desarrollo (pulmonar, nervioso, cardiovascular e intestinal) y tiene una presencia particularmente fuerte en regiones cerebrales involucradas en la función cognitiva, el aprendizaje, producción y comprensión del lenguaje (Shu et al., 2001; Nudel et al., 2013). Estas regiones incluyen la corteza frontal, corteza motora, los ganglios basales (caudado), el cerebelo y el tálamo, lo que sugiere que FoxP2 desempeña un papel en el control fino de la coordinación de la producción

del habla. De hecho, en las patologías asociadas a fallos de la proteína FoxP2, como es el caso de los miembros afectados de la familia KE (FoxP2R553H), se encontró una reducción de la SGP en las regiones cerebrales relacionadas con el movimiento, incluyendo la cabeza del núcleo caudado, la circunvolución frontal inferior (área de Broca), la circunvolución precentral, el polo temporal y los lóbulos VIIB y VIIIB del cerebelo ventral (Enard et al., 2009; Usui et al., 2017; Chen et al., 2016).

Los factores de transcripción son moléculas clave en la regulación de la expresión génica, ya que se unen a regiones específicas del ADN y controlan la expresión de otros genes. Como factor de transcripción, la proteína FoxP2 contiene una serie de dominios de unión al ADN que le permiten fijarse a regiones específicas del ADN (región promotora o potenciadora) que se encuentran cerca de sus genes diana. Una vez unida al ADN, FoxP2 puede modular la transcripción de estos genes diana, es decir, controlar su nivel de expresión. FoxP2 se asocia con genes co-reguladores y remodeladores de la cromatina, lo que sugiere su papel en la modificación de la estructura de dicha cromatina y, por tanto, modifica la accesibilidad del ADN a otros factores de transcripción (Hickey et al., 2019). Además, se ha observado que FoxP2 interactúa con componentes del complejo de la ADN polimerasa II y las vías de señalización celular, lo que sugiere su implicación en la regulación de la transcripción y la respuesta celular a estímulos externos (Li et al., 2004). A nivel celular y funcional, se ha descubierto que FoxP2 regula directamente la expresión de genes implicados en la regulación de la morfología neuronal, afectando a la formación y extensión de las prolongaciones neurales, dendritas y axones, gracias a que controla la organización del citoesqueleto y el transporte a través del mismo y las cascadas de señalización celular, modificando la maduración y estabilización de las sinapsis dentro de las regiones que expresan dicha proteína (Kosubek et al., 2020; Horch et al., 2002; Vernes et al., 2011; Hirokawa et al., 2010; Kuo et al., 2023).

Los estudios en modelos animales que se comunican vocalmente y/o que aprenden a hablar, como ratones y aves, han demostrado que FoxP2 está involucrado en la adquisición de habilidades motoras finas necesarias para la producción de vocalizaciones propias dentro de cada especie. Estos estudios

muestran que FoxP2 tiene un papel muy conservado a través de la evolución en el desarrollo del lenguaje en dichas especies, sobre todo en mamíferos (Haesler et al., 2004, 2007; Schulz et al., 2010; Shu et al., 2005).

La evolución del gen foxP2 resulta especialmente interesante al analizarla en paralelo a la evolución humana. Tras la separación del linaje humano del linaje del chimpancé, se produjeron 2 sustituciones de nucleótidos en las posiciones 911 y 977 del exón 7 del gen FoxP2, generando un cambio de los residuos treonina por ácido aspártico y arginina por serina, respectivamente, en la proteína FoxP2 (T303N y N325S) (Enard et al., 2002). Esto significa que, en seis millones de años, no solo aparecieron, sino que se fijaron en las poblaciones humanas dos mutaciones en la región codificante, una tasa de evolución más acelerada de lo normal, teniendo en cuenta la conservación del resto de la proteína lo que, además, apunta a la existencia de selección positiva para los cambios. Todo ello dentro del contexto histórico en el que apareció el lenguaje oral como forma de comunicación de la especie humana. A lo largo de la evolución humana reciente, el gen FoxP2 no ha experimentado cambios en la secuencia de nucleótidos, siendo la proteína FoxP2 común a humanos modernos y a Neandertales (Krause et al., 2007).

Otros estudios han demostrado que FoxP2 tiene un papel muy importante en la plasticidad neuronal al afectar a la neurogénesis y la supervivencia neuronal, afectando directamente a la organización de circuitos neurales, el desarrollo, la diferenciación y migración neuronal. Todo esto sugiere que FoxP2 puede influir en la capacidad del sistema nervioso para modelar el cerebro para adaptarlo a la adquisición del lenguaje, adaptarse y responder a cambios en el ambiente o las experiencias vitales de la persona (Spiteri et al., 2007; Oswald et al., 2017; Druart et al., 2020).

2.6. ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS

Un mejor conocimiento de las relaciones entre estas regiones que expresan FoxP2, permitirá comprender mejor los mecanismos de control laríngeo y los diferentes tipos de alteraciones asociados a estos mecanismos. Ejemplos de estas alteraciones son la disfonía espasmódica o distonía laríngea, los movimientos paradójicos de aducción laríngea y la disfonía musculo tensional secundaria al estrés. También son de especial relevancia las apneas respiratorias.

La disfonía espasmódica, una forma focal de distonía, es una alteración neurológica de la voz que se manifiesta con “espasmos” involuntarios de las cuerdas vocales, los cuales resultan en interrupciones del habla y afectan la calidad de la voz. Existen dos tipos reconocidos de disfonía espasmódica, la disfonía espasmódica aductora (cierre excesivo intermitente de las cuerdas vocales) y la disfonía espasmódica abductora (apertura prolongada de las cuerdas vocales). La causa de la disfonía espasmódica es desconocida, aunque existe cierto consenso en que tras ella hay una alteración del sistema nervioso central, sobre todo a nivel del control motor. Se asocian con alteraciones en el circuito de los ganglios de la base, cerebelo, corteza sensoriomotora, y alteraciones estructurales en los tractos corticobulbares y corticoespinales, tractos nerviosos que proyectan a las motoneuronas bulbares responsables de la fonación (Creighton et al., 2015).

Los movimientos paradójicos de aducción laríngea se caracterizan por la aducción o aproximación de las cuerdas vocales durante el ciclo respiratorio (especialmente durante la fase inspiratoria), lo que ocasiona una obstrucción de la vía aérea a nivel laríngeo. La disnea y estridor consiguientes son frecuentemente confundidos con asma, pero sin embargo no responden al tratamiento con esteroides y broncodilatadores, ya que el estrechamiento glótico es independiente del calibre de la luz bronquial. El origen de esta intermitente interrupción del flujo aéreo transglótico debido a la aducción laríngea paradójica permanece aún por dilucidar. Se ha relacionado con la irritación laríngea por agentes como el reflujo gastroesofágico o el estrés severo agudo (Christopher and Morris, 2010).

La disfonía musculotensional corresponde a un trastorno vocal provocado por un uso muscular laríngeo inadecuado. Esta patología presenta un aumento de la tensión muscular en la laringe y más específicamente una relajación insuficiente del músculo cricoaritenideo posterior controlado desde el nA (abductor de las cuerdas vocales) durante el proceso de fonación. También existe un desbalance de fuerzas musculares sinérgicas y antagónicas, cuya permanencia produce alteraciones orgánicas a nivel de la cuerda vocal agravando el cuadro de esta patología asociada al estrés (Van Houtte 2011; Fernández et al., 2020; Garaycochea et al., 2021).

La apnea respiratoria laríngea constituye, con frecuencia, una manifestación clínica de especial gravedad, como ocurre en la apnea del recién nacido o en las apneas centrales del sueño, causadas por inmadurez o anomalías del control central respiratorio en dichos individuos, causando una respuesta exagerada del reflejo de adducción laríngea (Drager et al., 2010; Wang et al., 2016).



HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las hipótesis de este proyecto se derivan de los trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación en los que demostramos que hay regiones protuberanciales (complejo Parabraquial-Kölliler-Fuse y región A5) que modifican la resistencia laríngea y, por tanto, la actividad de motoneuronas laríngeas del núcleo ambiguo (Lara et al., 2002). Dichas regiones protuberanciales participan y modifican, a su vez, la respuesta cardiorrespiratoria evocada desde regiones hipotálamo-mesencefálicas (DMH-PeF y PAG), siendo el glutamato uno de los neurotransmisores implicados (Díaz-Casares et al., 2009, 2012; López-González et al., 2013,2018,2020; González-García et al., 2023). La estimulación de la PAG y del núcleo retroambiguo generan vocalización (Subramanian, 2021) y la destrucción de la PAG genera mutismo en humanos (Jurgens, 2009). La expresión de FoxP2, factor de transcripción necesario para el desarrollo cerebral y pulmonar que está íntimamente relacionado con la vocalización, se produce en la mayoría de estas regiones (Stanic et al., 2018). Estudios previos demuestran que el diseño de la “**glotis aislada *in situ***” permite un registro continuo y estable de la presión subglótica en rata anestesiada, y que este registro se puede correlacionar con el registro neuronal unitario y con el resto de parámetros cardiorrespiratorios. De aquí se han derivado las hipótesis y los objetivos del estudio que planteamos a continuación.

Las **HIPÓTESIS** de partida que nos planteamos conociendo todo lo anterior son:

H1: se producirá un aumento de la expresión de c-Fos (marcador de actividad neuronal) en regiones bulpoprotuberanciales (nA) que expresan FoxP2 ante la estimulación eléctrica continuada (1h) de regiones mesencefálicas (SGPdl) involucradas en el control central cardiorrespiratorio y vocalización.

H2: el registro unitario extracelular del nA durante la estimulación eléctrica de la SGPdl permitirá demostrar cómo la SGPdl modifica la actividad de las motoneuronas laríngeas del nA.

H3: la microestimulación eléctrica y química de la SGPAI modificará los niveles de presión subglótica y, consecuentemente, la actividad de las motoneuronas laríngeas.

Una vez planteadas las hipótesis de nuestro trabajo, los **OBJETIVOS** que nos marcamos son los siguientes:

Como **objetivo general** de esta tesis doctoral, se pretende describir el posible papel modulador de la SGPdl sobre el nA en el control central de la función laríngea para mejorar la comprensión de los mecanismos neurofisiológicos subyacentes implicados en el control de la vocalización.

En cuanto a los **objetivos específicos** marcados han sido:

I. Caracterizar, en rata, la interacción morfofuncional entre la SGPdl y el nA a través de la expresión de las proteínas c-Fos y FoxP2 en las neuronas de las distintas subdivisiones de este nA por la microestimulación eléctrica de la SGPdl.

II. Caracterizar la actividad neuronal del nA mediante el registro neuronal unitario extracelular “in vivo” en reposo y después de la microestimulación eléctrica de la SGPdl.

IIIa. Recuperar y actualizar la técnica de “glotis aislada in situ”, ya descrita y utilizada por nuestro grupo de investigación, para realizar mediciones de presión subglótica y resistencia laríngea, utilizando esta variable como indicador de la actividad laríngea.

IIIb. Caracterizar, en rata, la respuesta laríngea y cardiorrespiratoria a la estimulación eléctrica y química de la SGPdl, utilizando la variable de presión subglótica como indicador de los cambios en la actividad laríngea.



MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

Los experimentos han sido realizados en 41 ratas macho no consanguíneas SPF (Specific-pathogen-free) del tipo Sprague-Dawley (cepa OFA-SD IOPS Caw), con una edad de 3 a 6 meses y un peso medio entre 300 y 350 gr, procedentes de la casa CRIFFA. Han sido estabuladas durante un mínimo de dos semanas en el Centro de Experimentación Animal de la Universidad de Málaga.

Para llevar a cabo todo el trabajo experimental se ha tenido en cuenta la normativa establecida por la directiva 2010/63/EU de la Unión Europea recogida en el Art. 34 del RD 53/2013 del 1 de febrero. El estudio experimental cuenta con la aprobación del Comité Ético para la Experimentación Animal de la Universidad de Málaga y de la Junta de Andalucía en noviembre de 2016 (57-2016-A) y abril de 2017 (30/03/2017/054) respectivamente y con una duración total de 5 años.

4.2. PREPARACIÓN QUIRÚRGICA

Anestesia del animal

El anestésico utilizado ha sido el pentobarbital sódico, con una dosis de ataque de 60 mg/kg y por vía I.P. Para la dosis de mantenimiento se ha utilizado una dosis de 2 mg/kg administrado por vía I.V. El nivel de anestesia se valoró por la ausencia reflejos durante la cirugía (v.g. reflejo de retirada de la pata o reflejo palpebral). El animal se mantiene con ventilación espontánea o asistida, con un CO₂ espiratorio que se mantendrá al 5% y una temperatura rectal a 37°C.

Con el fin de reducir la estimulación nociceptiva del animal a la hora de realizar las distintas incisiones durante la cirugía, tras la preparación del campo quirúrgico de cada una de las zonas, se realiza una administración tópica de lidocaína 100 mg/ml (Xilonibsa Aerosol 50 ml) como anestésico local.

Canulación de la vena y arteria femoral izquierda

En la zona del triángulo de Scarpa de la extremidad posterior izquierda se palpa el pulso femoral y se realiza una incisión para, mediante disección roma, dejar al descubierto vena y arteria femoral. A continuación, se pasa un hilo de sutura (calibre 2/0, métrica 3) por debajo de la parte distal y proximal de la vena femoral. Después se pinza la parte proximal de la vena con unas pinzas hemostáticas miniaturizadas tipo bulldog (Aesculap), favoreciendo la retención del retorno venoso y aumentando el calibre de la vena para facilitar su canulación, una vez aumentado el calibre anudamos el hilo situado en la zona distal de la vena. Se realiza una pequeña incisión transversal y se introduce un catéter de 0,4 mm de diámetro interior y 0,8 de diámetro exterior purgado con suero salino. Se fija con hilos de sutura (calibre 2/0, métrica 3).

Para la canulación de la arteria femoral pasamos dos hilos de la misma manera que se ha hecho en la vena, se anuda el hilo de la zona distal antes de poner la pinza hemostática para favorecer el relleno arterial y aumentar el calibre de la arteria. Una vez puesta la pinza, procedemos a realizar una pequeña incisión en la arteria e introducimos el catéter de 0,4 mm de diámetro interior y

0,8 de diámetro exterior purgado con suero heparinizado al 5%. Se fija con hilos de sutura (calibre 2/0, métrica 3).

La herida se cierra con grapas (12 x 2.5 mm de Medicon Instruments). El catéter venoso se conecta a una llave de tres vías para la administración de fármacos y el catéter arterial se conecta al transductor de presión.

Traqueotomía y canulación traqueal

Se practicó una incisión cutánea longitudinal medial desde 1 cm por encima del cartílago cricoides hasta la inserción de los músculos esternocleidomastoideos. Se realizó disección por planos musculares hasta visualizar la tráquea. Se tuvo especial cuidado con los nervios laríngeos recurrentes y, para evitar su lesión, se aislaron y se pasaron dos hilos de sutura (calibre 0, métrico 3.5) por debajo de la tráquea, dejando ambos nervios fuera del hilo. A continuación, se realizó una incisión transversal de la tráquea con un termobisturí entre el séptimo y el octavo anillo traqueal y se introdujo una cánula metálica (diámetro interno 2.5 mm) en dirección caudal que se fijó a la tráquea con hilo de sutura.

Canulación esofágica

Se aisló el esófago del animal con hilo de sutura y se ligó la porción más craneal. Se realizó una incisión longitudinal media con termobisturí y se introdujo una cánula de propileno rellena de aire (0.8 mm de diámetro externo y 0.6 mm de diámetro interno) hasta 1 cm por encima del límite esternal caudal aproximadamente. Se fijó la cánula al esófago con hilo de sutura. Por último, se fija la cánula a la piel del animal con hilo de sutura (calibre 0, métrico 3.5).

Disección y aislamiento del nervio vago y/o laríngeo recurrente

Se procede a la localización y disección del nervio vago y/o laríngeo recurrente. Posteriormente, se colocan sobre electrodos bipolares Ag/AgCl aislados con parafina filante.

Técnica de “glotis aislada in situ”

Se realiza una segunda incisión en la tráquea con el termobisturí a la altura

del tercer anillo traqueal y se introduce una cánula de DEHP (18G x 3/4" 1.25 x 20 mm) en dirección cefálica hasta la altura del cartílago cricoides. Esta cánula se conecta a una llave de tres vías para poder conectar un controlador de caudal de aire digital de masa térmica (Bronkhorst Hi-Tec F-201CV-AGD-22-V) y un transductor aneroide (ADIInstrument modelo FE141, $\pm 0,03$ psi). El primero permite pasar un flujo de aire caliente humidificado hacia la glotis a una velocidad constante (30-70 ml/min). El segundo mide los cambios de presión a nivel subglótico, ya que con un flujo de aire constante, los cambios de presión indican cambios en la resistencia laríngea. Se fija la cánula a la piel del animal con hilo de sutura (calibre 0, métrico 3.5). Se fija también la lengua con hilo de sutura (calibre 0, métrico 3.5) para evitar que durante la estimulación se produzcan retracciones que influyan en los cambios de presión subglótica.

Parietostomía bilateral posterior

Se sitúa al animal en posición decúbito prono en el aparato de estereotaxia (Kopf Instrument) situado en una mesa antivibratoria, con la barra superior 3.3 mm por debajo de la línea interaural (Paxinos y Watson, 2007). Se fija el hocico, la boca y la cabeza del animal con barras laterales en los conductos auditivos externos. Para mantener constante la temperatura del animal ($37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$), se colocó sobre un sistema de manta termostática homeotérmica controlada con una sonda rectal.

Se preparó el campo quirúrgico y se realizó una incisión longitudinal medial en la cabeza del animal, dejando al descubierto la calota con una disección roma con espátula de la aponeurosis y planos musculares. Se cubre con cera ósea el diploe para evitar hemorragias. Una vez visualizadas las zonas de bregma y lambda, con la ayuda de un taladro quirúrgico, se realiza una parietostomía posterior bilateral de 4 mm de diámetro en la zona de la SGPdl (4.0 mm posterior a bregma y 0.6 mm lateral a la línea media, teniendo en cuenta que el electrodo se introduce con un ángulo de 30°).

Para los experimentos de registro neuronal se aspiró el cerebelo del animal para dejar expuesto el tronco del encéfalo, concretamente la zona del obex, la cual se tomará como referencia para situar el nA.

4.3. VARIABLES REGISTRADAS, ALMACENAMIENTO Y ESTUDIO DE SEÑALES

En los experimentos se realizó un registro de las siguientes variables:

- Flujo respiratorio
- Presión pleural
- Presión arterial
- Frecuencia cardiaca
- Presión subglótica
- En algunos experimentos se registró la Actividad Neuronal Unitaria

A partir de éstas se obtuvieron las siguientes variables: la frecuencia respiratoria instantánea, el tiempo inspiratorio/espíatorio y la frecuencia cardiaca instantánea.

Las señales de estas variables se enviaron tras su obtención y amplificación a un panel de conexiones múltiples. Desde este panel se envían las señales 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 fue de 11 KHz y el rango de trabajo de ± 8 voltios.

Las variables registradas se almacenan en un PC para su posterior análisis con el software LabChartPro (PowerLab System, ADInstruments®/ LabChart Software, versión 8.0, Sydney, Australia).

Sistema de registro de la actividad eléctrica neuronal

En un esquema por bloques, se establecen los siguientes elementos:

A. Sistema de captación de la señal formado por microelectrodo, etapas amplificadoras, medidor de impedancia, actuador, sistema electrohidráulico para el microposicionamiento del microelectrodo y transformación de la señal en impulsos TTL.

B. Sistema de activación antidrómica con electrodos de estimulación, osciloscopio digital para control del potencial antidrómico y técnica de "colisión". El

disparo del generador de pulsos está gobernado por el generador de rampa (dispara cuando detecta un potencial de acción, en base a valores de amplitud reflejados).

Al mismo tiempo, el generador de rampa envía la señal al generador de barrido del osciloscopio digital mediante la conexión al “trigger out” y al integrador.

4.4. MATERIAL TÉCNICO PARA EL REGISTRO DE VARIABLES

Transductores de presión: para la medición indirecta de la presión pleural se utilizó un transductor de presión aneroide modelo T41-05 (Coulbourn Instruments). Para la medición del flujo respiratorio se utilizó un transductor de presión diferencial modelo SP-2040D. Para la medición de la presión arterial se empleó un transductor modelo MP-15D (Coulbourn Instrument). Presenta un rango de actividad de -50 a 300 mmHg y una sensibilidad de 50 $\mu\text{V/V/cmHg}$.

Medidor/controlador de caudal másico de gas por efecto térmico: modelo Hi-Tec F-201CV-AGD-22-V (Bronkhorst). Permite el paso de un flujo de aire constante (30-70 ml/min) artificial caliente y humidificado (36-37°C) a través de la cánula laríngea en dirección a la glotis.

Espirómetro: transductor aneroide modelo FE141, $\pm 0,03$ psi (ADInstrument). Con un flujo de aire constante, los cambios de presión indican cambios en la resistencia laríngea.

Neumotacógrafo: modelo Fleisch (00) (sensibilidad de 11.25 ml/s equivalente a 1 mmH₂O). Se conectó directamente con la cánula traqueal en dirección caudal para el registro del flujo respiratorio.

El gradiente de presión, directamente proporcional al flujo de aire, se obtuvo conectando el neumotacógrafo a un transductor de presión diferencial. Se obtienen variaciones cíclicas relacionadas con las fases respiratorias. En cada ciclo, se pueden definir dos puntos de flujo cero (final de la inspiración y de la espiración), y dos puntos de deflexión máxima de registro (flujo máximo inspiratorio y espiratorio).

Amplificadores: para el registro de presión pleural y flujo respiratorio se utilizó el modelo S72-25 (Coulbourn Instruments). Nivel máximo de entrada de 10 mV, con una resistencia de entrada de $10^{10} \Omega$ y una impedancia de salida de 50Ω . Para el registro de la presión arterial se utilizó el bioamplificador modelo FE117 (ADinstruments) con una impedancia de entrada de $>10\text{k}\Omega$ a 400Hz AC.

Osciloscopio digital: modelo VC-6023 (Hitachi). Permite trabajar con dos canales simultáneos, digitalizar la señal, calcular dimensiones y exportar

resultados a un ordenador. Se utilizó una unidad para visualizar flujo y la presión pleural, y otra para visualizar la intensidad de la estimulación eléctrica a tiempo real.

Osciloscopio analógico: modelo 5112 (Tektronik). Permite trabajar con 5 canales simultáneos. Se utilizó para visualizar el flujo respiratorio, presión pleural y presión arterial a tiempo real. Permite también la presentación simultánea y en tiempo real de los PAE y el flujo respiratorio.

Electrodos de estimulación bipolares: SNE 100 (Rhodes Medical Electrodes).

Microposicionador electrohidráulico: modelo 607-W (David Kopf Instruments), con un recorrido mínimo de 1 μm .

Mesa antivibratoria de gas: modelo TMC sys 63530.

Microscopio quirúrgico: modelo M-300 (Leica).

Torreta de estereotaxia: modelo SM-11 (Narishige). Soporta al microposicionador para la microinyección en la zona de estudio.

Amplificador diferencial: modelo DP-311-00 (ADInstruments). Preamplificador de señal con un cabezal que permite adquirir y monitorizar señales neuronales.

Amplificador de audio: modelo NL 120 (Neurolog). Para hacer audibles las descargas de PAE y el ritmo cardíaco.

Generador de onda cuadrada: modelo SEN-3201 (Nihon). Fuente de impulsos para estimular a través de los microelectrodos de estimulación.

Electrodos de tungsteno: para el registro neuronal. Modelo 5760 (A.M. System) con una impedancia D.C. 8-11 M).

Electrodos de plata: para el registro neuronal. Modelo ESW-F15N (Warner Instruments)

Unidad de aislamiento: modelo SS-302J (Nihon). Para evitar la aparición de posibles artefactos en la señal.

Convertidor analógico/digital: modelo ML870 Powerlab 8/30 (ADInstruments) con 8 canales y una resolución de 16 bits, capaz de grabar a velocidades de hasta 200.000 muestras por segundo. Este sistema incorpora 8 canales de entrada, 4 de ellos con conectores diferenciales POD y BNC de un solo extremo, y 4 entradas BNC de un solo extremo.

Grabador-reproductor de señales digitales: modelo D211EM (JVC-VHS). Para el almacenamiento se utilizaron cintas E-180 VHS de TDK.

Panel de conexiones múltiples: con 28 entradas intercambiables y 45 salidas. Diseñado por el prof. Marc Stefan Dawid-Milner y fabricado por Álava Ingenieros.

Bomba microinyectora: modelo micro4™ (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, EE.UU.). Para realizar microinyecciones de 50 nL con Hamilton 1.0 µl 7001 Knurled Hub (KH) Neuros Syringe.

4.4.1. Material técnico protocolo neuroanatómico

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.

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 Stellaris 8

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

Analizador de bioimágenes: Software Fiji ImageJ y Software QuPath.

Software VS de Olympus: para adquisición de imágenes tanto en campo claro como en fluorescencia.

Vórtex: MS2 (minishaker) IKA®. Voltaje: 230V, 50-60Hz. Potencia: 31W. Frecuencia de agitación: 0 – 2500 1/min. Dimensiones plato (∅): 7 cm. Dimensiones minishaker (w) x (D) x (H): 11.5 x 23 x 8cm.

4.5. FÁRMACOS

Pentobarbital Sódico (200 mg/ml): se utiliza para la anestesia del animal, con una dosis de ataque de 60 mg/kg. Esta dosis de ataque es de 0,1 ml/100g IP a una concentración de 60 mg/ml. La dosis de mantenimiento es a 2 mg/kg, es decir, 0,1-0,2 ml IV de una dilución al 20% de 0,2 ml de solución de 60 mg/Kg en 0,8 ml de suero salino.

PBS: tampón fosfato salino o buffer fosfato salino. Solución acuosa y salina que contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio. Con una osmolaridad y concentración de iones muy semejante a la del líquido extracelular de mamíferos. Tiene un pH de 7.4 ± 0.1 . No modifica el funcionamiento normal de la célula ni el perfil de expresión.

Azul de Evans: sustancia con la que el tejido en contacto adquiere una tonalidad violácea. Sirve para el marcaje de las zonas de microinyección. Suele hacerse una dilución de PBS y azul de Evans 1 % (50 nl).

Glutamato: peso molecular de 187.13. Se inyectan 50 nL de una solución 0.25M.

Lidocaina: Xilonibsa 10 mg/pulsación (Inibsa), solución para pulverización cutánea.

4.6. PROTOCOLO NEUROMORFOLÓGICO

Para cuantificar cambios en la expresión de dos factores de transcripción (expresión proteína c-Fos y proteína FoxP2) tras la estimulación eléctrica de SGPdl se realizó un tercer bloque experimental de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

Se anestesiaron 10 animales con pentobarbital sódico (dosis inicial de 60 mg/kg i.p., complementada con 2 mg/kg i.v. según necesidad) y se practicó la canulación de vena y arteria femorales, tal y como se describen en el apartado 4.2. *Preparación quirúrgica.*

Para la estimulación de la SGPdl, se practicó una parietostomía derecha y se introdujo un electrodo concéntrico bipolar (Rhodes Medical electrodes, NE-100) en la SGPdl (4,0 mm caudal al bregma, 0,6 lateral a la línea media y 4,5 a 5 mm de profundidad desde la superficie de la calota; aproximándose con un ángulo de 30°) (Paxinos y Watson, 2007).

En 5 animales se estimuló eléctricamente la SGPdl (pulsos de 1 ms, 30-50 μ A a 100 Hz durante 5 s, cada 60 s durante una hora) para provocar la respuesta de defensa clásica observada por Yardley y Hilton (1986). El otro grupo de animales (n=5) no fue estimulado y se usó como control (Tabla 1).

Se administró guanetidina en ambos grupos (10 mg/kg i.v.) para suprimir las respuestas cardiovasculares mediadas simpáticamente, evitando así la expresión secundaria de c-Fos/FoxP2. Dos horas después de finalizar los experimentos se administró una nueva dosis de pentotal sódico (60 mg/kg), asegurando la ausencia de reflejos en el animal para realizar, a continuación, perfusiones vasculares transcárdiacas con una solución fijadora.

Tabla 1

Protocolo experimental de estimulación y anestesia en el estudio de la expresión de c-Fos/TH, FoxP2/TH y cFos/FoxP2.

Fases	Anestesia	Tiempo	T total
Dosis de ataque 60 mg/Kg		0	0
Canulación de vena	anest 0.3 ml dil.	45	45
Tras la canulación completa	anest 0.3 ml dil.	30	1,15
Antes de hacer craneotomía	anest 0.3 ml dil.	30	1,45
Antes de empezar protocolo	anest 0.3 ml dil.	30	2,15
60 min estimulando con el electrodo (pulsos de 1 ms, 30-50 μ A a 100 Hz durante 5 s, cada 60 s)	anest 0.3 ml dil.	30	
		30	
Fin, extracción electrodo	anest 0.3 ml dil.		3,15
90 minutos de reposo	anest 0.3 ml dil.	30	
	anest 0.3 ml dil.	30	
		30	4,45
Perfusión		60	5,45

4.6.1. Procesamiento del tejido

Fijación del tejido

Se practicó una toracotomía medio esternal para dejar visible el contenido de la caja torácica y realizar una perfusión vascular transcárdica. En un primer paso, se circularon 100 ml de una solución salina tamponada con fosfato (PBS 0.1M pH 7.3) y para el drenaje se practicó una incisión en la aurícula derecha. Transcurridos 5 minutos, se pasó una solución fijadora, P-formaldehído al 4% a 4° C. Finalmente, se extrajeron los cerebros y se sometieron a una postfijación adicional por inmersión en la misma solución fijadora durante 24 horas.

Crioprotección

Los cerebros se sometieron a un proceso de crioprotección para preservar la estructura del tejido. En concreto, se eliminó el agua del tejido mediante inmersión en sacarosa al 30% con azida sódica al 0.02% en PBS durante 72 horas. Finalmente, los cerebros fueron congelados en isopentano (Panreac) a -40° C y almacenados en el ultracongelador a -80° C hasta su uso.

Obtención de secciones

El bulbo raquídeo de cada rata se seccionó en cortes coronales de 30 μ m, utilizando un microtomo de congelación (CM 1325 Leica, Alemania). Los cortes se conservaron seriadamente en una solución Hoffman a -18°C en placas de 12 compartimentos. Cada fila de la placa fue asignada a un animal y cada primer corte se introdujo en el primer pocillo, el segundo corte en el segundo pocillo y así sucesivamente, hasta llegar el sexto pocillo de cada fila y empezar, de nuevo, por el primero. De esta manera, se obtuvieron aproximadamente 72 cortes representativos de todo el eje rostro-caudal del bulbo raquídeo.

4.6.2. Caracterización de la expresión a nivel bulbar de la proteína c-Fos por estimulación eléctrica de SGPdI. Doble marcaje c-Fos/TH

Para identificar la participación de grupos neuronales laringo-respiratorios localizados en el nA por la estimulación eléctrica de la SGPdI se consideró la expresión de la proteína c-Fos. Esta proteína nuclear es producto del gen c-fos y se expresa con la despolarización de la neurona. Y, aunque su nivel de expresión basal es bajo, se ha demostrado que esta proteína es un buen marcador de la actividad neuronal, al incrementar su expresión con la estimulación extracelular (Hanley et al., 1988; Sheng et al., 1990).

Las secciones obtenidas tanto de ratas controles como estimuladas se procesaron en idénticas condiciones para una inmunotinción de *free floating*. Se seleccionaron cortes cada 180 μm en un muestreo sistemático y aleatorio.

Para la inmunotinción de la proteína c-Fos, las secciones se lavaron en PBS 0.1M pH 7.3 en tres pasos de 10 minutos el primer lavado y 5 minutos los dos restantes. Después, se pretrataron durante 15 minutos en H_2O_2 al 3% (Merck) diluido en PBS para eliminar la actividad de la peroxidasa endógena. Tras una segunda ronda de tres lavados en PBS durante 5 minutos cada uno, las secciones se incubaron durante una noche a temperatura ambiente, utilizando un anticuerpo primario monoclonal anti-c-Fos de mouse (dilución 1:1000 en PBS conteniendo 0,3% Triton X-100 0,2% Azida 0,02%; Santa Cruz).

En el segundo día del procesado, se realizaron tres lavados sucesivos en PBS de 5 minutos cada uno, con la finalidad de eliminar el exceso de anticuerpo primario. Tras esto, se incubaron en un anticuerpo secundario biotinilado anti-IgG-mouse, hecho en especie de cabra y diluido en PBS 0,3% Triton X-100 (dilución 1:500; Vector Laboratories) durante 1 hora a temperatura ambiente y otros tres lavados en PBS de 5 minutos cada lavado. Para conseguir la inmunoreactividad, los cortes se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en Peroxidasa extravidina diluida en PBS-Tx (dilución 1:2000; Sigma-Aldrich). Finalmente, para el proceso del revelado se realizaron lavados en PBS en tres pasos de 5 minutos y se reveló con 3,3'-diaminobencidina (DAB; 25 mg en 100 ml de Tris-HCl, pH 7,4 y 0,002% de H_2O_2 ; Sigma-Aldrich) con la finalidad de conseguir una tinción nuclear oscura.

Tras el revelado, se realizó la inmunotinción de la enzima Tirosina Hidroxilasa (TH). Las secciones se incubaron a temperatura ambiente con un anticuerpo policlonal primario anti-TH (dilución 1:5000; anti-rabbit; Merck KGaA), seguido de una reincubación de 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti-IgG biotinilado (dilución 1:500; anti-rabbit, hecho en especie de cabra; Vector Laboratories). El procedimiento para esta segunda inmunotinción fue el mismo que para la inmunotinción de c-Fos, salvo que el revelado no incluyó intensificación con NiCl (Carlo ERBA Reagents), para la obtención de una tinción nuclear de color marrón.

Las secciones se lavaron en PBS en tres pasos de 5 minutos cada uno, se montaron en portas previamente gelatinizados y se estufaron durante 24 horas a 37°C. Finalmente, se deshidrataron en una graduación ascendente de alcoholes (50°, 70°, 96° y 100°), se aclararon con xileno (Panreac) y se cubrieron con un medio de montaje DPX (Sigma-Aldrich).

4.6.3. Caracterización de la expresión a nivel bulbar de la proteína FoxP2 por la estimulación eléctrica de la SGPdl. Doble marcaje FoxP2/TH

Para identificar la participación de grupos neuronales en el nA implicados en la vocalización por la estimulación eléctrica de la SGPdl, se consideró la expresión de la proteína FoxP2. Esta proteína es el resultado del gen *foxp2* y constituye un buen marcador de regiones cerebrales relacionadas con la sinaptogénesis y el desarrollo correcto de zonas funcionales del habla (Stanic et al., 2018).

Este doble marcaje se realizó en las mismas condiciones que el empleado para la inmunohistoquímica doble de c-Fos-TH del apartado anterior, pero utilizando un anticuerpo primario anti-FoxP2 (dilución 1:1000; hecho en especie de ovino; RD Systems) y un anticuerpo secundario biotinilado (dilución 1:500; anti-sheep, hecho en especie de conejo; Vector Laboratories).

4.6.4. Caracterización de la expresión a nivel bulbar de las proteínas cFos y FoxP2 por la estimulación eléctrica de la SGPdl. Doble marcaje inmunofluorescente cFos/FoxP2

Para estudiar la co-expresión de cFos y FoxP2 en el nA por la estimulación de la SGPdl se realizó una inmunofluorescencia doble. Al igual que con los estudios de inmunohistoquímica, las secciones obtenidas tanto de ratas controles como estimuladas se procesaron en idénticas condiciones para una inmunofluorescencia doble de *free floating*. Se seleccionaron cortes cada 180 µm en un muestreo sistemático y aleatorio.

Inicialmente las secciones se lavaron en una solución salina PBS 0.1M (pH 7.3) en tres pasos de 10 minutos el primer lavado y 5 minutos los dos restantes. Después, se pretrataron durante 15 minutos en H₂O₂ al 3% diluido en PBS para eliminar la actividad de la peroxidasa endógena. Tras una segunda ronda de tres lavados en PBS durante 5 minutos cada uno, las secciones se incubaron durante dos noches (36 horas) a temperatura ambiente, utilizando un anticuerpo primario monoclonal anti-c-Fos de mouse (dilución 1:250 en PBS conteniendo 0,3% Triton X-100 0,2% Azida 0,02%; Santa Cruz).

En el segundo día de inmunofluorescencia, se realizaron tres lavados sucesivos en PBS de 5 minutos cada uno, con la finalidad de eliminar el exceso de anticuerpo primario. Para la inmunoreactividad de cFos, los cortes se incubaron en un anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 conjugado con anti-IgG-mouse, hecho en especie de cabra, y diluido en PBS 0,3% Tritón X-100 (dilución 1:250; Vector Laboratories) durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad, seguido de tres lavados en PBS de 5 minutos. Después, se realizó la incubación de las secciones en un anticuerpo primario anti-FoxP2 (dilución 1:100 en PBS conteniendo 0,3% Triton X-100 0,2% Azida 0,02%; hecho en especie de ovino; RD Systems) durante dos noches (36 horas).

En el último día del procesado, se lavaron los tejidos tres veces en PBS y se incubaron durante 1 hora en un anticuerpo secundario biotinilado anti-sheep (dilución 1:100 en PBS conteniendo 0,3% Triton X-100 0,2% Azida 0,02%; hecho en especie de conejo; Vector Laboratories). Para conseguir la inmunoreactividad de la proteína FoxP2, los cortes se incubaron durante 2 horas en extravidina 594

conjugada, diluida en PBS-Tx (dilución 1:200; Life technology). Por último, los cortes se enjuagaron en PBS tres veces (5 minutos cada lavado), se incubaron en DAPI (Molecular Probes) durante 5 minutos y se montaron en portas previamente gelatinizados y se cubrieron con un medio de montaje específico para inmunofluorescencia (Dako).

4.6.5. Cuantificación del marcaje inmunohistoquímico

Análisis de datos de imágenes de inmunohistoquímica

Con una cámara digital acoplada a un microscopio óptico BX61VS (Olympus) y el software Olympus VS se obtuvieron imágenes de cada sección teñidas con los dobles marcajes cFos/TH y FoxP2/TH para su posterior cuantificación. Para la adquisición de dichas imágenes se aplicó el objetivo de 10x.

El nivel rostrocaudal de cada sección cerebral se determinó utilizando el atlas cerebral de rata de Paxinos y Watson (2007). Los cuerpos celulares que mostraban c-Fos-ir/FoxP2-ir, identificados por la presencia de núcleo oscuro, se cuantificaron bilateralmente en las secciones que contenían el nA en ratas estímulo y ratas control. El marcaje de núcleos se determinó utilizando el software de análisis de imágenes QuPath.

La cuantificación celular a lo largo de la nA se ejecutó de acuerdo con la categorización somatotópica en tres subdivisiones primarias (formación compacta, semicompacta y dispersa), tal y como fue delineada por Pascual-Font et al. (2011) y Hernández-Morato et al. (2013). Para ello, se emplearon las distancias de Bregma, según el Atlas de Paxinos y Watson (2007), junto con el marco somatotópico expuesto en los estudios mencionados para guiar la selección de cortes a través de diversas regiones del nA. En concreto, el criterio para delimitar las células dentro de la región compacta del nA abarcaba desde Bregma -12,00 mm hasta -12,84 mm; la región semicompacta se extendía desde Bregma -12,84 mm hasta -13,44 mm; y la región de formación dispersa abarcaba desde Bregma -13,44 mm hasta -14,16 mm.

4.6.6. Cuantificación del marcaje de inmunofluorescencia

Análisis de datos de imágenes de inmunohistoquímica

Para estudiar la co-expresión de las proteínas cFos y FoxP2 en nA, se cuantificaron bilateralmente las células inmunomarcadas con cFos positivas-TH negativas, FoxP2 positivas-TH negativas y cFos/FoxP2 positivas, tanto en ratas estímulos como ratas controles. Se captaron imágenes de las secciones con un microscopio Confocal de fluorescencia (Leica Stellaris 8). Para la adquisición de dichas imágenes se aplicó un objetivo de aceite de inmersión y un aumento de 63x. El marcaje de núcleos se determinó utilizando el software de análisis de imágenes Fiji imageJ. La cuantificación celular a lo largo de la nA se ejecutó de la misma manera que la llevada a cabo en los estudios de inmunohistoquímica.

4.7. REGISTRO DE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA NEURONAL

Para el registro neuronal se utilizan electrodos de tungsteno (impedancia D.C. 8-11 M Ω) fijados en un microposicionador con mando a distancia. Se sitúa en cero el contador digital del microposicionador con control visual (microscopio Leica) y con el cambio de frecuencia del audio, lo que nos indica que el microelectrodo está penetrando en la superficie del bulbo. Durante el desarrollo de los experimentos de este bloque, se grabaron las explicaciones a tiempo real y se digitalizaron y almacenaron las señales en cinta de vídeo VHS para su posterior análisis.

El electrodo de tierra (Ag/AgCl), se fijó en el tejido subcutáneo cercano a la calota craneal. La impedancia del microelectrodo era comprobada periódicamente una vez introducido en el tejido, mediante la medición de la corriente que atravesaba el microelectrodo. Para ello se aplicaba una señal de 1 KHz, y se regulaba la capacitancia del circuito, hasta obtener su neutralización, verificándose en el dial del micropotenciómetro el valor en ohmios equivalente a la impedancia del microelectrodo que debía mantenerse entre 8-11 M Ω .

El potencial unitario extracelular fue preamplificado y filtrado utilizando un amplificador diferencial, en el cual la señal se filtró a 3 KHz, 6 Db/Oct, amplificándola x10. Un osciloscopio de cuatro canales, doble haz, permitió la visualización simultánea y en tiempo real de los potenciales de campo extracelulares (PCE), la presión arterial y el flujo respiratorio. De esta forma, podía estimarse cualitativamente, la posible relación física entre ambos eventos y proceder a su estudio y almacenamiento.

Con la finalidad de limpiar, durante el registro, el material orgánico adherido a la punta del ME (lo cual hacía variar la impedancia de éste y, por tanto, su capacidad de discriminación), se inyectó corriente (500 Hz, 10 s, 0.005 mA durante 60 ms). Todos los equipos de medición, soportes metálicos y conducciones de líquidos estaban apantallados y conectados a una masa para evitar la presencia de diferencias de potenciales entre las diferentes tierras del aparataje y la presencia, por tanto, de ruido producto de corrientes parásitas.

La señal procedente del preamplificador es enviada a otra etapa amplificadora, con una ganancia de 10K (2%) y un filtrado de alta frecuencia a 3 KHz y de baja a 100 Hz, ambos con una atenuación de 3 Db.

La señal del registro amplificada fue enviada a un equipo amplificador de audio que permitió controlar de manera audible las descargas neuronales. Frecuentemente la discriminación auditiva en las fases de acercamiento a los grupos neuronales en descarga se adelantaba a la visualización del registro en el osciloscopio. Durante el registro se procuró no situar el microelectrodo tan cerca del soma como para obtener potenciales gigantes extracelulares, ya que la irritación de la membrana puede originar dobletes o tripletes de potenciales de acción en descargas rápidas, y esto puede llevar a conclusiones erróneas.

Para comprobar que la actividad unitaria de la neurona objeto de estudio del nA pertenecía a una proyección desde el SGPdl, era necesario evaluar la modulación de la actividad neuronal desde la SGPdl. Para realizar esta activación desde la SGPdl se dispuso un generador de corrientes de onda cuadrada (1 Hz con 1 ms de duración) activando un sistema de corriente constante unido a los electrodos de estimulación (amplitud 0.05-0.5 mA). Periódicamente se comprobó la impedancia de estos electrodos, interponiendo una resistencia en serie de valor bajo (1 Kohm) y midiendo la caída de potencial con un amplificador de alta impedancia unido a tierra con una resistencia de alto valor. También se vigiló la aparición de corrientes de polarización monitorizando la corriente que atravesaba el circuito de estimulación.

Se valoró en una primera fase el periodo de latencia, tiempo que transcurre entre el estímulo y la aparición del potencial de acción extracelular. Este dato se midió automáticamente utilizando los dispositivos que posee el osciloscopio ya reseñado (almacenamiento digital y discriminación de ventana).

Cuando se registraba un potencial de acción extracelular (PAE), se analizaron tres aspectos diferentes:

A. Potencial extracelular axónico o somático: en base a su diferente forma, estabilidad y duración. El PAE somático es 50-100 veces mayor que el

hallado en axón, los PAE del axón aparecen y desaparecen repentinamente conforme se introduce el electrodo en el tejido (Bianchi, 1974). Por otra parte, el PAE del axón es trifásico y no posee la inflexión entre segmento inicial-somatodendrítico (SI-SD). Además, si se aumenta la frecuencia de estimulación (> 200 Hz), desaparece la porción SD del PAE. Por último, la duración del PAE somático es mayor que en el axón, debido a una mayor capacitancia de la membrana del SD.

B. Determinar si los PA obtenidos son producto de estimulación antidrómica (EA) y no ortodrómica. Para ello se aplicaron los siguientes criterios (Lorente de No, 1947):

- i. La “rotura” del complejo SI-SD es más frecuente en el caso de EA, esta rotura se observa mejor a medida que se eleva artificialmente el rango de frecuencias de estimulación.
- ii. El PAE ortodrómico (OD) es de mayor amplitud y de duración más corta que los AD.
- iii. En registros OD cercanos al soma, a veces también se detecta una onda pre-potencial positiva, expresión de las sinapsis excitatorias en descarga simultánea, sobre las dendritas.

C. Identificación antidrómica (IA) aplicando los siguientes criterios:

- i. *Latencia constante:* el tiempo que transcurre entre la estimulación y la captación del potencial antidrómico (PA), debe ser constante. Esta afirmación se basa en que, si se obtienen latencias antidrómicas (< 100 μ s.), no hay duda de que la neurona está directamente conectada al axón estimulado (ya que el retardo sináptico está estimado entre 0.5-1.0 ms.). Para evitar la inestabilidad que pudiera derivarse del tráfico axónico, se procedió a aplicar estímulos dobles, a un intervalo fijo.
- ii. *Respuesta en frecuencia:* el límite para seguir conduciendo estímulos a altas frecuencias depende del periodo refractario axónico (se estima que está entre 0.5-2.0 ms. para el SNC). La

determinación empírica en cada caso concreto se realiza estimulando en pares de impulsos hasta hallar el umbral. Con estímulos triples o cuádruples supraumbrales, se pueden predecir cuáles serán los que logren transmitirse. En las respuestas transinápticas no se encuentran respuestas múltiples a altas frecuencias y, además, en la primera respuesta suele encontrarse una evidente variabilidad (Lorente de No, 1947).

- iii. *Prueba de colisión:* esta prueba se basa en la imposibilidad de transmisión del PAA cuando se encuentra con el periodo refractario que provoca el PA ortodrómico de la descarga “natural”. El intervalo de tiempo mínimo entre los impulsos ortodrómico y antidrómico durante el cual no ocurre la “colisión” se determina por la fórmula: $t = 2T + PR$. Donde (t) es el intervalo mínimo, (T) el tiempo de conducción desde el lugar de estimulación al soma y (PR) el periodo refractario del axón. El tiempo empleado desde la EA hasta su registro en determinada zona del axón o soma, no es igual al tiempo de conducción. Ya que en la EA se emplea un tiempo adicional en descargar la capacitancia de la membrana axónica llamado “u” y que se considera con un valor aproximado de 0.2 ms. (Bement y Ranck, 1969).

En cuanto a los criterios que se han seguido para el reconocimiento de la naturaleza unitaria del registro neuronal, hay que tener en cuenta que hay que lograr registros de PAE lo más cerca posible del soma (evitando dobletes por roce con el soma). De esta manera, las espigas obtenidas son de mayor amplitud que las recogidas de otras unidades cercanas. Esta diferencia es la empleada en primera instancia para medir la frecuencia de los PAE. El discriminador de ventana permite esta diferenciación en base a la amplitud y polaridad. Además, mediante un generador de impulsos de onda cuadrada los potenciales de acción extracelular son traducidos como impulsos TTL.

Para establecer con seguridad que todos los PAE son convertidos a TTL, se presentaron éstos generados en un segundo canal del osciloscopio. Y, mediante la memoria, se puede revisar paso a paso la sincronía de los PAEs con

toda una correspondiente serie de TTL, deteniendo la imagen.

Para realizar la prueba de “colisión” el generador de pulsos se gobierna desde el generador de rampa, de forma que éste estimula antitrómicamente en cada PAE detectado. La desaparición a latencias variables del PAE confirmaba la prueba de colisión.

Una vez establecidas las características generales de la neurona, se realizan histogramas periestímulos para poder corroborar una modulación cardiovascular o respiratoria de la actividad neuronal.

4.8. PROTOCOLO NEUROFUNCIONAL

4.8.1. Registro de la actividad eléctrica neuronal del nA durante la estimulación eléctrica de la SGPdl

En 5 animales se realizó el registro de la actividad unitaria neuronal extracelular. El microelectrodo de estimulación (SNE 100, RODHES Medical Electrodes) se situó estereotáxicamente en la sGPdl (4,0 mm caudal al bregma, 0,6 lateral a la línea media y 4,5 a 5 mm de profundidad desde la superficie de la calota; aproximándose con un ángulo de 30°) (Paxinos y Watson, 2007).

Para el registro neuronal se han utilizado electrodos de tungsteno que se situaron estereotáxicamente en la región del nA, concretamente en la formación dispersa, teniendo el obex como referencia (0,24 a 0,84 mm anterior al obex, 2 mm lateral a la línea media y profundidad de 2 a 2,5 mm desde la superficie) (Paxinos y Watson, 2007).

Para comprobar la correcta ubicación del microelectrodo, se estimuló eléctricamente la SGPdl (30-40 μ A, 100 Hz, pulsos de 1 ms, durante 5 s) y se analizaron los cambios cardiorrespiratorios que se producían en el animal. Una vez comprobada la localización funcional de la SGPdl, se procedió a estimular la zona (1 Hz, pulsos de 0.1 ms, 50-100 μ A) para estudios orto y antidrómicos y para estudios de análisis peri-post estímulo para evaluación de la modulación de la actividad neuronal unitaria desde la SGPdl.

Se aisló el nervio vago derecho a nivel cervical. Se estimuló el extremo proximal utilizando un par de electrodos de alambre de acero inoxidable recubiertos de teflón. El teflón se retiró aproximadamente a 2 mm del extremo y los cables se enrollaron alrededor del nervio para formar un manguito. El protocolo de estimulación vagal consistió en una frecuencia de estímulo de 7 Hz, una intensidad de 1 V y un ancho de pulso de 1,0 ms (Subramanian et al., 2018)

Se estudiaron electrofisiológicamente las características de la actividad unitaria de neuronas del nA durante su descarga espontánea y durante la estimulación de la SGPdl. Se examinaron los protocolos de identificación

antidrómica y ortodrómica, de latencia constante, la respuesta en frecuencia y la prueba de colisión. Se realizaron también histogramas periestímulos para corroborar la presencia de excitaciones e inhibiciones o la posible modulación cardiorrespiratoria de dichas neuronas.

Para certificar que las neuronas registradas se localizaban en el nA se siguió el siguiente protocolo: inmediatamente después de finalizar el experimento se hace pasar por el electrodo de registro una corriente de 250 μ A durante 20 s para microcoagular el tejido y facilitar su posterior localización por técnicas histológicas. Usando de referencia el punto estereotáxico de microcoagulación podemos deducir el resto de los puntos de registro que se realizaron en cada experimento. Todos los registros incluidos en el estudio se encontraban dentro del nA.

4.8.2. Interacción de DIPAG y nA. Caracterización de la respuesta de presión subglótica evocada por la estimulación eléctrica y química de la SGPdl.

En 21 animales, se analizaron los parámetros laríngeos y cardiorrespiratorios, tanto en condiciones de reposo como durante la estimulación eléctrica o química de la SGPdl. Antes de la estimulación, se establecieron los valores de referencia para la presión arterial media, la frecuencia cardíaca, la presión subglótica y los parámetros respiratorios. La evaluación de los cambios en la presión arterial media y la frecuencia cardíaca se realizó a través del registro del incremento máximo observado en estos parámetros durante los 5 segundos de estimulación eléctrica de la SGPdl. Asimismo, los cambios en los parámetros cardiorrespiratorios inducidos por los estímulos se cuantificaron considerando la media de la respuesta obtenida durante los 5 segundos de estimulación eléctrica de la SGPdl, o la respuesta cardiorrespiratoria máxima registrada en los experimentos con estimulación química.

Caracterización de la respuesta de presión subglótica evocada por la estimulación eléctrica de la SGPdl.

En 7 animales se realizó una craneotomía para acceder a la SGPdl del lado derecho siguiendo las coordenadas -4,0 mm caudal al bregma, 0,6 lateral a la línea

media y 4,5 a 5 mm de profundidad desde la superficie de la calota (aproximándose con un ángulo de 30°) (Paxinos y Watson, 2007). Se estimuló la zona con pulsos de 1 ms, 30-50 μ A administrados a 100 Hz durante 5 s mediante la colocación de un electrodo bipolar concéntrico. Al final de cada experimento se hace pasar una corriente eléctrica de 250 μ A CC durante 20 segundos para localizar la zona de estudio en el posterior estudio histológico.

Caracterización de la respuesta de presión subglótica evocada por la estimulación química de la SGPdl.

En 14 animales se realizó una craneotomía para acceder a la SGPdl siguiendo las coordenadas -4,0 mm caudal al bregma, 0,6 lateral a la línea media y 4,5 a 5 mm de profundidad desde la superficie de la calota (aproximándose con un ángulo de 30°). A través de una microjeringa Hamilton, se realizaron microinyecciones de PBS (50nL, pH 7,4 \pm 0,1, 5s de duración) en 7 animales y microinyecciones de glutamato (0,25M, 50nL, 5s de duración) en los otros 7 animales del grupo experimental. Tanto el PBS como el glutamato se disolvieron en azul de Evans para localizar los puntos de microinyección en el posterior estudio histológico. Se programaron volúmenes de microinyección de 50 nL con un controlador de microbomba accionando microjeringas de 1 μ l acopladas. Se administró una única microinyección en cada animal.

4.9. PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO

Al final de los experimentos del bloque neurofuncional se administró pentobarbital sódico (4 mg/kg I.V.) a los animales para inducir anestesia profunda. A continuación, se extrajo el encéfalo y la zona del tronco del encéfalo y se introdujo en una solución de formol al 5% (50 ml). Posteriormente, se realizaron secciones del tejido a 80 μm con microtomo de congelación. Los cortes fueron teñidos con rojo neutro.

Las lesiones eléctricas producidas por el electrodo de estimulación y la microinyección con Azul de Evans, utilizada en la estimulación química, nos permitió marcar en los cortes si la posición de la SGPdl era correcta.

4.10. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

El cálculo de los resultados obtenidos y su procesamiento estadístico se han adaptado a las características de las distintas variables, siempre teniendo en cuenta el posible error por la distinta reactividad de los animales en cada uno de los grupos experimentales realizados.

En el caso del de los experimentos de medición de presión subglótica y cómo influía en ésta la **estimulación eléctrica o química** de la SGPdl. Las variables registradas han sido: tiempo inspiratorio, tiempo espiratorio, frecuencia respiratoria instantánea, presión subglótica, presión arterial y frecuencia cardiaca instantánea. En el caso de la estimulación eléctrica, las medidas han sido tomadas 5 segundos antes de la estimulación, durante la estimulación y 20 segundos después de la estimulación. En el caso de la estimulación química, las medidas fueron tomadas 5 segundos antes de estimular, en el punto de máximo cambio tras la estimulación y 10 minutos después de a estimulación, cuando el animal volvía a la normalidad. Sólo se han valorado los datos obtenidos en las experiencias en las que el estudio histológico demostró que las distintas estimulaciones y microinyecciones fueron realizadas en la SGPdl. En los experimentos de **registro unitario extracelular**, se añadió la variable de actividad neuronal. La actividad neuronal se amplificó, registró y reprodujo tanto en un osciloscopio analógico como en un osciloscopio de almacenamiento digital) para garantizar que la unidad objeto de estudio se discriminara de forma inequívoca durante todo el experimento. Se evaluó (LabChartPro software) de manera continua la configuración, forma y altura de los potenciales de acción registrados. Una vez identificada una neurona a partir de su actividad de fondo, se optimizó el tamaño de la espiga. Se midió la frecuencia de disparo de la unidad celular (picos/s) durante aproximadamente 10 respiraciones, tanto en el periodo de reposo (control) como en el de estimulación (SGPdl/Vago). Este estudio solo incluye neuronas cuya configuración de picos permaneció constante y pudo discriminarse claramente de la actividad de fondo durante todo el experimento.

El número total de animales utilizados para cada uno de los bloques experimentales ha sido el adecuado para obtener unos datos homogéneos. Se ha

utilizado el programa estadístico SPSS de IBM para el cálculo estadístico. Las variables continuas se expresan como media \pm SEM. Para las comparaciones estadísticas, una vez verificada la normalidad estadística (prueba de Kolmogorov-Smirnov) y la homocedasticidad (prueba de Bartlett) de los datos, se aplicó una prueba de muestras pareadas para comparar el control con el periodo de respuesta evocada para cada animal. Se utilizó el ANOVA de una vía para comparar los distintos grupos de animales. En cada punto temporal, un valor de $p < 0.05$ se considerará estadísticamente significativo. Sólo se utilizaron para los procedimientos estadísticos los datos de los animales en los que la histología mostraba que los microelectrodos estaban situados dentro del SGPdl.



RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. INTERACCIÓN DE LA SGPdI Y EL nA: EXPERIMENTOS c- Fos/FoxP2/TH-ir

Para caracterizar las posibles interacciones anatomofuncionales entre la SGPdI y las motoneuronas laríngeas del nA en rata, hemos analizado el patrón de inmunoreactividad de la doble tinción de las proteínas c-Fos, FoxP2 (c-Fos-ir, FoxP2-ir) y Tirosina Hidroxilasa (TH-ir), en toda la extensión rostro-caudal de la región nA durante la estimulación eléctrica de la SGPdI (n= 10). Para ello, hemos tomado como referencia la división del nA en tres dominios principales: la formación compacta, semicompacta y dispersa. Hemos tenido en cuenta que las motoneuronas laríngeas se encuentran en la parte caudal del nA (formación semicompacta y dispersa). Además, una vez comprobada cuáles eran las zonas donde se producía un aumento significativo de la expresión de c-Fos-ir, se estudió la co-expresión de las proteínas cFos y FoxP2 en dichas zonas, cuantificando bilateralmente las células inmunomarcadas cFos-ir positivas-TH negativas, FoxP2-ir positivas-TH negativas y cFos-ir/FoxP2-ir positivas, tanto en ratas estimuladas como en ratas controles.

5.1.1. Distribución de FoxP2-ir

Animales control. Protocolo sin estimulación de la SGPdI.

En animales sometidos a cirugía (n=5), pero que no fueron estimulados eléctricamente (sólo se introdujo el electrodo en la posición del área de estudio) no se observaron diferencias significativas entre las células FoxP2-ir localizadas dentro de los tres dominios principales del nA, comparando la zona ipsilateral y contralateral al posicionamiento del electrodo. Concretamente, los datos de las tres regiones fueron: **Región dispersa** ipsilateral (115 ± 18.9) vs contralateral (93.4 ± 14.8) con un delta entre ambos datos de 21.6 ± 8.1 , siendo no significativo. **Región semicompacta** ipsilateral (105 ± 34.8) vs contralateral (75.3 ± 26.6) con un delta entre ambos datos de 29.8 ± 12.6 , siendo no

significativo. **Región compacta** ipsilateral (10.8 ± 2.3) vs contralateral (4.5 ± 0.9) con un delta entre ambos datos de 6.3 ± 1.8 , siendo no significativo (Tabla 2).

Animales sometidos a estimulación eléctrica de la SGPdl

En los animales estimulados eléctricamente (n=5), tanto la formación dispersa ($p < 0,05$) como la semicompacta ($p < 0,05$) presentaron un aumento significativo del marcaje FoxP2-ir en el lado ipsilateral en comparación con el lado contralateral. Concretamente, los datos de las tres regiones fueron: **Región dispersa** ipsilateral (115.4 ± 15.5) vs contralateral (88.8 ± 17.6) con un delta entre ambos datos de 26.6 ± 2.1 , siendo significativo ($p < 0,05$). **Región semicompacta** ipsilateral (104.5 ± 26.2) vs contralateral (81.5 ± 24.0) con un delta entre ambos datos de 23 ± 5.4 , siendo significativo ($p < 0,05$). **Región compacta** ipsilateral (10 ± 4.7) vs contralateral (6.5 ± 3.7) con un delta entre ambos datos de 3.5 ± 1.2 , siendo no significativo (Tabla 2, Figura 10).

Animales control vs Animales sometidos a estimulación eléctrica de la SGPdl

Al comparar la amplitud de las diferencias (delta) entre el número y la distribución de las neuronas FoxP2-ir ipsilaterales o contralaterales dentro de todos los dominios del nA no se encontraron diferencias entre el grupo control y el grupo de animales estimulados eléctricamente.

5.1.2. Distribución de c-Fos-ir

Animales control. Protocolo sin estimulación de la SGPdl

En animales sometidos a cirugía (n=5) pero que no fueron estimulados eléctricamente, se observó una mayor cantidad de expresión de c-Fos-ir en la formación dispersa y semicompacta en el lado ipsilateral en comparación con el lado contralateral ($p < 0,01$). Concretamente, los datos de las tres regiones fueron: **región dispersa** ipsilateral (29.6 ± 5.1) vs contralateral (18.2 ± 2.7) con un delta entre ambos datos de 11.4 ± 2.4 , siendo significativo ($p < 0,01$). **Región semicompacta** ipsilateral (23.6 ± 3.8) vs contralateral (14.6 ± 3.3) con un delta entre ambos datos de 29.8 ± 12.6 , siendo significativo ($p < 0,01$). **Región**

compacta ipsilateral (1.6 ± 0.2) vs contralateral (1.4 ± 0.2) con un delta entre ambos datos de 0.2 ± 0.2 , siendo no significativo (Tabla 2).

Animales sometidos a estimulación eléctrica de la SGPdl

En los animales estimulados eléctricamente ($n=5$) se observó un predominio ipsilateral para el marcaje de c-Fos-ir en todos los dominios: formación dispersa ($p<0,001$), semicompacta ($p<0,001$) y compacta ($p<0,05$). Concretamente, los datos de las tres regiones fueron: **región dispersa** ipsilateral (42.8 ± 5.8) vs contralateral (22.6 ± 4.9) con un delta entre ambos datos de 20.2 ± 2.4 , siendo significativo ($p<0,001$). **Región semicompacta** ipsilateral (31 ± 3.3) vs contralateral (16.8 ± 2.4) con un delta entre ambos datos de 14.2 ± 1.8 , siendo significativo ($p<0,001$). **Región compacta** ipsilateral (3.4 ± 0.8) vs contralateral (0.4 ± 0.4) con un delta entre ambos datos de 3 ± 0.8 , siendo significativo ($p<0,05$) (Tabla 2, Figura 10).

Animales control vs Animales sometidos a estimulación eléctrica de la SGPdl

Al comparar la amplitud de las diferencias (delta) entre el grupo control y el grupo de animales estimulados eléctricamente se observó un aumento significativo del marcaje de c-Fos-ir en la formación dispersa ($p=0,032$) y compacta ($p=0,002$)

5.1.3. Co-expresión de las proteínas c-Fos y FoxP2

Se analizó la co-expresión de c-Fos-ir/FoxP2-ir en la región dispersa del nA, ya que fue la única región que contenía motoneuronas laríngeas donde la estimulación eléctrica produjo un aumento significativo de la expresión de c-Fos-ir.

Animales control. Protocolo sin estimulación de la SGPdl

En animales sometidos a cirugía ($n=5$) pero que no fueron estimulados eléctricamente presentaron una expresión de FoxP2 ipsilateral de $119,5 \pm 14.8$ células FoxP2-ir positivas vs contralateral de $101,3 \pm 11,3$ células, con un delta entre ambos datos de 18.2 ± 6.5 , siendo no significativo. De estas células que

presentaban marcaje positivo para FoxP2, $31,3 \pm 4,6$ células presentaban co-expresión de c-Fos-ir en la zona ipsilateral, representando un 26,2% del total de células FoxP2 positivas; mientras que en el lado contralateral la co-expresión FoxP2/c-FOS fue de $21,6 \pm 5,3$, representando un 21,3% del total de células FoxP2 positivas. Tanto en el lado ipsilateral ($6,4 \pm 3,2$ células) como en el lado contralateral ($3,3 \pm 1,2$ células) había células que expresaban c-Fos pero no co-expresaban FoxP2 (Tabla 2, Figura 11).

Animales sometidos a estimulación eléctrica de la SGPdl

En los animales (n=5) estimulados eléctricamente se observó una expresión de FoxP2 ipsilateral de $117,3 \pm 11,4$ células FoxP2-ir positivas vs contralateral de $92,3 \pm 15,6$ células, con un delta entre ambos datos de $25 \pm 4,2$, siendo no significativo. De estas células que presentaban marcaje positivo para FoxP2, $43,3 \pm 3,3$ células presentaban co-expresión de c-Fos-ir en la zona ipsilateral, representando un 34,35% del total de células FoxP2 positivas; mientras que en el lado contralateral la co-expresión FoxP2/c-FOS fue de $23,7 \pm 6,3$ células, representando un 25,7% del total de células FoxP2 positivas. Tanto en el lado ipsilateral ($7,4 \pm 4,1$ células) como en el lado contralateral ($4,1 \pm 1,2$ células) había células que expresaban c-Fos pero no co-expresaban FoxP2 (Tabla 2, Figura 11).

Animales control vs Animales sometidos a estimulación eléctrica de la SGPdl

Al comparar la amplitud de las diferencias (delta) entre los grupos control y estimulados respecto de la co-expresión entre regiones ipsilaterales y contralaterales, se observan diferencias significativas ($p < 0,001$) entre ambos grupos.

Tabla 2

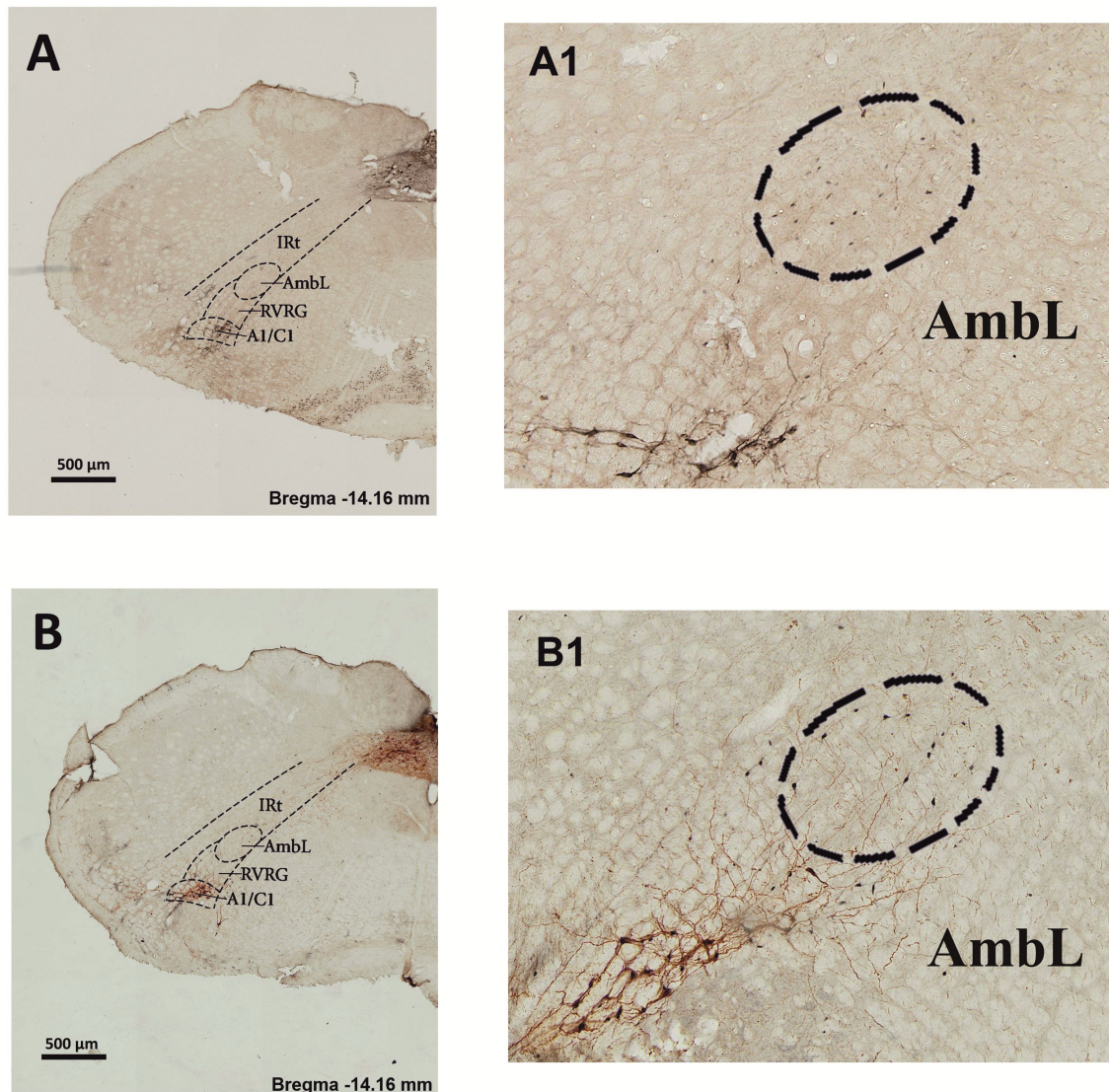
Cuantificación relativa y distribución de neuronas que presentaban inmunoreactividad a c-Fos y FoxP2 (cFos-ir y FoxP2-ir) en el nA.

ESTUDIO NEUROMORFOLÓGICO					
		CONTROL (n=5)		ESTIMULADOS (n=5)	
		Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral
FORMACIÓN DISPERSA	c-Fos-ir	29.6 ± 5.1**	18.2 ± 2.7	42.8 ± 5.8***	22.6 ± 4.9
	FoxP2-ir	115 ± 18.9	93.4 ± 14.8	115.4 ± 15.5*	88.8 ± 17.6
	Delta c-Fos-ir	11.4 ± 2.4		20.2 ± 2.4†	
	Delta FoxP2-ir	21.6 ± 8.1		26.6 ± 2.1	
FORMACIÓN SEMICOMPACTA	c-Fos-ir	23.6 ± 3.8**	14.6 ± 3.3	31 ± 3.3***	16.8 ± 2.4
	FoxP2-ir	105 ± 34.8	75.3 ± 26.6	104.5 ± 26.2*	81.5 ± 24.0
	Delta c-Fos-ir	9 ± 1.7		14.2 ± 1.8	
	Delta FoxP2-ir	29.8 ± 12.6		23 ± 5.4	
FORMACIÓN COMPACTA	c-Fos-ir	1.6 ± 0.2	1.4 ± 0.2	3.4 ± 0.8*	0.4 ± 0.4
	FoxP2-ir	10.8 ± 2.3	4.5 ± 0.9	10 ± 4.7	6.5 ± 3.7
	Delta c-Fos-ir	0.2 ± 0.2		3 ± 0.8†	
	Delta FoxP2-ir	6.3 ± 1.8		3.5 ± 1.2	
FORMACIÓN DISPERSA	Co-Expresión c-Fox/FoxP2	26,2%	21,3%	36,9%***	25,7%
	Delta	4,9		11,2††	

Se muestran los 3 dominios o formaciones clásicas del nA: formación dispersa, semicompacta y compacta, comparando los datos obtenidos en el lado ipsilateral y contralateral, tanto en el grupo de animales estimulados eléctricamente como en el grupo control. Los datos se expresan como media ± SEM. Los asteriscos muestran las diferencias entre el lado ipsilateral y contralateral en el grupo control o los animales estimulados eléctricamente. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Las cruces muestran diferencias en las deltas entre el grupo control y el grupo de animales estimulados († p<0,05).

Figura 10

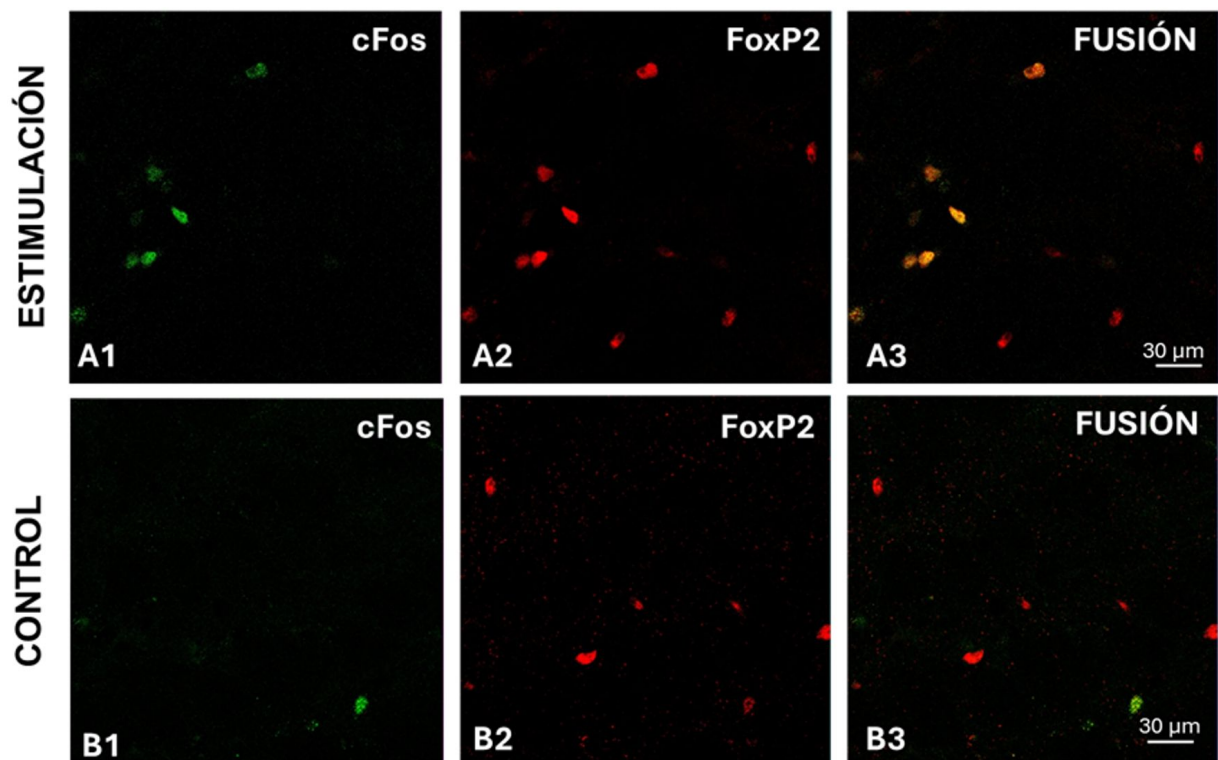
Microfotografías de secciones coronales de la médula oblonga



Nota: Fotomicrografías dentro de la región dispersa del nA (Bregma -13.60 mm/-14.08 mm), mostrando c-Fos/TH-ir (A y A1) y FoxP2-ir (B y B1). (A1) células c-Fos-ir del lado ipsilateral; (B1) células FoxP2-ir del lado ipsilateral. Abreviaturas: A1/C1, grupo celular adrenérgico/noradrenérgico; RVRG, grupo respiratorio ventral parte rostral; AmbL, región dispersa del nA.

Figura 11

Inmunofluorescencia doble de células del nA a 63x de aumento.



Nota: tinción nuclear doble con proteínas cFos y FoxP2 del lado ipsilateral: (A1) cFos-ir en rata estimulada; (A2) FoxP2-ir en rata estimulada; (A3) cFos/FoxP2-ir en rata estimulada; (B1); cFos-ir en rata control; (B2) FoxP2-ir en rata control; (B3) cFos/FoxP2-ir en rata control.

5.2. INTERACCIÓN DE LA SGPdI Y EL nA: EXPERIMENTOS DE REGISTRO NEURONAL

Se realizó registro neuronal unitario extracelular en 5 ratas adultas en la región del nA y su proximidad. Se tuvo en cuenta los resultados de inmunohistoquímica para realizar un barrido por las distintas regiones que lo componen y que mostraban un mayor marcaje de c-Fos, intentando caracterizar el mayor número de neuronas dentro de cada una de estas zonas. El registro abarcó un área comprendida desde +1,25 mm anterior a Obex (-13,15 mm posterior a Bregma), hasta -0,5 mm posterior a Obex (-14,90 mm posterior a bregma) en sentido rostro caudal, y desde 1,5 mm hasta 2,5 mm lateral a la línea media (Tabla 3).

Se registró la actividad eléctrica unitaria de 160 neuronas, de las cuales 157 fueron localizadas en las diferentes subregiones del nA y en regiones próximas (GRVr, C1/A1). Todas ellas fueron caracterizadas por el estudio histológico. Las neuronas registradas presentaban un patrón de actividad espontáneo, salvo 1 neurona que era silente y que se activó por estimulación de la SGPdI. Se han agrupado las neuronas según su actividad y localización en 6 grupos diferentes: neuronas inspiratorias crecientes, neuronas inspiratorias decrecientes, neuronas espiratorias E1, neuronas espiratorias E2, neuronas cardiovasculares y neuronas sin modulación cardiorrespiratoria. Dentro de cada grupo neuronal se han analizado distintos aspectos: la profundidad y posición media del grupo, la frecuencia de descarga en reposo, la frecuencia de descarga tras la estimulación de la SGPdI a 1Hz, la frecuencia de descarga tras la estimulación del nervio vago (1 Hz), los aumentos o disminuciones en el patrón de descarga y, por último, las inhibiciones y activaciones. A continuación, se muestran los resultados para cada grupo neuronal.

A. Neuronas inspiratorias decrecientes

Se registraron 21 neuronas inspiratorias (13,1%) con una profundidad media de $2226,67 \pm 115,8$ micras y una posición anteroposterior de $+0,58 \pm 0,087$ mm anterior a obex y $1,83 \pm 0,051$ mm lateral a la línea media. Su

localización histológica se corresponde con el nA, concretamente con la formación dispersa (Figura 12 y 13). Su frecuencia de descarga en reposo fue de $46,4 \pm 9,91$ Hz, mientras que su frecuencia de descarga ante la estimulación de la SGPdl (1 Hz) fue de $46,38 \pm 10,08$, y frente a la estimulación del vago (1 Hz) fue de $46,79 \pm 12,64$. No existen diferencias significativas al comparar los cambios de frecuencia ante las distintas estimulaciones (Tabla 3).

Por otro lado, en 8 neuronas (38%) se observa un aumento de la frecuencia de descarga ante la estimulación de la SGPdl (entre 2 y 21 Hz de aumento), en otras 8 neuronas (38%) una disminución de la frecuencia de descarga ante la estimulación de la SGPdl (entre 2 y 19 Hz) y en 5 neuronas no se observan cambios. Frente a la estimulación del vago, 6 neuronas disminuyen su frecuencia de descarga, 4 aumentan su frecuencia de descarga y 11 no la modifican. Los cambios a la estimulación de la SGPdl, en un 70% de los casos, son antagónicos a los cambios obtenidos por estimulación del vago.

Con respecto a la frecuencia de descarga espontánea, 4 de las neuronas presentaban una frecuencia de descarga espontánea menor de 10 Hz (20%); 4 entre 10 y 20 Hz (20%); 7 entre 20 y 50 Hz (33%); 3 entre 50 y 100 Hz (14%) y 3 por encima de 100 Hz (14%).

Una de ellas presenta inhibición los primeros 40 ms tras la estimulación del SGPdl.

B. Neuronas inspiratorias crecientes

Se registraron 15 neuronas inspiratorias decrecientes (9,4%) que presentaron una profundidad media de $2609,80 \pm 132,04$ μ m y una posición anteroposterior de $+0,78 \pm 0,091$ mm anterior a Obex y $2,05 \pm 0,033$ mm lateral a la línea media. Su localización histológica se corresponde con el GRVr (Figura 12). Su frecuencia de descarga en reposo fue de $34,25 \pm 9,59$ Hz. Su frecuencia de descarga ante la estimulación de la SGPdl fue de $33,70 \pm 8,89$, y frente a la estimulación del vago fue de $46,79 \pm 12,64$. No existen diferencias significativas al comparar los cambios de frecuencia ante las distintas estimulaciones (Tabla 3).

Por otro lado, en 4 neuronas se observa un aumento de la frecuencia de descarga ante la estimulación de la SGPdl (entre 2 y 7 Hz de aumento) (27%), en 3 neuronas se observa una disminución de la frecuencia de descarga ante la estimulación de la SGPdl (entre 3 y 13 Hz) (20%) y en 8 neuronas no se observan cambios. Frente a la estimulación del nervio vago, 3 neuronas disminuyen su frecuencia de descarga, 3 neuronas aumentan su frecuencia y 9 neuronas no la modifican. En un 100% de los casos, los cambios ante la estimulación son concordantes con los cambios obtenidos por estimulación del vago.

Con respecto a la frecuencia de descarga espontánea, en 5 de esas neuronas es menor de 10 Hz (33%); en otras 5 neuronas se encuentra entre 10 y 20 Hz (33%); en 3 neuronas se encuentra entre 20 y 50 Hz (20%) y, en otras 2 neuronas la frecuencia de descarga espontánea se encuentra entre 50 y 100 Hz (13%).

Una de ellas presenta inhibición los primeros 100 ms tras la estimulación del SGPdl.

C. Neuronas espiratorias E1

Se registraron 15 neuronas espiratorias E1 (9,4%) que presentaron una profundidad media de $2475,33 \pm 91,75 \mu\text{m}$ y una posición anteroposterior de $+0,24 \pm 0,089 \text{ mm}$ anterior a obex y $1,85 \pm 0,036 \text{ mm}$ lateral a la línea media. Su localización histológica se corresponde con la formación dispersa del nA (Figura 12). Su frecuencia media de descarga en reposo fue de $16,90 \pm 4,02 \text{ Hz}$. Su frecuencia media de descarga ante la estimulación de la SGPdl fue de $16,98 \pm 3,84$, y frente a la estimulación del vago fue de $15,37 \pm 4,19$. No existen diferencias significativas cuando comparamos los cambios de frecuencia ante las distintas estimulaciones (Tabla 3).

Por otro lado, en 2 neuronas se observa un aumento de la frecuencia de descarga ante la estimulación de la SGPdl (entre 2 y 6 Hz de aumento) (13%), en 2 una disminución de la frecuencia de descarga ante la estimulación de la SGPdl (entre 2 y 5 Hz) (13%) y en 11 no se observan cambios. Frente a la estimulación del vago, 2 neuronas disminuyen su frecuencia de descarga, 4

aumentan su frecuencia y 9 no la modifican. En el 100% de los casos, los cambios a la estimulación de la SGPdl son concordantes con los cambios obtenidos por estimulación del vago.

Con respecto a la frecuencia de descarga espontánea, en 8 neuronas es menor de 10 Hz (53%), 2 neuronas presentan una frecuencia de descarga espontánea entre 10 y 20 Hz (13%) y 5 neuronas entre 20 y 50 Hz (33%).

Este grupo neuronal se encuentra especialmente afectado por la estimulación de la SGPdl (1 Hz). 6 neuronas presentan una inhibición postestímulo con una duración media de $61,8 \pm 10,6$ ms (Figura 14). En 5 de los casos, la inhibición comienza inmediatamente después del estímulo de la SGPdl y en 1 de los casos, la inhibición comienza a los 20 ms.

En un caso se observó una activación a los 5,6 ms. Cuando se utilizaron dos factores de corrección, el primero dependiendo de la posición aproximada del electrodo de estimulación en el SGPdl y el segundo dependiendo también del tamaño del animal y de la posición del electrodo de registro en el nA. Se calculó una distancia aproximada entre ambas zonas de estudio de 6,6 – 7,7 mm por lo que se pudo calcular una velocidad de conducción del axón activado entre 1.18 y 1.37 m/s.

En 3 casos se observa una excitación. En dos de ellos aparece entre los 15 y 75 ms y en otro entre los 60 y 90 ms. Se pudo calcular una velocidad de conducción entre 0,11 y 0,13 m/s, lo que podría ser indicativo de una respuesta polisináptica. En otro caso, aparece una activación postinhibición a los 31 ms.

D. Neuronas espiratorias E2

Se registraron 7 neuronas espiratorias E2 (4,4%) que presentaron una profundidad media de $2229,43 \pm 268,44$ micras y una posición anteroposterior de $+0,55 \pm 0,221$ mm anterior a obex y $1,83 \pm 0,071$ mm lateral a la línea media. Su localización histológica se corresponde con la formación dispersa del núcleo ambiguo (Figura 12). Su frecuencia media de descarga en reposo fue de $12,80 \pm 4,62$ Hz. Su frecuencia de descarga ante la estimulación de la SGPdl fue de $10,98 \pm 4,01$, y frente a la estimulación del vago fue de $13,02 \pm 3,89$. No existen

diferencias significativas cuando comparamos los cambios de frecuencia ante las distintas estimulaciones (Tabla 3).

Por otro lado, en 2 neuronas se observa una disminución de la frecuencia de descarga ante la estimulación de la SGPdl (ente 2 y 7 Hz) (29%) y en 5 no se observan cambios. Frente a la estimulación del vago, 1 neurona disminuye su frecuencia de descarga y 6 no la modifican. En el 100% de los casos, los cambios a la estimulación de la SGPdl son concordantes con los cambios obtenidos por estimulación del vago.

Con respecto a la frecuencia de descarga espontánea, 4 neuronas presentan una frecuencia menor de 10 Hz (57%), mientras que 3 neuronas presentan una frecuencia de descarga espontánea entre 20 y 30 Hz (43%).

Este grupo neuronal se encuentra especialmente afectado por la estimulación de la SGPdl (1 Hz). 2 neuronas presentan una inhibición postestímulo con una duración media de 135 ms. En 1 caso la inhibición comienza a los 40 ms después del estímulo de la SGPdl, y termina a los 80 ms.

En 1 casos se observó una activación a los 5, 5 ms (figura 13) y en otros 2 casos la activación se observó a 3,3 ms (3-4 ms). Cuando se utilizaron dos factores de corrección, el primero dependiendo de la posición aproximada del electrodo de estimulación en el SGPdl y el segundo dependiendo también del tamaño del animal y de la posición del electrodo de registro en el núcleo ambiguo, se calculó una distancia aproximada entre ambas zonas de estudio de 6,6 – 7,7 mm por lo que se pudo calcular una velocidad de conducción del axón activado entre 2 y 2.33 m/s.

En 1 caso se observa una excitación a los 12 ms, apareciendo entre los 40 y 80 ms una inhibición. Se pudo calcular una velocidad de conducción de axón de 0,55 – 0,64 m/s.

E. Neuronas cardiovasculares

Se registraron 44 neuronas con un perfil claramente cardiovascular (27,5%) que presentan una profundidad media de $2955,05 \pm 67,1 \mu\text{m}$ y una

posición anteroposterior de $+0,54 \pm 0,076$ mm anterior a obex y $2,16 \pm 0,034$ mm lateral a la línea media. Su localización histológica se corresponde con el C1/A1 (CVL) (Figura 12). Su frecuencia media de descarga en reposo fue de $15,97 \pm 2,27$ Hz. Su frecuencia de descarga ante la estimulación de la SGPdl fue de $16,43 \pm 2,3$, y frente a la estimulación del vago fue de $12,48 \pm 1,95$. No existen diferencias significativas cuando comparamos los cambios de frecuencia ante las distintas estimulaciones (Tabla 3).

Por otro lado, en 10 neuronas se observa una disminución de la frecuencia de descarga ante la estimulación de la SGPdl (entre 2 y 13 Hz) (23%), en 11 se observa un aumento de la frecuencia (entre 2 y 11 Hz) (25%) y en 23 no se observan cambios. Frente a la estimulación del vago, 7 neuronas disminuyen su frecuencia de descarga, 14 aumentan su descarga y 23 no la modifican. En un 50% de los casos, los cambios a la estimulación de la SGPdl son concordantes con los cambios obtenidos por estimulación del vago.

Con respecto a la frecuencia de descarga espontánea, 20 neuronas presentan una frecuencia menor de 10 Hz (45%); 13 neuronas presentan una frecuencia entre 10 y 20 Hz (30%) y 11 neuronas presentan una frecuencia de descarga espontánea entre 20 y 60 Hz (25%).

Este grupo neuronal se encuentra especialmente afectado por la estimulación de la SGPdl (1 Hz). De 44 de las neuronas, 23 ven modificada su actividad (52%). 10 neuronas presentan una inhibición postestímulo con una duración media de 105 ms. En otros 2 casos la inhibición comienza a los 20 y a los 60 ms después del estímulo de la SGPdl y dura hasta los 140 ms.

En 9 casos se observó una activación media a los 7,6 ms (4-15 ms) (Figura 15). Cuando se utilizaron dos factores de corrección, el primero dependiendo de la posición aproximada del electrodo de estimulación en el SGPdl y el segundo dependiendo también del tamaño del animal y de la posición del electrodo de registro en el nA. Se calculó una distancia aproximada entre ambas zonas de estudio de 6,6 – 7,7 mm por lo que se pudo calcular una velocidad de conducción del axón activado entre 0,87 y 1.01 m/s. En 5 de estas neuronas previamente descritas aparece una inhibición tras la activación.

En 1 de los casos se observa una excitación a los 5 ms seguida de una inhibición de duración 150 ms. En otro caso la excitación aparece a los 15 ms. Se pudo calcular una velocidad de conducción de axón de 0,44 – 0,51 m/s.

F. Neuronas sin modulación cardiorrespiratoria

Se registraron 54 neuronas sin un perfil claramente definido (33,7%) que presentan una profundidad media de $2834,30 \pm 63,04 \mu\text{m}$ y una posición anteroposterior de $+0,55 \pm 0,069$ mm anterior a obex y $1,8 \pm 0,028$ mm lateral a la línea media. Su localización histológica se corresponde con la zona de GRVr y C1/A1 (Figura 12). Su frecuencia media de descarga en reposo fue de $21,82 \pm 2,46$ Hz. Su frecuencia de descarga ante la estimulación de la SGPdl fue de $21,69 \pm 2,65$, y frente a la estimulación del vago fue de $18,26 \pm 2,98$. No existen diferencias significativas cuando comparamos los cambios de frecuencia ante las distintas estimulaciones (Tabla 3).

Por otro lado, en 15 neuronas se observa una disminución de la frecuencia de descarga ante la estimulación de la SGPdl (entre 2 y 13 Hz) (27,7%), en 10 se observa un aumento de la frecuencia (entre 2 y 15 Hz) (18,5%) y en 29 no se observan cambios. Frente a la estimulación del nervio vago, 15 neuronas disminuyen su frecuencia de descarga, 6 aumentan su descarga y 33 no la modifican. En 13 de los casos, los cambios a la estimulación de la SGPdl son concordantes con los cambios obtenidos por estimulación del vago, mientras que en 8 casos son distintos.

Con respecto a la frecuencia de descarga espontánea, 19 presentan una frecuencia menor de 10 Hz (35,2%), 13 presentan una frecuencia entre 10 y 20 Hz (24,1%); 9 neuronas presentan una frecuencia entre 20 y 30 Hz (16,6%) y, 13 de ellas presentan entre 30 y 60 Hz (24,1%).

Este grupo neuronal se encuentra especialmente afectado por la estimulación de la SGPdl (1 Hz). Del total de 54 neuronas, 25 de ellas ven modificada su actividad (46%). 8 neuronas presentan una inhibición postestímulo con una duración media de 185 ms. En otros 4 casos la inhibición comienza entre los 20 y a los 75 ms después del estímulo de la SGPdl y dura hasta los 130 ms.

En 6 casos se observó una activación media a los 17,4 ms (8-34 ms). Cuando se utilizaron dos factores de corrección, el primero dependiendo de la posición aproximada del electrodo de estimulación en el SGPdl y el segundo dependiendo también del tamaño del animal y de la posición del electrodo de registro en el núcleo ambiguo, se calculó una distancia aproximada entre ambas zonas de estudio de 6,6 – 7,7 mm por lo que se pudo calcular una velocidad de conducción del axón activado entre 0,38 y 0.44 m/s. En 6 de estas neuronas previamente descritas aparece una inhibición tras la activación.

En 1 de los casos se observa una excitación a los 4,5 ms seguida de una inhibición de duración 300 ms. En otros dos casos la excitación aparece a los 4 ms, calculando una velocidad de conducción de axón de 1,65 – 1,9 m/s, y en otro caso a los 20 ms (velocidad de conducción entre 0,33 y 0,38 m/s).

G. Neurona silente

Se registró una neurona silente que presenta una profundidad de 2320 micras y una posición anteroposterior de +1 mm anterior a obex y 1,85 mm lateral a la línea media. Su localización histológica se corresponde con la parte dispersa del nA. La neurona pudo ser estudiada por presentar activación ortodrómica/antidrómica desde la SGPdl. La latencia de actividad ortodrómica desde la SGPdl fue de 4.5 ms, por lo que se pudo calcular una velocidad de conducción del axón activado entre 1.47 y 1.7 m/s.

Tabla 3

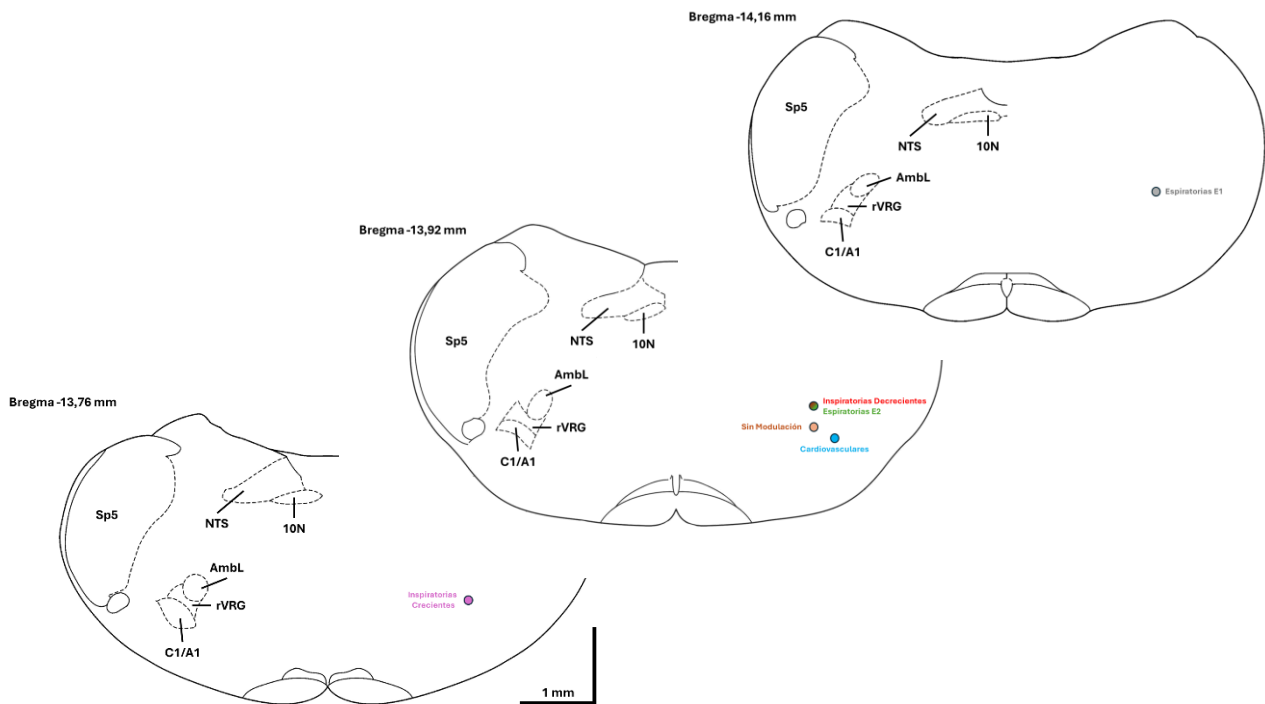
Cuantificación de las neuronas registradas mediante registro extracelular unitario en las distintas regiones del nA y regiones adyacentes.

ESTUDIO ELECTRONEUROFISIOLÓGICO							
	N	PROF (µm)	POS (mm)	FREC. REP (Hz)	FREC. SGPdI (Hz)	FREC. VAGO (Hz)	MODIF ACTIV
INSPIRATORIAS DECRECIENTES	21	2226,67 ± 115,8	+0,58 ± 0,087 ant 1,83± 0,051 lat	46,4 ± 9,91	46,38 ± 10,08	46,79 ± 12,64	76%
INSPIRATORIAS CRECIENTES	15	2609,80 ± 132,04	+0,78 ± 0,091 ant 2,05± 0,033 lat	34,25 ± 9,59	33,70 ± 8,89	46,79 ± 12,64	47%
ESPIRATORIAS E1	15	2475,33 ± 91,75	+0,24 ± 0,089 1,85± 0,036	16,90 ± 4,02	16,98 ± 3,84	15,37 ± 4,19	67%
ESPIRATORIAS E2	7	2229,43 ± 268,44	+0,55 ± 0,221 1,83± 0,071	12,80 ± 4,62	10,98 ± 4,01	13,02 ± 3,89	86%
CARDIOVASC.	44	2955,05 ± 67,1	+0,54 ± 0,076 2,16± 0,034	15,97 ± 2,27	16,43 ± 2,3	12,48 ± 1,95	52%
S/M	54	2834,30 ± 63,04	+0,55 ± 0,069 1,8± 0,028	21,82 ± 2,46	21,69 ± 2,65	18,26 ± 2,98	46%

Nota: los datos se expresan como la media ± SEM. 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 (delta) entre los animales control y estimulados († p< 0.05).

Figura 12

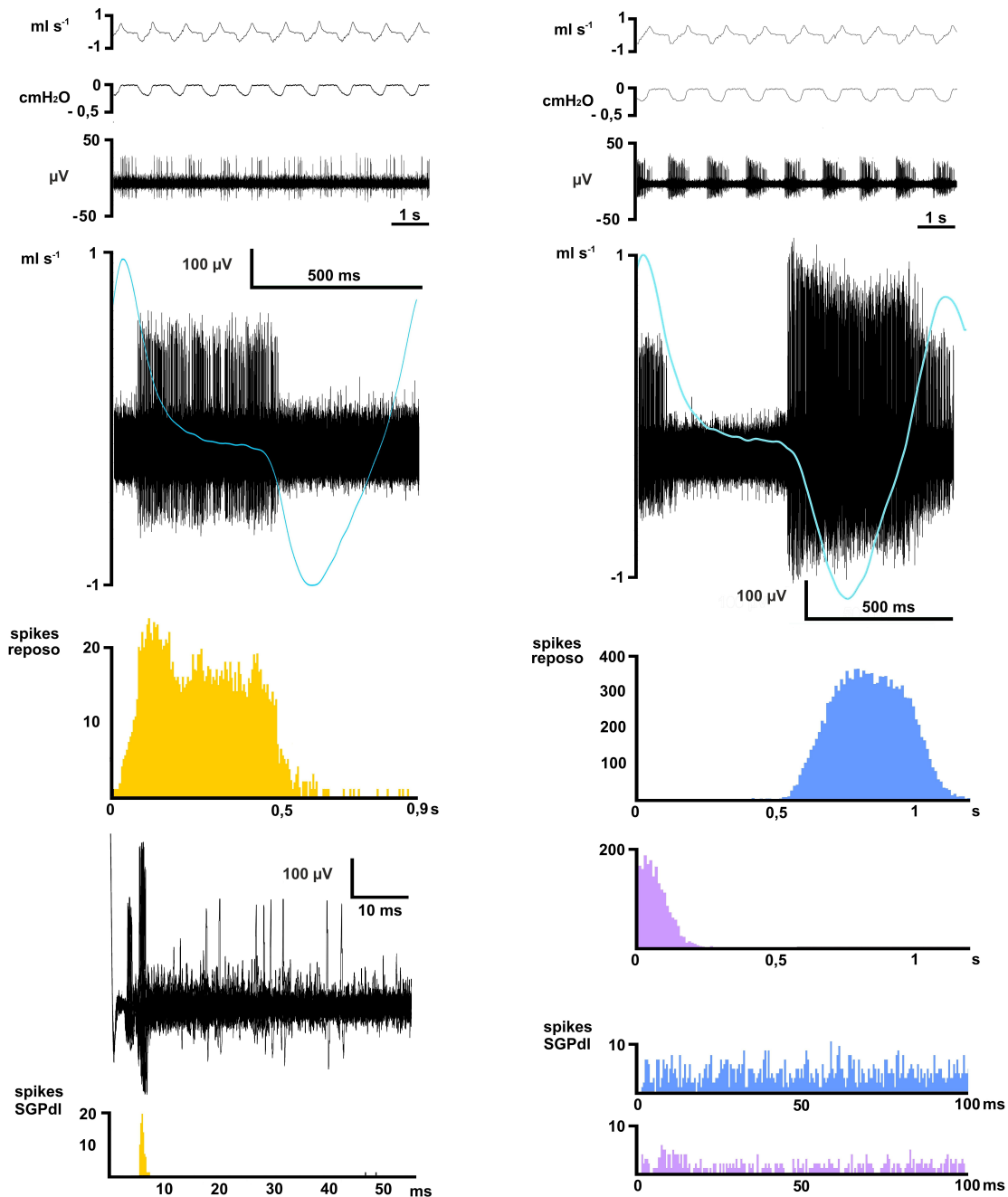
Dibujo esquemático de secciones parasagitales del cerebro de rata.



Nota: ilustran la posición aproximada dentro de la formación dispersa del nA y regiones adyacentes de los 6 grupos neuronales caracterizados por registro unitario extracelular. 10N, núcleo motor dorsal del vago; AmbL, formación dispersa del núcleo ambiguo; C1/A1, grupos adrenérgicos y catecolaminérgicos; NTS, núcleo del tracto solitario; rVRG, grupo respiratorio ventral parte rostral; Sp5, núcleo trigeminal espinal.

Figura 13

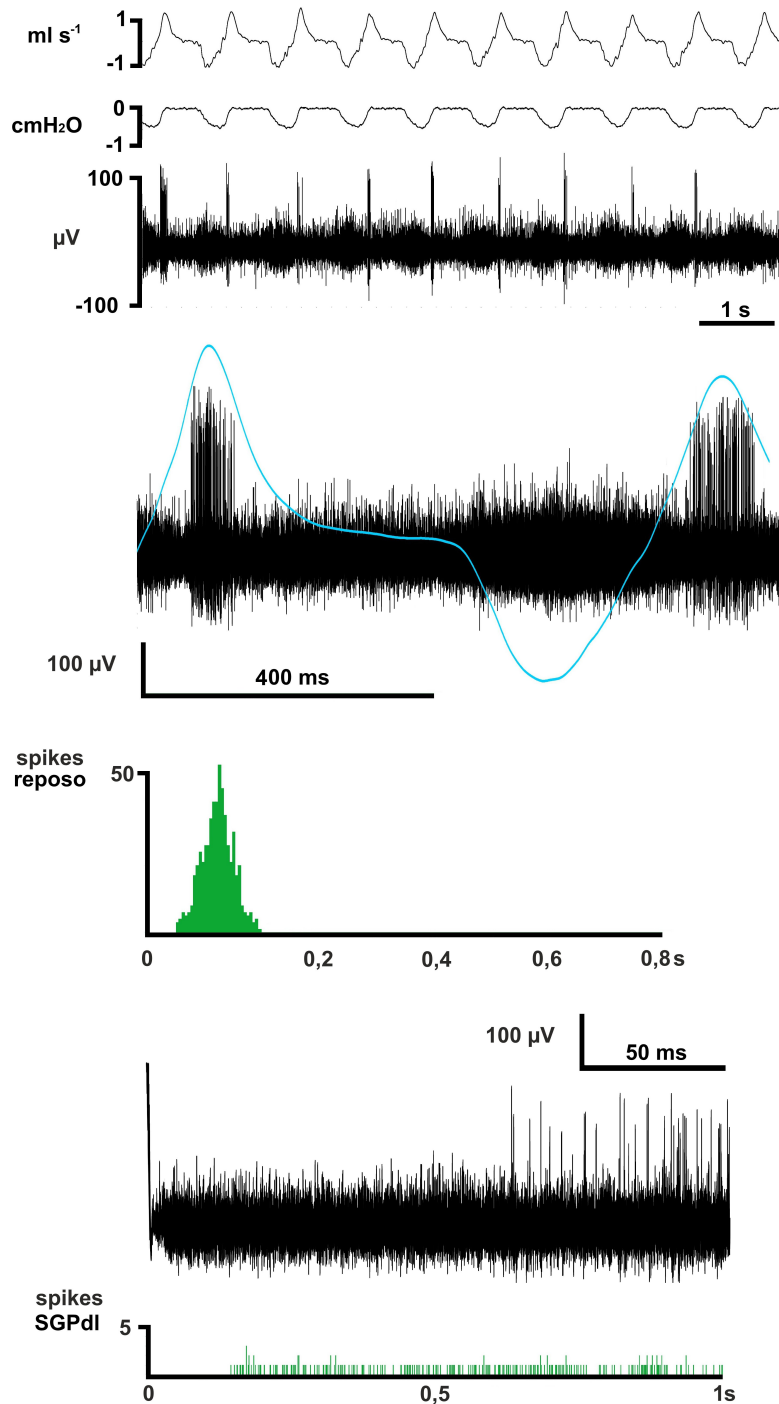
Registro de tres neuronas con modulación respiratoria



Nota: neurona espiratoria E2 (amarillo), espiratoria E1 (morado), inspiratoria (azul). De arriba abajo se muestra: barrido de 10 s de registro de flujo respiratorio, presión pleural y descarga neuronal. Descarga neuronal superpuesta a la línea media de flujo respiratorio (azul). Peristimulus histogram de la descarga neuronal frente al flujo (repose) y frente al estímulo de la SGPdI (activación de la neurona amarilla).

Figura 14

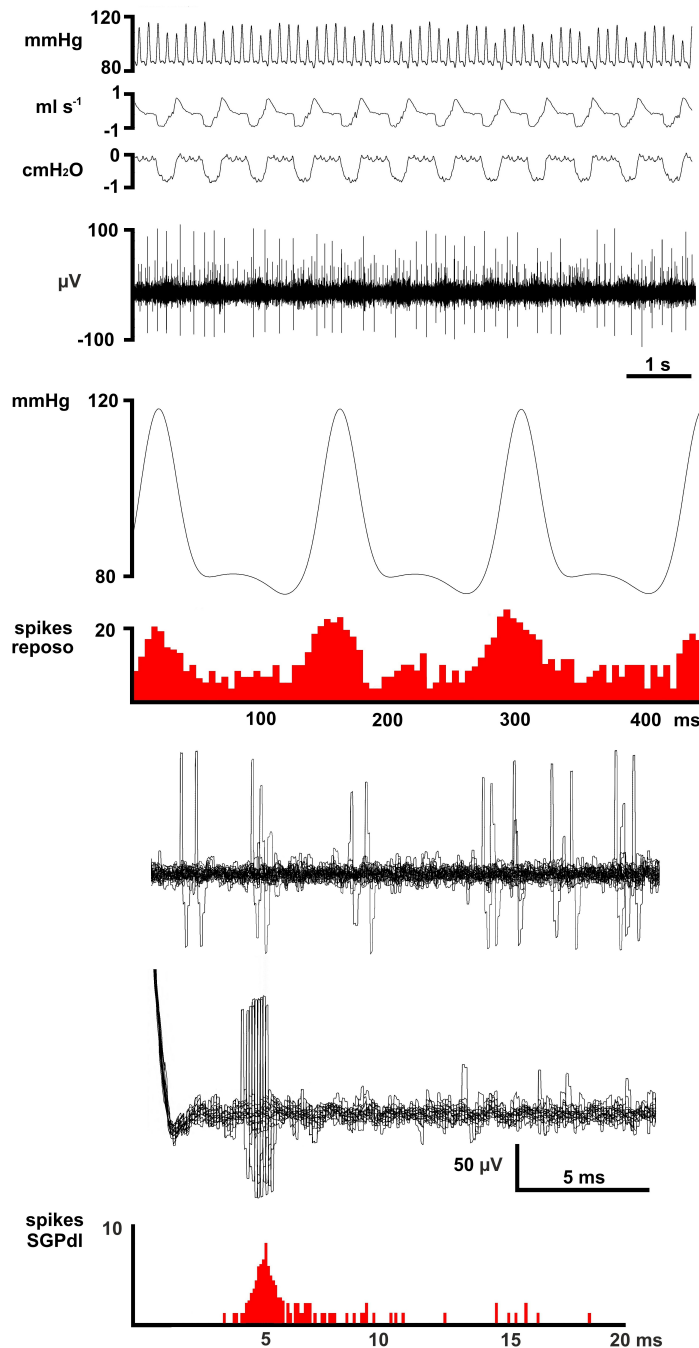
Registro de neurona espiratoria E1



Nota: de arriba abajo se muestran: barrido de 10 s del registro de flujo respiratorio, presión pleural y descarga neuronal. Descarga neuronal superpuesta a la línea media de flujo respiratorio (azul). Peristimulus histogram de la descarga neuronal frente al flujo (repose), descarga con inhibición y Peristimulus histogram tras estímulo de la SGPdI.

Figura 15

Registro de neurona con modulación cardiovascular



Nota: de arriba abajo se muestran: barrido de 10 s del registro de presión arterial, flujo respiratorio, presión pleural y descarga neuronal. Peristimulus histogram de la descarga neuronal en reposo frente a la línea media de presión arterial, descarga con activación de la neurona tras estímulo de la SGPdI.

5.3. INTERACCIÓN DE LA SGPdl Y EL nA: EXPERIMENTOS CON ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA/QUÍMICA Y PRESIÓN SUBGLÓTICA

Una vez caracterizada la relación anatomofuncional entre la SGPdl y el nA. Se diseñó un segundo bloque experimental en el que se estimuló eléctrica y químicamente (glutamato) la SGPdl para caracterizar los cambios cardiorrespiratorios y de resistencia laríngea que se producen ante la activación de esta región. Para poder medir los cambios de resistencia laríngea se modificaron los procedimientos generales de cirugía y se aplicó la técnica de “glotis aislada in situ”.

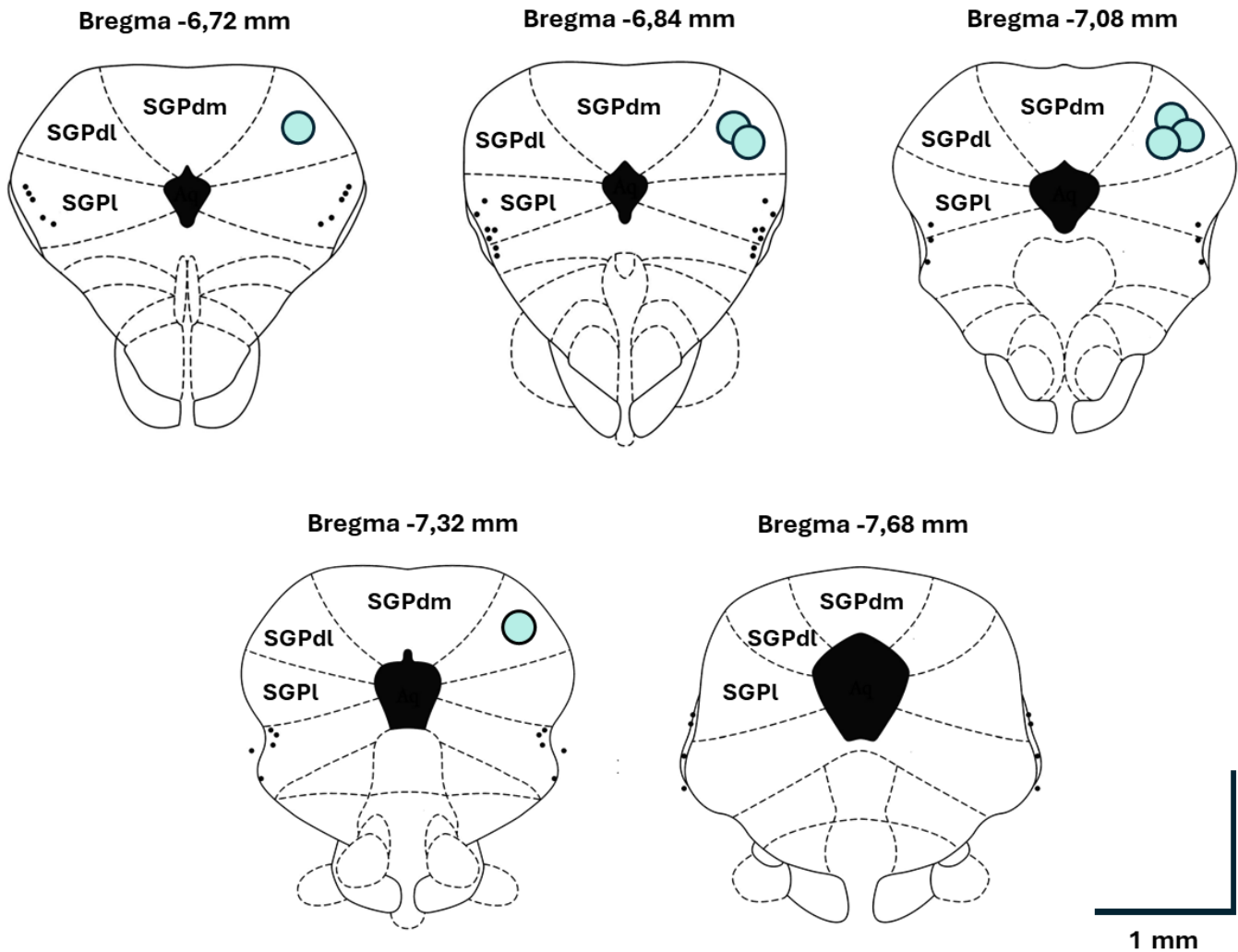
5.3.1. Estimulación eléctrica de SGPdl y medición de presión subglótica

Se caracterizó la respuesta cardiorrespiratoria y laríngea tras la estimulación eléctrica de la SGPdl en rata (n=7) con respiración espontánea. La localización anatómica de los puntos donde se realizaron las estimulaciones eléctricas en la SGPdl se observa en la figura 16.

La respuesta respiratoria y laríngea evocada por la estimulación eléctrica de la SGPdl consistió en un aumento significativo de la frecuencia respiratoria, de 104 ± 9 a 145 ± 15 resp min^{-1} ($p < 0,01$) por disminución de tiempo espiratorio, de $0,343 \pm 0,028$ a $0,233 \pm 0,021$ s^{-1} ($p < 0,01$) e inspiratorio, de $0,261 \pm 0,021$ a $0,209 \pm 0,026$ s^{-1} ($p < 0,05$), también se produjo un incremento de la presión pleural inspiratoria, de $0,805 \pm 0,023$ a $1,232 \pm 0,045$ cmH_2O ($p < 0,01$) acompañada de una disminución en la resistencia laríngea, de $8,1 \pm 1,3$ a $3,3 \pm 0,3$ cmH_2O ($p < 0,01$). En cuanto a la respuesta cardiovascular evocada por la estimulación eléctrica de la SGPdl, consistió en un aumento de la presión arterial, de 106 ± 3 a 148 ± 6 mmHg ($p < 0,001$) y de la frecuencia cardiaca, de 408 ± 10 a 435 ± 10 lat min^{-1} ($p < 0,001$) (Figuras 17-20; Tabla 4).

Figura 16

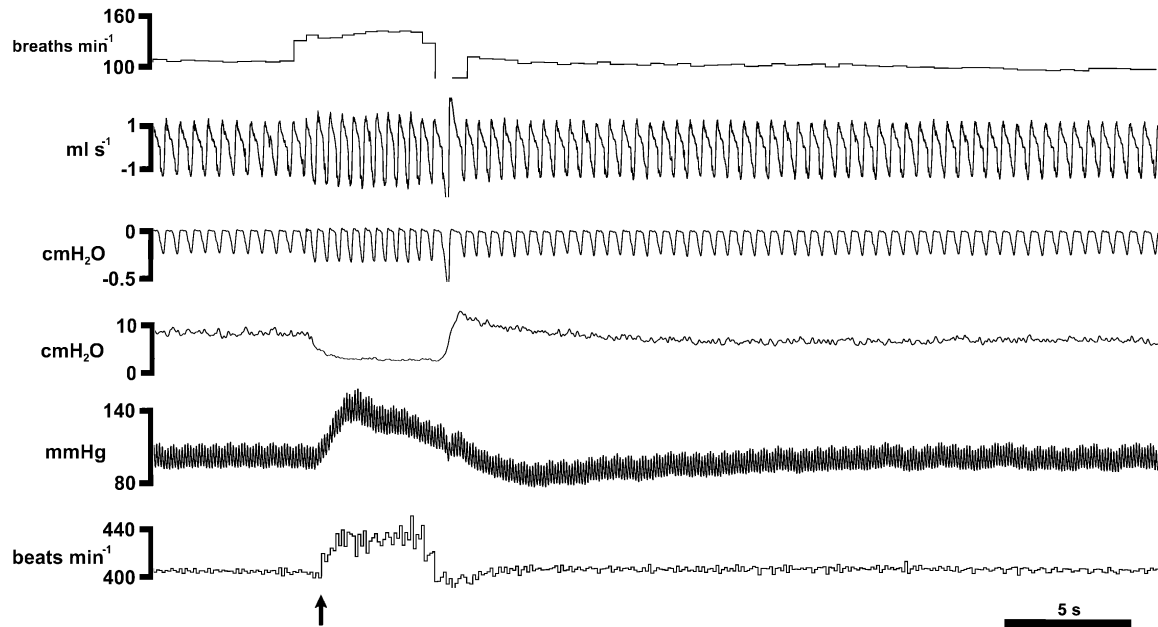
Localización de las zonas de la SGPdl estimuladas eléctricamente



Nota: esquematización de secciones coronales de la SGPdl desde la zona rostral (parte superior-izquierda) a la caudal (parte inferior-derecha), para mostrar la localización de las zonas estimuladas eléctricamente dentro de la SGPdl. SGPdm, Sustancia Gris Periacueductal dorsomedial; SGPdl, Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral; SGPI, Sustancia Gris Periacueductal lateral.

Figura 17

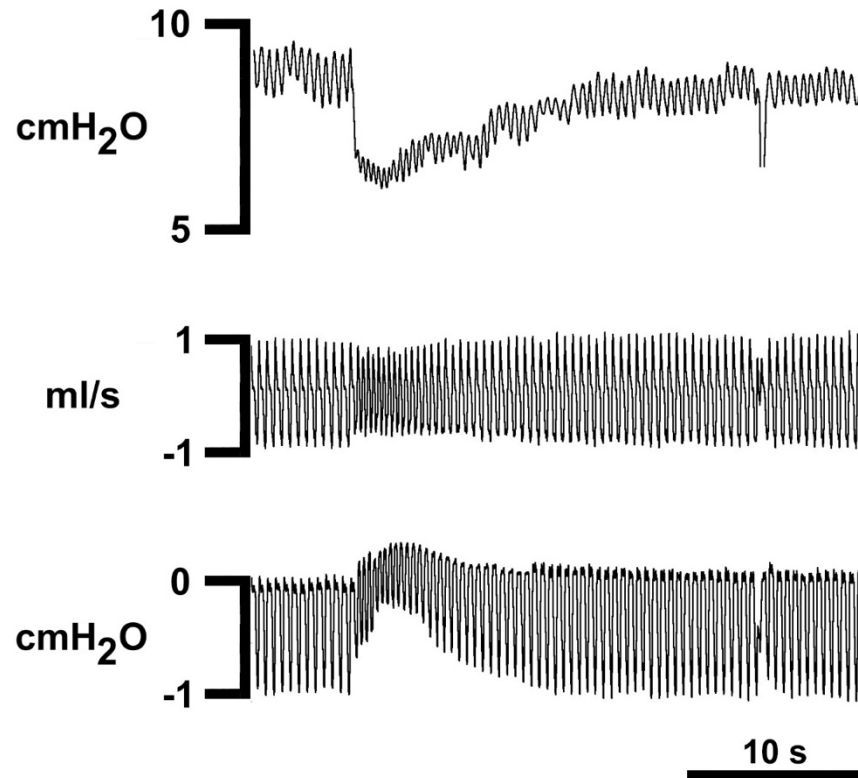
SGPdI (estimulación eléctrica)



Nota: cambios cardiorrespiratorios y de actividad laríngea en rata con respiración espontánea antes, durante y 30 segundos después de la estimulación eléctrica en la SGPdI. La estimulación eléctrica la marca la flecha vertical (5 segundos). Se representan de arriba abajo los registros de frecuencia respiratoria instantánea (resp min^{-1}), flujo respiratorio (ml s^{-1}), presión pleural (cmH_2O), presión subglótica (cmH_2O), presión arterial (mmHg) y frecuencia cardíaca instantánea (lat min^{-1}).

Figura 18

Registro de presión subglótica, flujo respiratorio y presión pleural



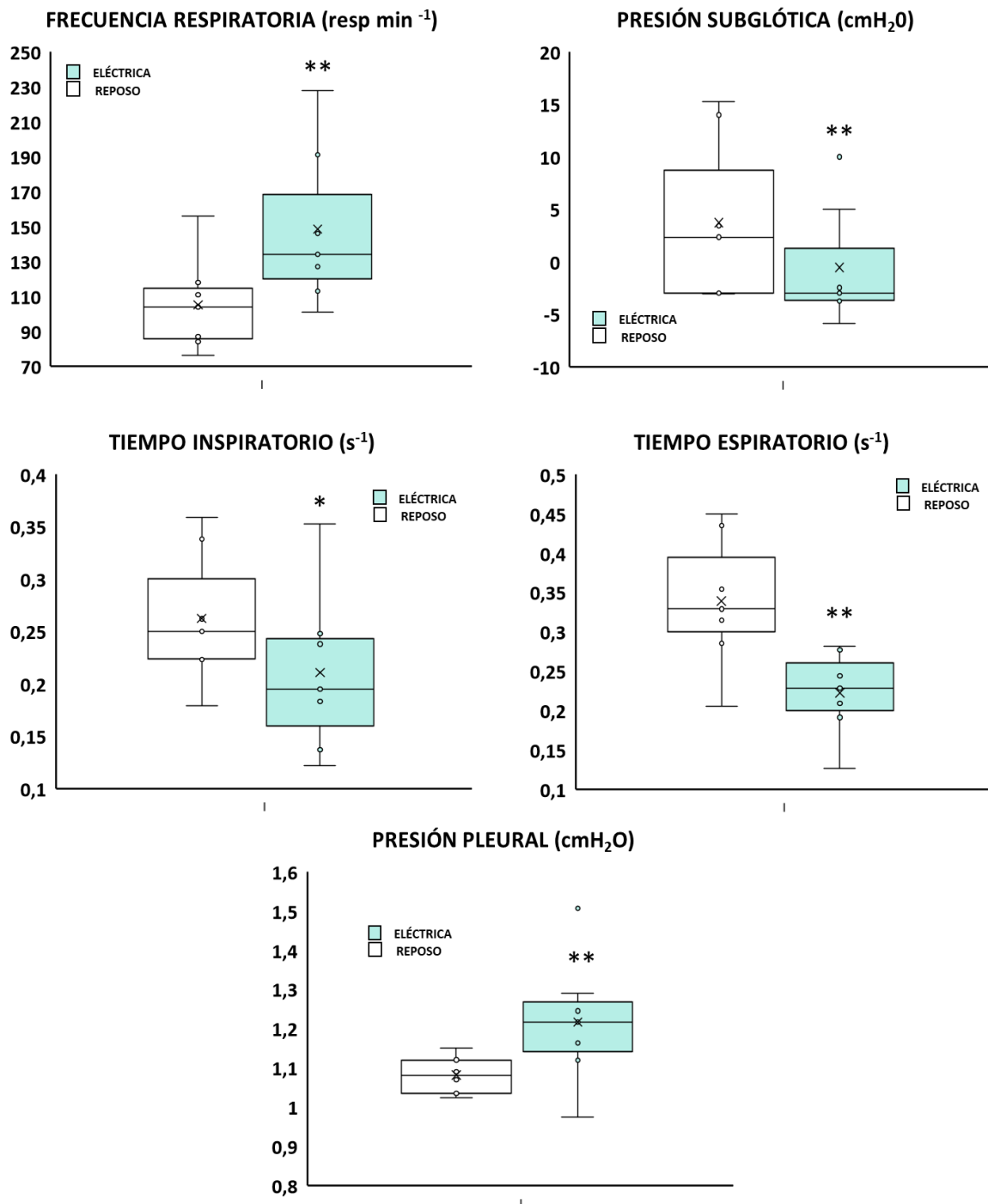
Nota: de arriba abajo: presión subglótica (cmH₂O), flujo respiratorio (ml/s) y presión pleural (cmH₂O) en una rata de respiración espontánea que muestra el efecto modulador respiratorio sobre la respuesta laríngea evocada a la estimulación eléctrica de la SGPdI.

Tabla 4. Parámetros laríngeos y cardiorrespiratorios medidos antes (*Reposo*), durante (*Estimulación*) y 4 minutos después de la estimulación eléctrica en la SGPdl (*Recuperación*). Los datos se expresan como media \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y comparando estimulación frente a reposo. Se muestran los valores de tiempo inspiratorio (TI), tiempo espiratorio (TE), frecuencia respiratoria (FR), presión pleural (PP), presión subglótica (PSG), presión arterial (PA) y frecuencia cardiaca (FC).

Estimulación eléctrica de la SGPdl			
SGPdl ($n=7$)	Reposo	Estimulación	Recuperación
TI (s^{-1})	0,261 \pm 0,021	0,209 \pm 0,026*	0,259 \pm 0,019
TE (s^{-1})	0,343 \pm 0,028	0,233 \pm 0,021**	0,341 \pm 0,025
FR (resp min^{-1})	104 \pm 9	145 \pm 15**	105 \pm 9
PP (cmH ₂ O)	0,805 \pm 0,023	1,232 \pm 0,045**	0,896 \pm 0,019
PSG (cmH ₂ O)	8,1 \pm 1,3	3,3 \pm 0,3**	8,1 \pm 1,4
PA (mmHg)	106 \pm 3	148 \pm 6***	104 \pm 4
FC (lat min^{-1})	408 \pm 10	435 \pm 10***	410 \pm 7

Figura 19

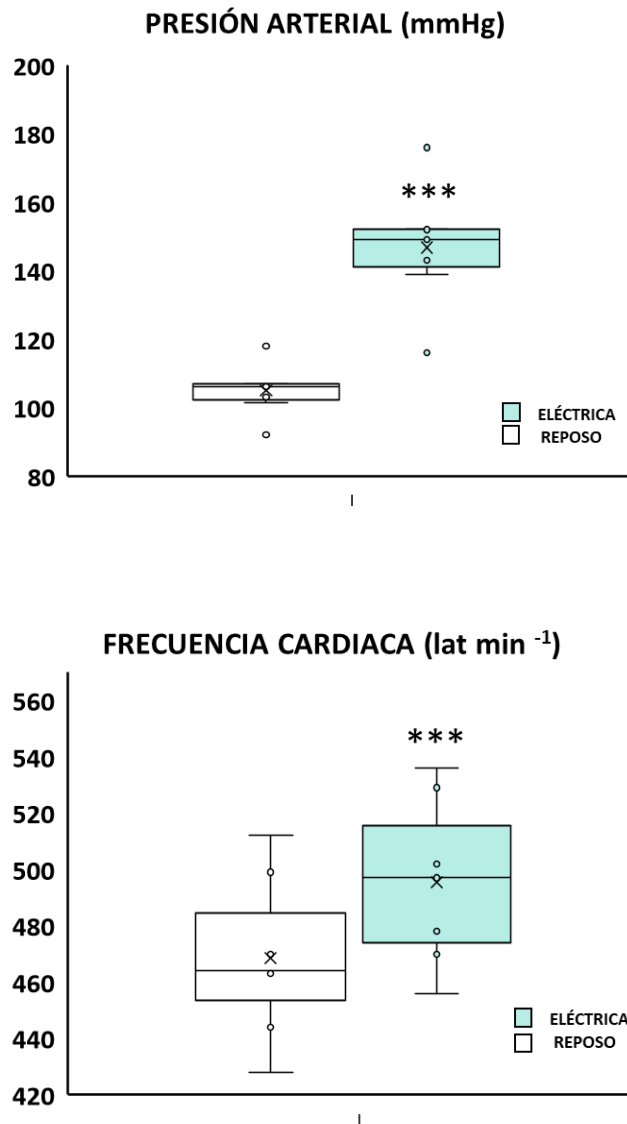
Cambios respiratorios y respuesta laríngea tras estimulación eléctrica de SGPdI



Nota: gráficos de cajas y bigotes que muestran los cambios respiratorios y de respuesta laríngea entre los estados de reposo (caja blanca) y tras la estimulación eléctrica de la SGPdI (caja azul). FR, frecuencia respiratoria; PSG, presión subglótica; TI, tiempo inspiratorio; TE, tiempo espiratorio; PP, presión pleural. *p<0,05; **p<0,01. Estimulación frente a Reposo.

Figura 20

Cambios cardiovasculares tras estimulación eléctrica de SGPdl



Nota: gráficos de cajas y bigotes que muestran los cambios en los parámetros cardiovasculares (presión arterial y frecuencia cardiaca) entre los estados de reposo (caja blanca) y tras la estimulación eléctrica de la SGPdl (caja azul).
*** $p < 0,001$. Estimulación frente a Reposo.

5.3.2. Estimulación química de la SGPdl y medición de presión subglótica

Se caracterizó la respuesta cardiorrespiratoria y laríngea tras la estimulación química de la SGPdl con PBS (Grupo Control; n=7) y glutamato (Grupo Estimulado; n=7) en ratas con respiración espontánea (Figura 21).

Microinyecciones de PBS en la SGPdl

Antes de iniciar la estimulación química con glutamato, diseñamos un grupo control en el que se microinyectó PBS (phosphate buffer saline, pH 7,4 ± 0,1) con azul de Evans 1% (50 nl) en la SGPdl.

Se caracterizó la respuesta de reposo del animal 30 segundos antes de la microinyección de PBS en la SGPdl (n=7). A continuación, se microinyectaron 50 nl de PBS en la zona de estudio. Estas microinyecciones no produjeron cambios significativos en los parámetros cardiorrespiratorios ni laríngeos en reposo (Tabla 5, Figuras 23 y 24). Tras 30 minutos, las variables registradas no mostraron cambios con respecto a los valores de reposo.

Se comprobó histológicamente que todas las microinyecciones se encontraban en la zona de estudio y no afectaban a regiones colindantes (Figura 18).

Otros resultados

Se dio la circunstancia que en 3 ratas la microinyección no se realizó exactamente en la SGPdl. En ninguno de los tres casos se produjeron cambios en las variables cardiorrespiratorias y laríngeas analizadas. Las localizaciones de las microinyecciones fueron en DpWh (capa blanca profunda de colículo superior).

Microinyecciones de glutamato en la SGPdl

El diseño de este grupo experimental se enfocó para poder caracterizar la respuesta laríngea y cardiorrespiratoria evocada por la estimulación de los somas de la SGPdl, ya que el glutamato, a diferencia de la estimulación eléctrica, estimula únicamente los cuerpos celulares de las neuronas situadas en nuestra región de estudio.

Se caracterizó la respuesta de reposo del animal 30 segundos antes de la microinyección de glutamato en la SGPdl (n=7). A continuación, se microinyectaron 50 nl de glutamato en la zona de estudio. El glutamato se microinyectó diluido en una solución de PBS (phosphate buffer saline, pH 7,4 ± 0,1) y azul de Evans 1% (50 nl), esto nos permitió comprobar histológicamente que las microinyecciones se encontraban en la zona de estudio y no afectaban a regiones colindantes (Figura 21).

Los primeros cambios cardiorrespiratorios y laríngeos comienzan a observarse a los 30 segundos - 1 minuto tras la microinyección de glutamato. Esta respuesta simpatoexcitadora tiene una duración aproximada de entre 2 minutos y medio y 7 minutos. Tras 30 minutos, todas las variables registradas volvieron a los valores de reposo en todos los animales.

La respuesta laríngea y respiratoria evocada por estimulación química con glutamato de la SGPdl se caracterizó por una disminución significativa de la resistencia laríngea (presión subglótica) de $9,4 \pm 4,6$ a $4,6 \pm 0,4$ cmH₂O ($p < 0,001$) acompañada de incremento significativo de la frecuencia respiratoria, de 81 ± 5 a 111 ± 13 resp min⁻¹ ($p < 0,001$) por disminución de tiempo espiratorio, de $0,474 \pm 0,038$ a $0,346 \pm 0,037$ s⁻¹ ($p < 0,001$) e inspiratorio, de $0,287 \pm 0,009$ a $0,244 \pm 0,023$ s⁻¹ ($p < 0,05$) y un incremento significativo de la presión pleural inspiratoria, $1,072 \pm 0,014$ a $1,217 \pm 0,062$ cmH₂O ($p < 0,001$) (Tabla 6, Figuras 22, 23 y 24).

La respuesta cardiovascular se caracterizó por un aumento significativo de la presión arterial, de 105 ± 3 a 116 ± 4 mmHg ($p < 0,001$), acompañada de un aumento significativo también de la frecuencia cardíaca, de 391 ± 8 a 436 ± 8 lat min⁻¹ ($p < 0,001$) (Tabla 6, Figuras 22, 23 y 24).

Otros resultados

En 2 de los animales, se comprobó que la zona microinyectada no se correspondía con la SGPdl. En el primero de ellos, se microinyectó fuera de la SGP, concretamente, en la zona de DpWh (capa blanca profunda del colículo superior), sin obtener cambios en la respuesta laríngea y cardiorrespiratoria. En el segundo animal la microinyección se localizó entre las regiones SGPI y SGPvl no produciéndose cambios en la respuesta laríngea, aunque sí una ligera disminución no significativa de la frecuencia respiratoria, presión arterial y frecuencia cardíaca.

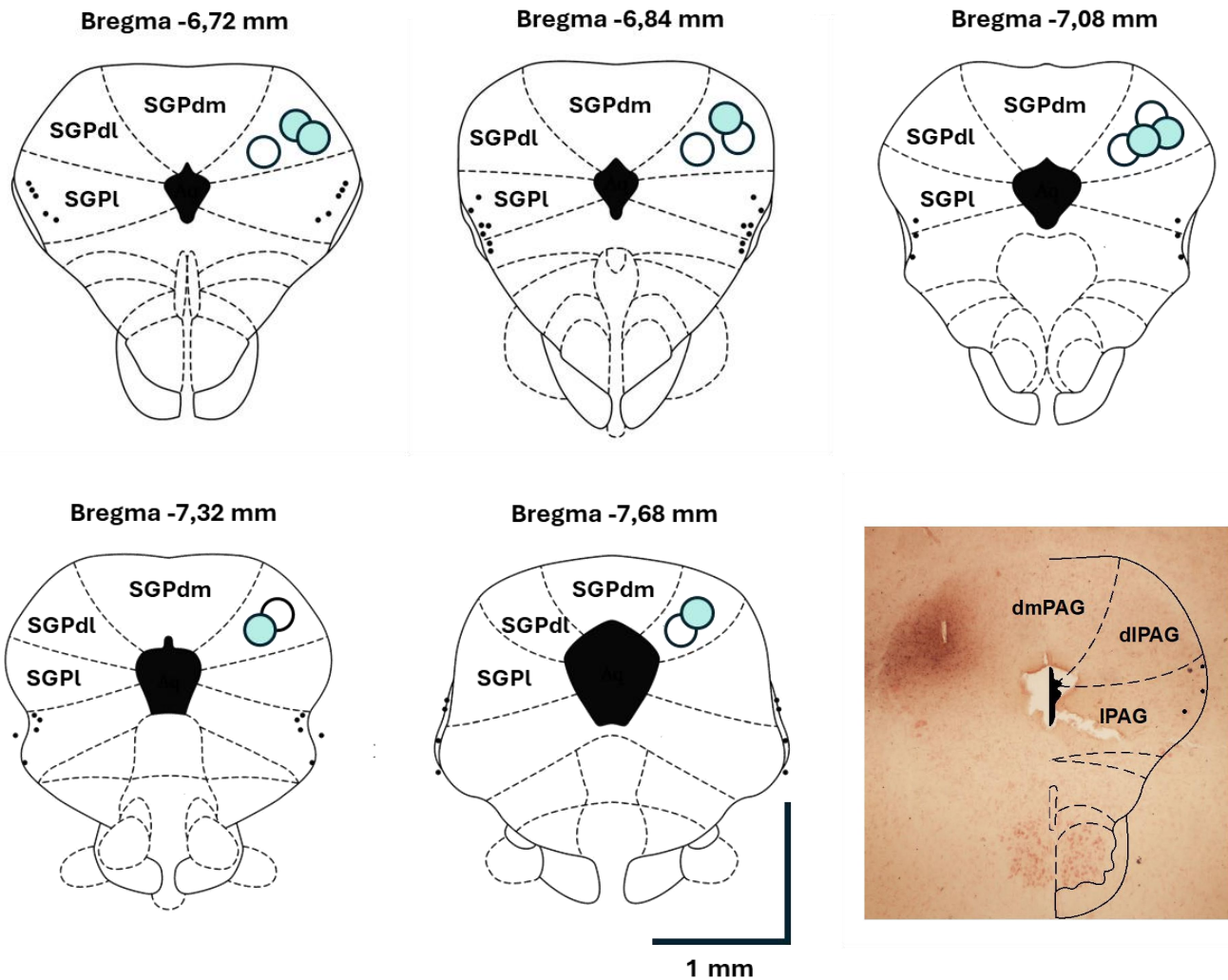
Microinyecciones de PBS vs microinyecciones de glutamato en la SGPdl

Para poder comprobar que los cambios producidos en el grupo de animales estimulados con glutamato eran diferentes significativamente a los del grupo control, se realizó una comparativa entre la amplitud de las diferencias en las respuestas laríngeas y cardiorrespiratorias entre ambos grupos experimentales.

En dicho estudio se observaron diferencias significativas en la amplitud del cambio del tiempo espiratorio ($-0,008 \pm 0,006$ a $-0,128 \pm 0,021$ s⁻¹; $p = 0,001$), frecuencia respiratoria ($1 \pm 0,69$ a $29,57 \pm 8,7$ resp min⁻¹; $p = 0,001$), presión pleural ($0,007 \pm 0,001$ a $0,144 \pm 0,050$ cmH₂O; $p = 0,029$), presión subglótica ($0,05 \pm 0,05$ a $-4,60 \pm 0,24$ cmH₂O; $p = 0,001$), presión arterial ($0,00 \pm 1,0$ a $10,57 \pm 0,82$ mmHg; $p = 0,001$) y frecuencia cardíaca ($0,29 \pm 2,5$ a $45,57 \pm 3,9$ lat min⁻¹; $p = 0,001$). No se produjeron diferencias significativas en el tiempo inspiratorio entre ambos grupos (Figuras 23 y 24).

Figura 21

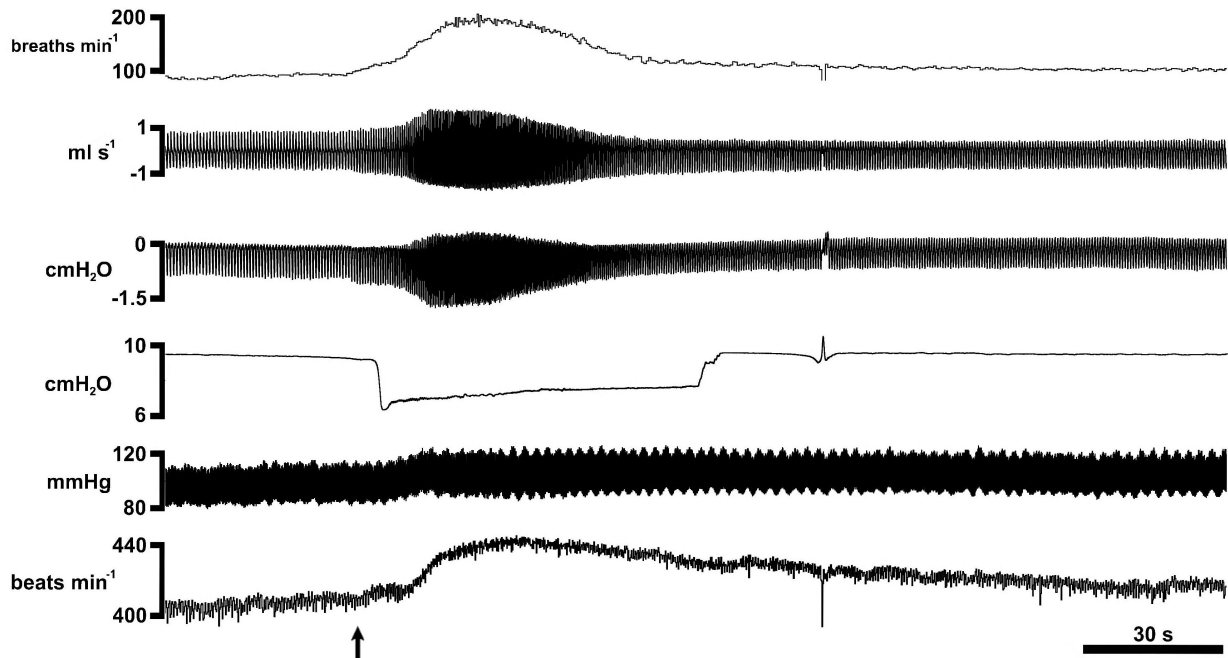
Localización microinyección de PBS y glutamato dentro de la SGPdl



Nota: esquematización de secciones coronales de la SGPdl desde la zona rostral (parte superior-izquierda) a la caudal (parte inferior-derecha), para mostrar la localización de las zonas microinyectadas con PBS (círculo vacío) y con glutamato (círculo azul) dentro de la SGPdl. SGPdm, Sustancia Gris Periacueductal dorsomedial; SGPdl, Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral; SGPl, Sustancia Gris Periacueductal lateral.

Figura 22

SGPdl (estimulación con glutamato)



Nota: cambios cardiorrespiratorios y de actividad laríngea en rata con respiración espontánea antes, durante y 4 minutos después de la microinyección de glutamato en la SGPdl. La flecha vertical marca la microinyección. Se representan de arriba abajo los registros de frecuencia respiratoria instantánea (rpm), flujo respiratorio (ml s^{-1}), presión pleural (cmH_2O), presión subglótica (cmH_2O), presión arterial (mmHg) y frecuencia cardíaca instantánea (bpm).

Tabla 5. Parámetros laríngeos y cardiorrespiratorios medidos antes (*Reposo*), durante (*Estimulación*) y 30 minutos después de la microinyección de **PBS** en la SGPdl (*Recuperación*). Los datos se expresan como media \pm SEM. Se comparan estimulación frente a reposo. Se muestran los valores de tiempo inspiratorio (TI), tiempo espiratorio (TE), frecuencia respiratoria (FR), presión pleural (PP), presión subglótica (PSG), presión arterial (PA) y frecuencia cardiaca (FC).

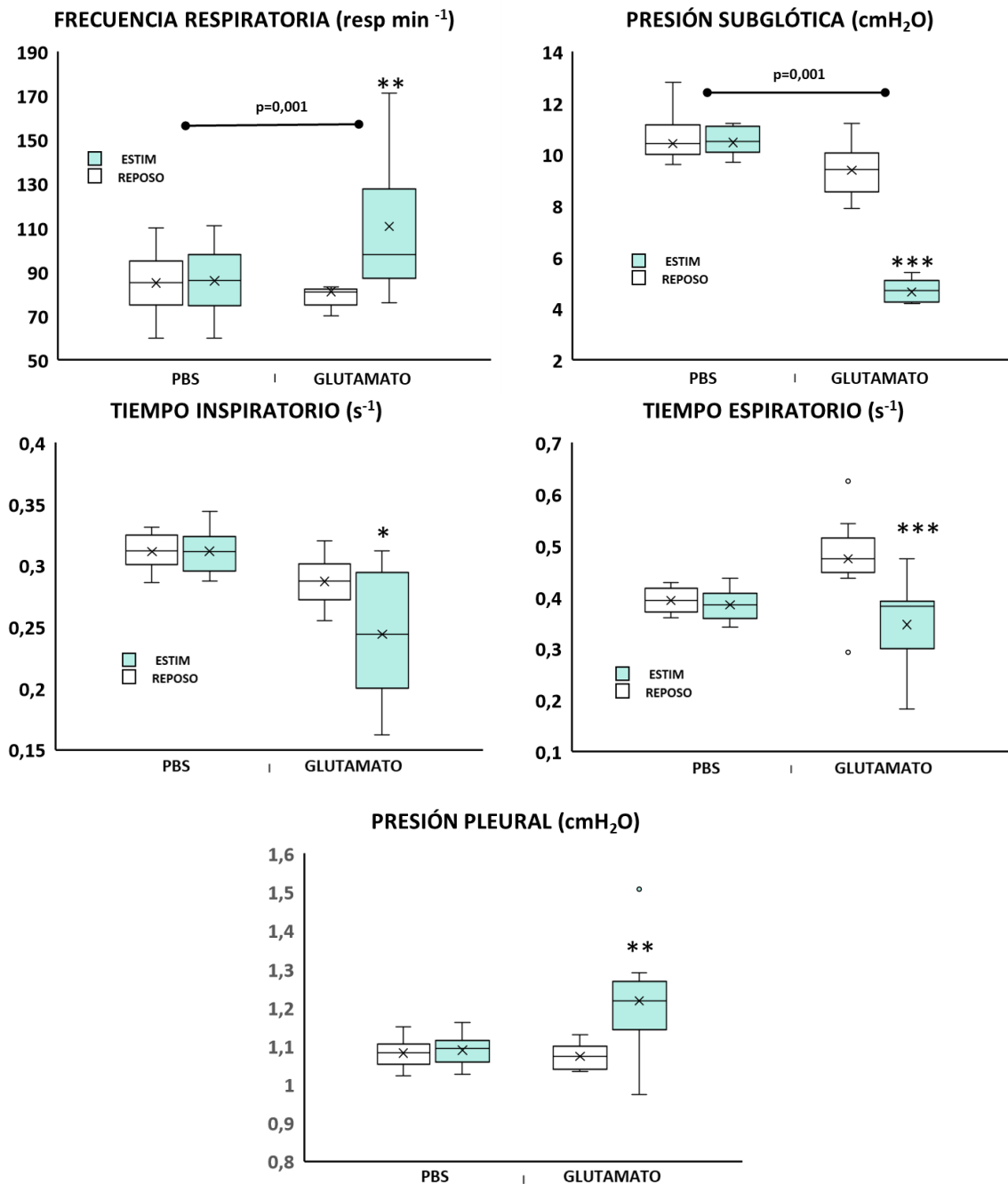
Microinyecciones de PBS en la SGPdl			
SGPdl (n=7)	Reposo	Estimulación	Recuperación
TI (s⁻¹)	0,311 \pm 0,001	0,312 \pm 0,001	0,312 \pm 0,001
TE (s⁻¹)	0,394 \pm 0,001	0,385 \pm 0,002	0,393 \pm 0,001
FR (resp min⁻¹)	85 \pm 7	86 \pm 7	85 \pm 7
PP (cmH₂O)	1,081 \pm 0,017	1,088 \pm 0,018	1,082 \pm 0,016
PSG (cmH₂O)	10,4 \pm 0,6	10,5 \pm 0,6	10,4 \pm 0,6
PA (mmHg)	103 \pm 3	104 \pm 2	103 \pm 2
FC (lat min⁻¹)	394 \pm 8	395 \pm 7	393 \pm 10

Tabla 6. Parámetros laríngeos y cardiorrespiratorios medidos antes (Reposo), durante (Estimulación) y 30 minutos después de la microinyección de glutamato en la SGPdl (Recuperación). Los datos se expresan como media \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Se compara estimulación frente a reposo. Se muestran los valores de tiempo inspiratorio (TI), tiempo espiratorio (TE), frecuencia respiratoria (FR), presión pleural (PP), presión subglótica (PSG), presión arterial (PA) y frecuencia cardiaca (FC).

Microinyecciones de glutamato en la SGPdl			
SGPdl ($n=7$)	Reposo	Estimulación	Recuperación
TI (s^{-1})	0.287 ± 0.009	$0.244 \pm 0.023^*$	0.286 ± 0.008
TE (s^{-1})	0.474 ± 0.038	$0.346 \pm 0.037^{***}$	0.472 ± 0.035
FR (resp min^{-1})	81 ± 5	$111 \pm 13^{***}$	83 ± 6
PP (cmH_2O)	$1,072 \pm 0,014$	$1,217 \pm 0,062^{**}$	$1,090 \pm 0,016$
PSG (cmH_2O)	9.4 ± 0.4	$4.6 \pm 0.4^{***}$	9.8 ± 0.6
PA (mmHg)	105 ± 3	$116 \pm 4^{***}$	107 ± 4
FC ($lat\ min^{-1}$)	391 ± 8	$436 \pm 8^{***}$	393 ± 10

Figura 23

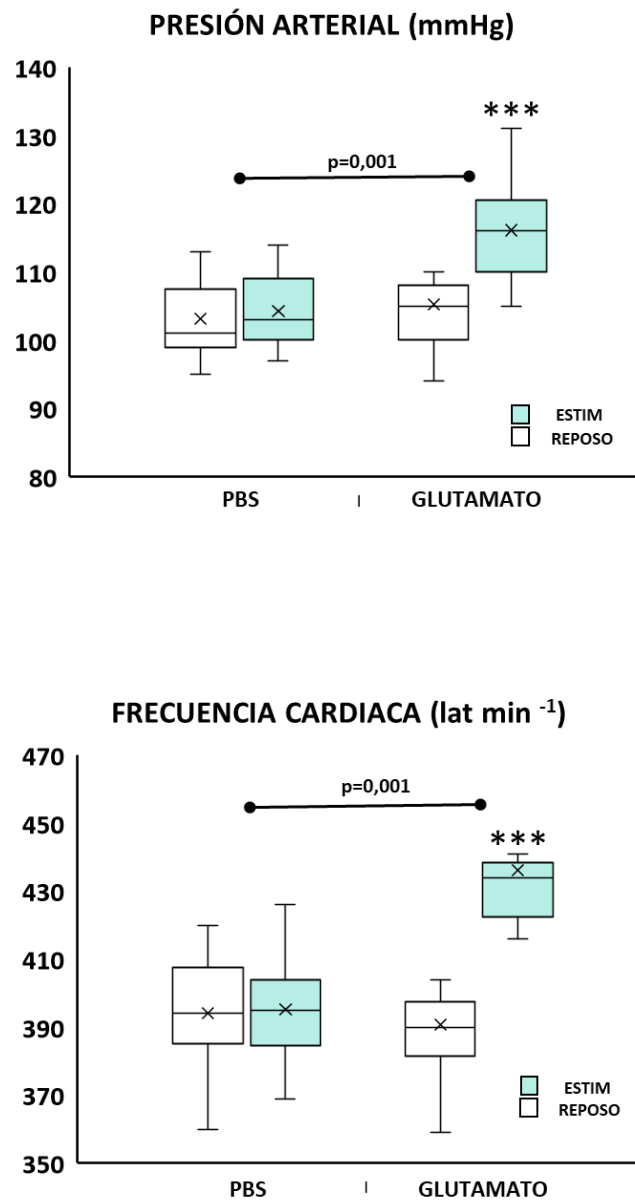
Cambios respiratorios y respuesta laríngea tras estimulación química de SGPdl



Nota: gráficos de cajas y bigotes que muestran los cambios respiratorios y de respuesta laríngea entre los estados de reposo (caja blanca) y tras la estimulación de la SGPdl (caja azul). FR, frecuencia respiratoria; PSG, presión subglótica; TI, tiempo inspiratorio; TE, tiempo espiratorio; PP, presión pleural. Se comparan los grupos de animales control vs glutamato. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Estimulación frente a Reposo.

Figura 24

Cambios cardiovasculares tras estimulación química de SGPdl



Nota: Gráficos de cajas y bigotes que muestran los cambios en los parámetros cardiovasculares (presión arterial y frecuencia cardiaca) entre los estados de reposo (caja blanca) y tras la estimulación de la SGPdl (caja azul). Se comparan los grupos de animales control vs glutamato. *** $p < 0,001$. Estimulación frente a Reposo.



DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Este trabajo de tesis doctoral nos ha permitido describir por primera vez el papel modulador de la SGPdl sobre el nA en el control central de la función laríngea, permitiéndonos mejorar, de este modo, la comprensión de los mecanismos neurofisiológicos subyacentes implicados en dicho control laríngeo.

Para ello, en una primera fase de este estudio, se ha caracterizado, en rata, la interacción morfofuncional entre estas dos regiones a través de la expresión de las proteínas c-Fos y FoxP2 en las neuronas de las distintas subdivisiones de este nA por la microestimulación eléctrica de la SGPdl. En una segunda fase, se procedió al estudio electrofisiológico de las características de la actividad neuronal del nA durante su descarga espontánea y después de la microestimulación eléctrica de la SGPdl. El estudio finaliza con un grupo de experimentación que nos ha permitido caracterizar la respuesta laríngea y cardiorrespiratoria a la estimulación eléctrica y química de la SGPdl, utilizando la variable de presión subglótica como medida de la resistencia laríngea y como indicador de los cambios en la actividad laríngea. Para ello, se ha recuperado y actualizado la técnica de “glotis aislada in situ”, la cual se había llevado a cabo en nuestro grupo de investigación en estudios realizados en perro, gato y rata (Lara et al., 1993, 2002; Dawid-Milner et al., 1988, 1993; González-Barón et al., 1978, 1979a,b, 1980; 1981; 1989).

Los resultados obtenidos en cada uno de los bloques experimentales llevados a cabo sugieren que, bajo nuestras condiciones experimentales, la SGPdl modula la actividad de las motoneuronas laríngeas localizadas dentro de la formación dispersa del nA, influyendo así en los músculos laríngeos estriados de la vía aérea superior, durante los cambios cardiorrespiratorios concomitantes evocados por la estimulación eléctrica o química de la SGPdl.

6.1. CONSIDERACIONES GENERALES

La vocalización es un proceso común en muchas especies que requiere una precisa coordinación entre respiración y fonación. Aunque la complejidad de esta vocalización varía en función de la especie, el proceso fundamental de producción del sonido, es decir, la fonación, comparte muchas similitudes (Holstege y Subramanian, 2016; Nieder y Mooney, 2020). La fonación se genera predominantemente durante la espiración, momento en el que se produce un estrechamiento de la glotis por aducción de las cuerdas vocales, mientras se espira aire simultáneamente (Zhang, 2016). Para que se produzca la vocalización es necesario que se incremente la presión en la región subglótica que se encuentra inmediatamente por debajo de las cuerdas vocales. El estrechamiento de la glotis se acompaña de un aumento de la presión subglótica. Cuando el flujo de aire supera la resistencia que ejercen las cuerdas vocales en su posición de cierre, éstas se separan y el aire pasa a través de ellas, creando la vibración necesaria para generar ondas sonoras. Es necesario, por tanto, un aumento previo de la resistencia laríngea para que se produzca la vocalización. En este contexto, las cuerdas vocales actúan como un transductor de energía, convirtiendo la energía aerodinámica proveniente de los pulmones en energía acústica. La presión subglótica está determinada tanto por el flujo de aire generado como por la fuerza con la que se contraen los músculos respiratorios, además de por el espacio glótico, es decir, con la aducción de las cuerdas vocales (Titze, 1989; Riede et al., 2020).

Por otro lado, la fonación no se produce durante la inspiración porque ésta requiere de la apertura de la región glótica, por lo que las cuerdas vocales deben estar en abducción y la presión subglótica disminuye. Además, la necesidad de inspirar suprime la vocalización, son dos actividades que no pueden suceder en el mismo momento, es decir, debemos dejar de hablar cuando necesitamos inspirar (Del Negro et al., 2018). La actividad vocal se fundamenta, por tanto, en los movimientos respiratorios, lo que implica que los circuitos centrales responsables de la respiración también forman parte de la red neuronal involucrada en la vocalización (Riede et al., 2019). Para lograr un flujo de aire óptimo que satisfaga tanto los requerimientos respiratorios como los de fonación, es esencial un control preciso de todos los músculos respiratorios, los cuales son controlados por núcleos

ubicados en el tronco del encéfalo (Jürgens, 2002a). Lo que nos falta por saber sobre la vocalización es cómo los circuitos neurales coordinan a la perfección los movimientos laríngeos con la respiración para producir el acto fonatorio y dar prioridad a las necesidades respiratorias.

La clave para entender todo este proceso es identificar, en primer lugar, las neuronas que impulsan la aducción laríngea para la vocalización y luego determinar su interacción con los circuitos respiratorios. El nRA es un área fundamental en la producción vocal. Hay estudios en los que, estimulaciones eléctricas de la SGP en gatos descerebrados (Shiba et al., 1997; Zhang et al., 1994) y ratas anestesiadas (Hartmann y Brecht, 2020) producen vocalizaciones, las cuales no aparecen cuando se lesiona el nRA. Los trazadores neurales inyectados en el nRA marcan densas proyecciones axonales hacia el nA, donde se localizan las motoneuronas laríngeas (Holstege, 1989) que son las encargadas de controlar las unidades motoras de los músculos intrínsecos de la laringe.

El nA es una columna de neuronas orientadas rostrocaudalmente y situada en la porción ventrolateral de la zona bulbar que puede dividirse en 3 regiones distintas: la formación compacta (donde se encuentran motoneuronas que inervan el esófago), la formación semicompacta (que contiene motoneuronas que inervan la faringe y el músculo cricotiroideo de la laringe) y la formación dispersa (con motoneuronas que inervan la musculatura intrínseca de la laringe, excepto el músculo cricotiroideo) (Pascual-Font et al., 2011; Hernández-Morato et al., 2013). Estas motoneuronas laríngeas que controlan la musculatura intrínseca laríngea lo hacen a través del nervio vago y se encargan de controlar la tensión, la longitud y la posición de las cuerdas vocales (Núñez-Abades et al., 1990).

En trabajos previos de nuestro grupo de investigación, se ha caracterizado la actividad de las motoneuronas laríngeas del nA y su modulación desde regiones protuberanciales (cPB y A5) y los mecanismos reflejos que intervienen en las respuestas laríngeas (Dawid-Milner et al. 1993; Lara et al. 2002). Todas estas regiones presentan expresión del factor FoxP2, factor de transcripción necesario para el óptimo desarrollo cerebral y pulmonar que está íntimamente relacionado con la vocalización. A lo largo de la evolución de la especie humana se supone que

ayudó en el incremento de la conectividad sináptica y la plasticidad en los circuitos de los ganglios basales, mejorando el control motor y las capacidades cognitivas y lingüísticas humanas (Stanic et al 2018).

Los centros respiratorios bulbotuberanciales (cPB, Área A5, NTS, nA, nRA, paraambiguo y retrofacial) integran inputs desde receptores centrales y periféricos y desde centros superiores, para producir cambios en el ritmo respiratorio básico (eupnea) que son un prerrequisito para la supervivencia. Por ejemplo, la taquipnea asociada a la reacción de defensa, que aumenta el aporte de oxígeno necesaria para la lucha o la defensa, o la respuesta de reset tipo “gasping” ante un cuadro de ansiedad intensa con alcalosis respiratoria (Dawid-Milner et al., 1995; Díaz Casares et al., 2009; López-González et al., 2013, 2020). Pero también son necesarios estos cambios en la respiración para mantener un flujo espiratorio constante que permita la vocalización. Uno de estos centros superiores es la SGP, que coordina la actividad eferente a partir de aferencias límbicas, córtico-prefrontales y cingulares (Ledoux, 2012; Koutsikou et al, 2015).

La SGP es una zona que desempeña un papel fundamental en la regulación e integración del comportamiento defensivo en mamíferos, de su respuesta autonómica y del procesamiento de estímulos dolorosos, pero también es un área implicada en la vocalización y en la integración y adaptación de la respiración a las diferentes situaciones ambientales. Todo ello gracias a sus interconexiones tanto con el encéfalo anterior como las regiones más caudales del tronco del encéfalo (Dampney, 2016). La SGP presenta gran cantidad de aferencias. Las más importantes tienen su origen desde el córtex prefrontal, amígdala e hipotálamo. Sus proyecciones eferentes hacia distintos núcleos protuberanciales le permiten coordinar diferentes patrones de respuestas cardiorrespiratorias y motoras dependientes del tipo de estímulo (Tovote et al., 2016; Trevizan-Bau et al., 2021b). Otras funciones de la sGP incluyen la termorregulación, participación en mecanismos de vigilia y sueño o la modulación del dolor neuropático o la micción (de Menezes et al 2009; Holstege, 2005; Kuner and Kuner, 2021). A nivel clínico sabemos que su actividad se modifica en distintos procesos neurodegenerativos como el Alzheimer y la atrofia multisistémica (Behbehani, 1995; Carrive, 1993; Heinricher et al., 2009; Zhang et al., 2007).

Todas estas estructuras superiores que proyectan a la sGP integran información visual, auditiva y somatosensorial en el contexto de mecanismos básicos para la supervivencia, manteniendo un tono eferente sobre la sGP, que a su vez proyecta sobre los centros respiratorios bulboprotuberanciales implicados en la ritmogénesis respiratoria, lo que permite cambiar de eupnea a un ritmo adaptado a la vocalización o al gruñido. Concretamente, el nRA es la diana perfecta para convertir la respiración pasiva en activa para generar actividades motoras que producen cambios en la presión transpulmonar, además de modificar la actividad de las motoneuronas que se localizan en el nA y que controlan el calibre de la faringe y laringe (Subramanian, 2009). Se sabe que la estimulación de la sGP y del nRA produce vocalización (Holstege et al., 1997; Shibba et al., 1997; Subramanian, 2021) y las lesiones en la sGP causan mutismo en animales y humanos (Esposito et al., 1999; Jurgens, 2009) y problemas de vocalización y de producción cuando las lesiones se producen en el nRA (Shiba et al., 1997). Sin embargo, la influencia electrofisiológica de la sGP sobre estos núcleos bulboprotuberanciales aún no ha sido descrita.

Existen, además, otras estructuras intermedias que proyectan tanto hacia corteza motora laríngea como hacia el nA. Una de estas estructuras es el cPB, citado anteriormente (Geerling et al. 2017). El registro electrofisiológico unitario demuestra la presencia de actividad neuronal durante la vocalización (Farley, 1992), lo que sugiere que este núcleo está involucrado en la coordinación motora laríngea como un núcleo intermedio de información propioceptiva entre la corteza y el nA. Además, en un trabajo muy reciente se ha demostrado que tanto en el cPB como en la SGP existe una elevada inmunoreactividad a la expresión del gen FoxP2, demostrando que ambas regiones están involucradas de manera primordial en la modulación del flujo espiratorio necesario para la producción del sonido y de la voz (Stanić et al. 2018)

La SGP dorsolateral no tiene conexiones directas con el RVLM, pero presenta conexiones muy densas, de entrada y salida, con la zona hipotalámica responsable de la activación del RVLM durante la respuesta de defensa. Sabemos que la actividad cardiorrespiratoria de las neuronas de la SGP dorsolateral depende de la actividad de esas neuronas hipotalámicas (de Menezes et al., 2009; Horiuchi

et al., 2009). Así mismo, nuestro grupo ha demostrado que existen conexiones funcionales desde esta zona hipotalámica y zonas protuberanciales como el cPB (Díaz Casares et al., 2009) y el Área A5 (López-González et al., 2013). Ambas regiones son ricas en la expresión de FoxP2.

Nuestro grupo de investigación ha puesto de manifiesto la importancia de la interrelación entre algunas estructuras hipotálamo-mesencéfalicas y zonas bulboprotuberanciales implicadas en el control cardiorrespiratorio. Más concretamente, nos hemos centrado en el análisis de esas interacciones analizando la respuesta de defensa evocada desde zonas concretas del hipotálamo (DMHPeF) (Díaz-Casares et al., 2009, 2012; López-González et al., 2013, 2018) y mesencéfalo (SGPdl) (López-González et al., 2020; González-García et al., 2023). La estimulación de estas zonas evoca una serie de cambios cardiorrespiratorios y autonómicos que son los que caracterizan la respuesta de defensa que prepara al animal para situaciones de estrés ambiental que exigen una respuesta locomotora rápida caracterizada hemodinámicamente por hipertensión, taquicardia y redistribución del flujo sanguíneo desde zonas abdominales y viscerales a los músculos esqueléticos de las extremidades. Adicionalmente, esta respuesta viene acompañada de midriasis, aumentos de frecuencia respiratoria y volumen corriente y vocalización.

Esta respuesta simpatoexcitadora está mediada por el RVLM que, a su vez, activa neuronas preganglionares simpáticas presentes en la columna intermediolateral de la médula espinal. Estas proyecciones son finalmente responsables de parte del incremento brusco de la presión arterial. Se sabe también que el aumento de presión arterial se produce por activación indirecta del RVLM por otras vías menos estudiadas (Keay y Bandler, 2001; Hayward, 2007; de Menezes et al., 2009).

Publicaciones recientes proponen las regiones del núcleo dorsomedial y zona perifornical hipotalámica (DMH-PeF) como una de las zonas principales del hipotálamo que generan la respuesta de defensa vehiculizada por la SGP (Dampney, 2015). La desinhibición del DMH-PeF tras la microinyección de bicuculina (antagonista de receptores GABA) produce un aumento en la actividad

simpática renal y la presión arterial que ha sido atribuida a la activación de neuronas en el RVLM (Fontes et al., 2001). La administración de bicuculina también produce un aumento de la frecuencia cardíaca, que disminuye entre un 30-50% por la inhibición del Rafe Pálido con muscimol (Samuels et al., 2002; Horiuchi et al., 2009). Además, existen evidencias morfológicas de proyecciones desde el DMH hacia el Rafe Pálido (Samuels et al., 2004). Los resultados parecen demostrar que la respuesta cardiovascular presora y taquicardizante, típicas del estrés, evocadas desde esta región, incluida en el DMH-PeF, presentaría dos rutas descendentes, una responsable del aumento de presión arterial, vía RVLM, y otra responsable del aumento de frecuencia cardíaca, vía Rafe Pálido. Ambas respuestas utilizan como estación intermedia la SGP (Dampney, 2015).

Por tanto, todas estas estructuras centrales descritas tienen en común el hecho de vehicular las respuestas cardiorrespiratorias ante el estrés ambiental y dar soporte a la vocalización. Estudios recientes demuestran que la microestructura laríngea y su inervación sufren los mismos cambios durante el desarrollo en roedores y humanos (Peterson et al., 2012) y que los circuitos centrales responsables de la vocalización presentan una sobreactividad en ciertos desórdenes del habla de origen central como la disfonía espasmódica debida a distonía laríngea (Mor et al., 2018)

6.2. CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS, ACTUALIZACIÓN Y APROXIMACIÓN QUIRÚRGICA

Uno de los modelos animales más utilizados en estudios relacionados con la laringe es el de rata y ratón. Además, se considera un buen modelo para el estudio de las cuerdas vocales, ya que tienen una composición similar a las del humano, pudiéndose dividir en las mismas capas y recubriéndolas una mucosa con composición similar. La dificultad de usar este tipo de modelos animales radica en el tamaño tan pequeño de una estructura como es la laringe, lo que dificulta cualquier intervención y procedimiento quirúrgico (Fernandes et al., 2022). Además, el modelo de rata es también una herramienta útil para comprender los mecanismos periféricos y centrales de la biología laríngea (Lenell et al., 2021).

En nuestro caso, todos los experimentos se han llevado a cabo en rata entera anestesiada y con respiración espontánea. Un aspecto básico de este tipo de experimentos es que se puedan reproducir lo más fielmente posible las condiciones fisiológicas, de aquí la conveniencia del empleo del animal entero. Por esta misma razón se procuró también que la administración de anestesia no causara una alteración de las variables cardiorrespiratorias que pudiera influir en el resultado del experimento. Por lo que respecta a la preparación quirúrgica previa, su propósito es que, en el transcurso del experimento, puedan efectuarse la observación y análisis de las modificaciones (producidas por la estimulación eléctrica y por las microinyecciones de fármacos) de los diversos parámetros respiratorios y cardiovasculares (frecuencia respiratoria instantánea, presión pleural, presión arterial y frecuencia cardíaca instantánea). El análisis de los cambios obtenidos en las diferentes variables proporciona una información muy completa de los efectos de la estimulación y microinyección en el animal. El trabajo con animal entero posibilita evaluar estos efectos de manera global analizando la relación entre ellos.

En esta tesis hemos dado importancia a la medición de la presión subglótica en rata anestesiada, algo que solo se ha podido llevar a cabo en el trabajo publicado por Lara et al., (2002). Anteriormente, esta misma técnica se llevó a cabo en gato (Lara et al., 1993; Dawid-Milner et al., 1988, 1993; González-Barón et al., 1980;

1981; 1989) y en perro (González-Barón et al., 1978, 1979a,b; Jimenez-Vargas et al., 1973), por ello, fue necesario llevar a cabo un estudio piloto para poner a punto la técnica quirúrgica y la calibración del nuevo material adquirido gracias a los fondos obtenidos por el Plan Propio de la UMA (PPiT UMA 2017/14) y a los derivados de la pertenencia al Grupo Consolidado CTS 156 de la Junta de Andalucía. Tras la puesta a punto, toda la nueva implementación fue puesta en práctica en los bloques experimentales de registro neuronal, estimulación eléctrica y química, he hizo posible que se pudiese llevarse a cabo un registro adecuado de todas las variables.

La adquisición, calibración y puesta a punto de todo el nuevo material adquirido nos ha permitido realizar una medición de presión subglótica más precisa en animal anestesiado. El medidor/controlador de caudal másico de gas por efecto térmico modelo Hi-Tec F-201CV-AGD-22-V (Bronkhorst) permite administrar un flujo de aire constante caliente y humidificado a través de la cánula subglótica, lo que mantiene las cuerdas vocales bajo condiciones fisiológicas. Este dispositivo permite que el nuevo espirómetro modelo FE141, $\pm 0,03$ psi (ADInstrument), con una mayor sensibilidad, pueda realizar mediciones de cambios de presión subglótica, ya que mantiene un flujo de aire constante, por lo que la diferencia de presión es directamente proporcional a los cambios en la apertura glótica o resistencia laríngea. El nuevo convertidor analógico digital modelo ML870 Powerlab 8/30 (ADInstruments) adquirido permitió el registro simultáneo de las variables, con lo que pudimos hacer correlación de las distintas variables en momentos determinados, sobre todo durante el registro neuronal, ya que se pudo comprobar la correlación entre la descarga de una neurona y su influencia sobre el flujo respiratorio, la presión arterial o la presión subglótica. Por último, el nuevo software adquirido LabChartPro (PowerLab System, ADInstruments®/ LabChart Software, versión 8.0, Sydney, Australia) nos ha permitido hacer un registro de las señales y un posterior análisis mucho más exhaustivo.

En lo que respecta a la estimulación de la SGPdI, en los experimentos en los que ha sido utilizada la microestimulación eléctrica para evocar la respuesta cardiorrespiratoria de dicha región, los parámetros de la estimulación (1 ms, 100 Hz, 30-40 μ A durante 5 s) se han elegido con el fin de obtener una respuesta lo

más fisiológica posible. Se han aplicado los parámetros de estimulación más utilizados en la bibliografía clásica (Hilton, 1982; Hilton y Redfern, 1986). Con respecto a la intensidad de estimulación, ha sido disminuida con respecto a los valores más usados en la bibliografía especializada para que la esfera de difusión de corriente sea la mínima posible, de forma que la respuesta se limite a la región de defensa. En todos los casos la intensidad ha sido suficiente para obtener la respuesta característica de la SGPdl.

Para la estimulación química de la SGPdl, se han realizado microinyecciones de Glutamato mediante un sistema de bomba microinyectora micro4TM de (WPI). Acoplada a micropipetas de vidrio Hamilton 7000.5 N para una inyección máxima de 500 nl. Se tuvo cuidado al elegir las concentraciones y volúmenes adecuados para que su efecto no se difunda a las zonas más próximas. La dosis empleada en nuestro trabajo ha sido elegida teniendo en cuenta diversas fuentes bibliográficas. Se ha utilizado siempre una dosis suficiente para producir los efectos deseados, pero sin alcanzar las regiones vecinas que puedan producir otras respuestas miméticas o antagónicas (Lipski et al., 1988). Esta técnica para la microinyección de cantidades entre 10-100 nmol, ha sido recomendada por Goodchild et al., 1982, como una técnica de activación o inhibición de regiones localizadas en el sistema nervioso central, ya que su efecto está limitado a una región altamente localizada. El glutamato se diluyó en PBS (phosphate buffer saline) con azul de Evans al 1% para el marcaje de las zonas de microinyección. Al diluir el fármaco en la mezcla de azul de Evans y PBS no es necesario retirar éste durante el experimento y evita errores en la localización histológica.

Al final de cada experimento se verificó la localización de la lesión de la estimulación eléctrica/química en los cortes histológicos. Sólo se tuvieron en cuenta aquellos animales en los que la respuesta cardiorrespiratoria se correspondía con una buena localización de la SGPdl.

6.3. INTERACCIÓN DE LA SGPdI Y EL nA: EXPERIMENTOS c-Fos/FoxP2/TH-ir

En esta tesis doctoral, nos planteamos unas hipótesis iniciales que conllevaban unos objetivos específicos asociados. Concretamente, en este primer apartado de morfología, nos planteamos:

H1: se producirá un aumento de la expresión de c-Fos (marcador de actividad neuronal) en regiones bulpoprotuberanciales (nA) que expresan FoxP2 ante la estimulación eléctrica continuada (1h) de regiones mesencefálicas (SGPdI) involucradas en el control central cardiorespiratorio y vocalización.

OI. Caracterizar, en rata, la interacción morfofuncional entre la SGPdI y el nA a través de la expresión de las proteínas c-Fos y FoxP2 en las neuronas de las distintas subdivisiones de este nA por la microestimulación eléctrica de la SGPdI.

A continuación, analizaremos cada uno de los apartados de esta sección en los que hemos demostrado y corroborado dicha hipótesis.

6.3.1. Expresión de c-Fos y doble marcaje con TH

El gen conocido como c-fos fue inicialmente descubierto a principios de la década los 80 y su producto fue caracterizado en 1984 como una proteína nuclear con propiedades de activación génica. Se le considera un gen temprano inmediato jugando un papel fundamental en los procesos a largo plazo asociados con la estimulación neuronal. La detección de su producto, la proteína c-Fos, se emplea tradicionalmente para identificar poblaciones neuronales involucradas en respuestas respiratorias específicas tanto in vivo como ex vivo (Perrin-Terrin et al., 2016).

Desde finales de la década los 80, la detección de la proteína c-Fos se ha utilizado ampliamente para investigar los efectos de factores exógenos en la transcripción génica en general y en la actividad del sistema nervioso central, lo que permite mapear las vías neuronales involucradas en diferentes condiciones fisiológicas (Dragunow y Robertson, 1987; Hunt et al., 1987; Morgan et al., 1987).

Su expresión viene determinada por los cambios en la actividad neuronal, éstos generan cascadas de señalización de segundos mensajeros que provocan la expresión del gen temprano c-fos inmediato, el cual induce la producción del factor de transcripción c-Fos. Este último inicia la expresión de genes tardíos y, por lo tanto, contribuye a las respuestas adaptativas del sistema nervioso a diversos estímulos (Herdegen y Leah, 1998). En las células nerviosas, el estímulo que induce la expresión de estos genes de expresión inmediata puede ser la excitación sináptica, el estímulo hormonal u otro estímulo que cause despolarización neuronal. Se piensa que los productos proteicos de los genes de expresión tardía están al servicio de respuestas a largo plazo que permiten a la neurona adaptarse a diferentes estímulos (Morgan y Curran, 1991; Sheng y Greenberg, 1990). La inhibición sináptica, sin embargo, no provoca la expresión de c-fos (Li y Dampney, 1994).

Entre las ventajas de este método de expresión de c-fos como marcador de activación neuronal está el hecho de que es un método que permite la identificación de la activación de neuronas individuales, en contraste con aquellos procedimientos basados en la captación de 2-desoxy-d-glucosa como un índice de actividad metabólica. Cuando los experimentos son diseñados apropiadamente, se pueden identificar poblaciones de neuronas activadas por un estímulo específico en animales conscientes, permitiendo así la creación de un esquema más concreto del patrón del efecto de un estímulo en la activación cerebral en condiciones normales. Además, bajo las condiciones experimentales apropiadas, el nivel basal de la expresión de c-fos es bajo, por lo que la proporción señal-ruido es, por regla general, relativamente alta. El método puede ser combinado con otros procedimientos, como los trazadores retrógrados o anterógrados o el marcaje inmunohistoquímico de transmisores o de enzimas relacionadas con transmisores específicos, por lo que es posible en muchos casos determinar las conexiones y las propiedades químicas de las neuronas activadas. Por último, es un método semi-cuantitativo, por lo que es posible comparar los efectos de condiciones experimentales diferentes sobre el número de neuronas activadas en una región particular del cerebro, siempre que otros factores que puedan influir en el grado de

expresión de c-fos se mantengan constantes (Dragunow y Faull, 1989; Krukoff, 1993).

La detección de c-Fos puede llevarse a cabo mediante técnicas inmunohistoquímicas o inmunofluorescencia. En la inmunodetección indirecta, se emplea un anticuerpo primario específico contra c-Fos junto con un anticuerpo secundario dirigido contra la especie en la que se generó el anticuerpo primario. En el método de inmunohistoquímica, el anticuerpo secundario se une a una enzima (como la peroxidasa) que actúa sobre un sustrato (v.g. H_2O_2 para la peroxidasa). El producto de esta reacción enzimática se revela mediante un cromógeno (por ejemplo, tetrahidrocloreto de 3,3-diaminobencidina), el cual se tiñe y puede observarse bajo un microscopio de luz. Esta reacción puede ser amplificada con sulfato de amonio níquel. Estos métodos permiten la detección de neuronas activas durante diversos desafíos fisiológicos, facilitando así la identificación y cartografía de las vías periféricas y centrales involucradas en las respuestas fisiológicas subsecuentes.

En cuanto a las limitaciones a la hora de interpretar la cartografía funcional de la base de datos de expresión de c-fos podemos encontrarnos que las neuronas difieren en su capacidad de producir c-Fos, hay neuronas que no producen c-Fos, sea cual sea el estímulo aplicado (v.g. la sustancia negra) (Dragunow y Faull, 1989) o motoneuronas somáticas en las que el comienzo de producción de Fos tarda varias horas si lo comparamos con otras neuronas (Herdegen y et al., 1991). Además, se suele necesitar una estimulación intensa y sostenida de las neuronas para que se produzca la expresión de c-fos, por lo que la ausencia de marcaje en una región concreta tras un estímulo no significa necesariamente que ninguna neurona de esa región se activó ante el estímulo específico (Dragunow y Faull, 1989; Li y Dampney, 1995). A pesar de estas limitaciones, se sabe que el c-Fos es el marcador más eficaz de activación neuronal bajo una gran variedad de condiciones experimentales (Lanteri-Minet et al., 1994).

En nuestro estudio, el bloque experimental cuenta con un total de diez animales, cinco de los cuales se han utilizado como control. En todos ellos se realizó la cirugía mencionada en el apartado 4.2. *Preparación quirúrgica,*

exceptuando la técnica de “glotis aislada in situ” ya que no era necesaria en este bloque experimental.

Una vez posicionado el animal estereotáxicamente, y tras la realización de una parietostomía posterior para introducir el microelectrodo en la zona de la SGPdl (4,0 mm caudal al bregma, 0,6 lateral a la línea media y 4,5 a 5 mm de profundidad desde la superficie de la calota; aproximándose con un ángulo de 30°) (Paxinos y Watson, 2007), se procedió a la estimulación eléctrica de cinco de los animales tal y como se describe en el apartado de 4.8. *Protocolo neuromorfológico*. En el grupo control (n=5), se les introdujo el microelectrodo en la misma zona, pero sin llevar a cabo la estimulación eléctrica. Posteriormente fueron sacrificados y perfundidos para un posterior procesamiento de las muestras para una doble tinción c-Fos-TH en *free floating* sobre secciones coronales de 30 µm utilizando un microtomo de congelación.

Los somas de las motoneuronas responsables de la inervación de los músculos intrínsecos de la laringe están situados dentro del nA, un área que comprende neuronas orientadas en dirección rostrocaudal y que se sitúa en la región ventrolateral del bulbo raquídeo. Su extensión espacial ocupa desde el núcleo motor del nervio facial hasta, al menos, a nivel de la decusación piramidal (Bieger y Hopkins, 1987). Se seleccionaron cortes cada 180 µm en un muestreo sistemático y aleatorio tomando como referencia la división del nA en tres dominios principales: (1) la formación compacta, con motoneuronas que inervan el esófago; (2) la formación semicompacta, con motoneuronas que inervan la faringe y el músculo cricotiroideo de la laringe, es decir, el que está inervado por el nervio laríngeo superior; y (3) la formación dispersa (o laxa), con motoneuronas que inervan los músculos laríngeos excepto el cricotiroideo. Por lo tanto, se acepta que las neuronas laríngeas se encuentran en la parte caudal del nA (formación semicompacta y dispersa). Así, el nA, además de inervar los músculos laríngeos, también proporciona inervación motora al esófago y la faringe (Hernandez-Morato et al., 2013; Pascual-Font et al., 2011; Weissbrod et al., 2011).

Varios estudios han usado el método de expresión de c-fos en rata para mapear de manera sistemática poblaciones de neuronas en el bulbo y en regiones

suprabulbares que se activan por un periodo de hipertensión o hipotensión (Chan y Sawchenko, 1994, 1998; Graham et al., 1995; Grindstaff et al., 2000; Petrov et al., 1995; Tassorelli y Joseph, 1995) o conejo (Li y Dampney, 1992, 1994). En ambas especies, hipertensión e hipotensión inducen un patrón consecuente y específico de expresión de c-fos en bulbo y protuberancia aunque los patrones de distribución y las características químicas de las neuronas que presentan marcaje por c-fos por estos estímulos era significativamente diferente entre ellas. Para prevenir la expresión secundaria de c-Fos resultante de las alteraciones en la presión arterial por la estimulación de la SGPdl, se administró guanetidina, un agente simpaticolítico, en todos los animales del grupo experimental (n=10).

Tras analizar los resultados de este grupo experimental podemos afirmar que, tras bloquear las respuestas cardiovasculares mediante la administración de guanetidina, pudimos constatar que, tras la estimulación eléctrica de la SGPdl, el nA presentó un mayor marcaje o expresión de la proteína c-Fos ipsilateral en los tres dominios principales que lo componen. Con respecto al aumento en la expresión de c-Fos-ir entre el lado ipsilateral y contralateral, por otro lado, al comparar las diferencias entre el grupo estimulado y el grupo control, solo aparecen diferencias significativas en la formación compacta y dispersa. Parece probable, por tanto, que ambas poblaciones neuronales del nA se activen, directa o indirectamente, desde la SGPdl y no secundariamente a cambios en la presión arterial provocados por la estimulación eléctrica de esta región mesencefálica. Esto sugiere que la SGPdl podría tener un posible papel modulador en los movimientos de apertura y cierre glótico producidos por la activación de la musculatura intrínseca inervada por las motoneuronas laríngeas de la formación dispersa del nA. Esta modulación de la resistencia laríngea durante la clásica respuesta de defensa vehiculizada por la SGPdl podría participar en, o modular, las clásicas vocalizaciones innatas presentes en esta respuesta ante un peligro.

6.3.2. Expresión de FoxP2 y doble marcaje con TH

FoxP2 (Forkhead box protein P2) es un factor de transcripción fundamental para el desarrollo del cerebro que está muy relacionado con la respiración y la vocalización. El gen foxP2 es el primero que se ha descubierto relacionado

claramente con el desarrollo del habla y del lenguaje. Este descubrimiento fue posible gracias a la familia KE, en la que sus quince miembros presentaban un trastorno grave del habla y el lenguaje que se heredaba de manera dominante (Lai et al, 2001). Todos ellos eran portadores de una mutación heterocigótica sin sentido que produce una sustitución de arginina por histidina (R553H), lo que afecta a la estructura de la proteína FoxP2 y altera su función. Esta alteración se relaciona con problemas en el desarrollo del lenguaje, en dificultades en la coordinación motora orofacial, en la producción del sonido e, incluso, en la comprensión del lenguaje (Morgan et al., 2016). Desde su descubrimiento, se han descrito otros trastornos del habla y el lenguaje relacionados también con este gen y que son tanto hereditarios como de novo (MacDermot et al., 2005; Feuk et al., 2006; Reuter et al., 2017).

Aunque la proteína FoxP2 se expresa en varios tejidos corporales durante el desarrollo (pulmonar, nervioso, cardiovascular e intestinal), tiene una presencia particularmente fuerte en regiones cerebrales implicadas en la función cognitiva, en el aprendizaje, la producción y la comprensión del lenguaje (Nudel y Newbury, 2013; Shu et al., 2001). También se ha descrito una elevada expresión de la proteína FoxP2 en las regiones SGP, cPB y A5 (Stanic et al., 2018).

Estudios en modelos animales que producen vocalizaciones (v.g. ratones o aves), han demostrado que el factor de transcripción FoxP2 (Forkhead box protein P2) está implicado en la adquisición de las habilidades motoras finas necesarias para la producción de vocalizaciones específicas de cada especie. Estos estudios muestran que FoxP2 tiene un papel altamente conservado a través de la evolución en el desarrollo del lenguaje en estas especies, particularmente en los mamíferos (Schulz et al., 2010; Shu et al., 2005; Haesler et al., 2004, 2007).

Los ratones que carecen de ambos alelos de Foxp2 presentan graves deficiencias motoras, retrasos en el desarrollo y, por lo general, mueren en el día 21 postnatal (Shu et al., 2005), mientras que los animales heterocigotos no muestran diferencias evidentes, pero sí muestran comportamientos vocales alterados (Castellucci et al., 2016), produciendo secuencias más cortas de

vocalizaciones ultrasónicas y con una sintaxis menos compleja (Chabout et al., 2016)

En cuanto a la evolución del gen foxP2 se sabe que, tras la separación del linaje humano del chimpancé, se produjeron 2 sustituciones de nucleótidos en las posiciones 911 y 977 del exón 7 de este gen foxP2, generando un cambio de los residuos treonina por ácido aspártico y arginina por serina, respectivamente, en la proteína FoxP2 (T303N y N325S) (Enard et al., 2002). Estas mutaciones aparecieron y se fijaron en las poblaciones humanas durante seis millones de años, con una tasa de evolución más acelerada de lo normal si se tiene en cuenta la conservación del resto de la proteína. Todo ello se produjo, además, en un momento en el que apareció el lenguaje oral como forma de comunicación en la especie humana y es un gen que no ha experimentado cambios en la secuencia de nucleótidos en la evolución humana reciente, por lo que la proteína FoxP2 es común a humanos modernos y Neandertales (Krause et al, 2007).

Los estudios moleculares sobre las funciones de FoxP2 que se han llevado a cabo en los últimos veinte años han demostrado que esta proteína pertenece a una red extensa de productos moleculares como factores de transcripción y coreguladores expresados en el cerebro. Esta proteína está implicada en la diferenciación neuronal, en el crecimiento de neuritas y en la migración celular. A pesar de todo lo que se ha descubierto sobre FoxP2, aún queda mucho por aprender sobre sus capacidades reguladoras, su posición en las vías moleculares, su papel en las funciones celulares y, en última instancia, sus efectos en el desarrollo cerebral y en las capacidades humanas del habla y el lenguaje (den Hoed et al., 2021).

Al analizar la expresión de este gen en las diferentes regiones del nA, se ha comprobado que presenta expresión en toda la extensión del nA, pero es mucho más profusa en la formación sempicompacta y dispersa. Ambas regiones están involucradas en la regulación de presión subglótica ya que, la primera de ellas, contiene motoneuronas que inervan al músculo cricotiroides, músculo implicado en la modulación de la tensión de las cuerdas vocales durante la fonación, mientras que la formación dispersa, por su parte, contiene motoneuronas que inervan la

musculatura intrínseca de la laringe (excepto el músculo cricotiroides) (Lungovaa y Thibeault, 2020). Las neuronas de ambas regiones del nA tienen, por tanto, un papel fundamental en la producción de patrones motores laríngeos y respiratorios que son necesarios para una correcta producción de vocalizaciones.

Basándonos en estudios previos realizados en esta zona de estudio (Pascual-Font et al., 2011) en la que contabilizan el número de neuronas marcadas por trazadores retrógrados tanto en la región semicompacta como en la dispersa, podemos confirmar que la expresión de este factor de transcripción coincide con dichos estudios y que, por tanto, podemos afirmar que es una característica más que una expresión de actividad celular, ya que los niveles de expresión de FoxP2 no se modificaron en las ratas que recibieron la estimulación eléctrica de la SGPdl. Tiene sentido que una región que está involucrada en el control laríngeo presente expresión elevada de FoxP2, factor de transcripción muy ligado a la vocalización en mamíferos.

6.3.3. Doble marcaje inmunofluorescente c-Fos/FoxP2

Una vez comprobamos que, de las dos regiones que contienen motoneuronas laríngeas, era la región dispersa del nA la única que respondía a la estimulación eléctrica de la SGPdl aumentando su actividad neuronal, procedimos a contabilizar el porcentaje de neuronas que, presentando expresión de FoxP2, también coexpresaban c-Fos. Para ello realizamos un doble marcaje inmunofluorescente tras la estimulación eléctrica de la SGPdl con el mismo protocolo que con la inmunohistoquímica. Pudimos observar que, como sucedía en los resultados del apartado anterior, 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.

Lo que aporta este tercer análisis con inmunofluorescencia es que podemos confirmar que la coexpresión de ambos marcadores se mantiene constante en los animales control (26,2% y 21,3% ipsilateral y contralateral respectivamente), mientras que aumentaba en la zona ipsilateral (36,9%) de manera significativa

respecto a la contralateral (25,7%) en los animales estimulados. Al medir las diferencias entre grupos (control vs estimulados) entre dichos cambios (ipsilateral vs contralateral) también existen diferencias significativas, confirmando que la estimulación de la SGPdl produce un aumento de la expresión de c-Fos en neuronas de la región dispersa del núcleo ambiguo que expresan FoxP2. Este dato confirmaría que la SGPdl modifica directa o indirectamente la actividad de motoneuronas laríngeas que expresan FoxP2, otorgándole un papel modulador en los procesos de vocalización del animal durante la respuesta de defensa evocada desde dicha región mesencefálica.

6.4. REGISTRO NEURONAL

En esta sección de la tesis doctoral, nos planteamos la siguiente hipótesis y objetivo específico:

H2: el registro unitario extracelular del nA durante la estimulación eléctrica de la SGPdl permitirá demostrar cómo la SGPdl modifica la actividad de las motoneuronas laríngeas del nA.

OII. Caracterizar la actividad neuronal del nA mediante el registro neuronal unitario extracelular “in vivo” en reposo y después de la microestimulación eléctrica de la SGPdl.

Una vez comprobada la posible relación entre la SGPdl y el núcleo ambiguo (formación compacta y formación dispersa) mediante la expresión de c-Fos, quisimos ver si había relación electrofisiológica entre ambas zonas, para lo cual realizamos el registro de la actividad eléctrica unitaria de motoneuronas localizadas en la formación dispersa del nA. Las coordenadas donde se realizaron los distintos experimentos de registro intentaron abarcar toda la estructura funcional de dicha región relacionada con la actividad de la musculatura intrínseca laríngea, además de incluir también las regiones con función cardiorrespiratoria que la rodean (GRVr, A1/C1, CVLM).

Por lo anterior, se hizo un amplio barrido intentando caracterizar el mayor número de neuronas dentro de cada una de ellas. Para ello se barrió un área comprendida entre -13,50 mm posterior a Bregma hasta -14,20 mm posterior a Bregma en sentido rostro caudal y entre los 1,5 y 2,5 mm lateral a la línea media para dicha región. La profundidad varía entre 1,5 y 2,5 mm con respecto a superficie cerebral. Los datos de posición anteriormente citados se han referenciado según el atlas Paxinos (2007) para un mejor análisis. Estas coordenadas han sido adaptadas para cada experimento ya que originalmente siempre tomábamos la posición del obex como referencia para situarnos en el punto de coordenadas (0,0). El obex está situado en la lámina o figura 153 de dicho atlas, con referencia a Bregma de -14,40 mm.

Para certificar que las neuronas registradas se localizaban en la región de estudio, inmediatamente después de finalizar el experimento se hacía pasar por el electrodo de registro una corriente de 250 μ A durante 20 s para microcoagular el tejido y facilitar su posterior localización por técnicas histológicas. Usando de referencia el punto estereotáxico de microcoagulación podemos deducir el resto de puntos de registro que se realizaron en cada experimento. Todos los registros incluidos en el estudio se encontraban dentro de las regiones descritas.

Se estudió electrofisiológicamente las características de la actividad unitaria de neuronas de las regiones de estudio durante su descarga espontánea y durante la estimulación de la SGPdI. De todas las neuronas registradas, hicimos distintas agrupaciones teniendo en cuenta la descarga espontánea, profundidad y si dicha descarga se acoplaba a la función cardiovascular o respiratoria (análisis comparativo de la descarga mediante Histograma de frecuencia). Teniendo en cuenta que en dichas regiones podemos encontrar 3 zonas funcionalmente solapadas (neuronas respiratorias del núcleo ambiguo, neuronas del GRVr, y neuronas cardiovasculares de los grupos A1/C1 y CVLM), hemos intentado agruparlas atendiendo a la ubicación de esas zonas y el tipo de descarga que obteníamos.

En total, hemos registrado la actividad de 160 neuronas de dichas regiones. 4 fueron descartadas por una profundidad inadecuada, revelada por el estudio histológico, o por la inestabilidad del registro debido a movimientos del tejido secundarios a la actividad respiratoria o de la presión arterial.

De los 154 restantes todas, menos una que se demostró silente, presentaban la actividad espontánea típica de las neuronas de esta zona con una frecuencia de descarga variable que concuerda con los datos obtenidos por otros autores y por nuestro grupo de investigación en estudios anteriores (Moraes y Machado, 2015; Dawid-Milner et al., 1993, 1995).

Del total de neuronas registradas, el 36% tenían patrón respiratorio. Concretamente hemos establecido 4 patrones diferentes, que concuerdan por posición estereotáxica con la posición clásica de neuronas inspiratorias laríngeas (13% del total, con patrón de descarga decreciente), neuronas inspiratorias del

GRVr (9%, con patrón de descarga creciente), neuronas espiratorias laríngeas E1 y E2 (9 y 4% respectivamente).

De todas estas neuronas con patrón respiratorio, hemos de destacar que un alto porcentaje de ellas veían afectada su frecuencia de descarga en reposo tras la estimulación de la SGPdl. Presentaban tanto aumentos como disminuciones de actividad. El grupo que más veía afectada dicha actividad fue el de las motoneuronas laríngeas, tanto las inspiratorias (76%) como las espiratorias (67 y 86% respectivamente). Concordando estos datos con los obtenidos por medio del estudio morfológico en los que se obtuvo un aumento de la actividad de esta región del nA.

Precisamente el grupo de neuronas espiratorias es el que presentaba un mayor número de tipos de modificaciones de actividad. En dicho grupo (E1 y E2) hemos detectado inhibiciones en la descarga tras estímulo de la SGPdl (6 casos y 2 casos respectivamente), activaciones de latencia constante (1 y 3) y excitaciones de latencia corta (3 y 1). Esto confirma la importancia de las proyecciones entre ambas regiones, ilustrando la gran complejidad de conexiones sinápticas que existen en esta zona.

Con respecto a las neuronas registradas en regiones adyacentes a la formación dispersa del nA, hemos registrado neuronas inspiratorias del GRVr (9%) y de la zona cardiovascular del A1/C1-CVLM (27,5%). Por otro lado, hemos registrado también un gran número de neuronas con actividad espontánea que no poseían un patrón de descarga cardiorrespiratorio claro (34%) pero que por posición estereotáctica se sitúan entre el GRVr y las neuronas cardiovasculares A1/C1. De estos tres grupos neuronales, son las neuronas cardiovasculares y las no moduladas cardiorrespiratoriamente las más afectadas por la actividad de la SGPdl (52% y 46% respectivamente). 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. Por ejemplo, en el grupo de neuronas cardiovasculares, encontramos un gran número de inhibiciones postestímulo, muchas de ellas presentando una activación postestímulo de latencia corta. Eso significa que existe conexión (polisináptica seguramente) desde la

SGPdl que genera dicha activación, pero que el resultado final resulta en una inhibición prolongada de dichas neuronas cardiovasculares. Teniendo en cuenta que esos grupos neuronales (CVLM) suelen ser inhibidos en la respuesta de defensa del animal para el mantenimiento de una presión arterial elevada (inhibición del reflejo baroreceptor a nivel del NTS), tiene sentido el elevado nivel de inhibiciones en la zona.

Con respecto al grupo de neuronas que no presentan modulación cardiorrespiratoria, también ven muy modificada su actividad. Presentan un elevado nivel de inhibiciones (22%) y de activaciones (11%), presentando también todas esas activaciones una inhibición posterior de la actividad neuronal. Este grupo neuronal, ubicado entre las neuronas del GRVr y las cardiovasculares, podría representar un grupo de neuronas de interconexión, o interneuronas, entre las zonas cardiorrespiratorias antes descritas, que permitirían una correcta integración de la información aferente que recibe toda esta región.

Sólo hemos podido registrar una neurona silente, es decir, que presentaba activación desde la SGPdl, pero no tenía actividad espontánea en reposo. Pensamos que se trata de una activación ortodrómica desde la SGPdl, debido a las características que presenta. No presenta latencia constante, por lo que podría representar una conexión polisináptica proveniente desde centros superiores.

Con todos estos datos hemos mostrado las primeras evidencias electrofisiológicas de interacción entre las neuronas de la SGPdl y distintas regiones del núcleo ambiguo y retroambiguo. Al corroborar la posible existencia de conexiones directas e indirectas entre estas zonas hemos puesto de manifiesto la estrecha relación funcional entre ellas. Para adentrarnos más en esta relación, realizamos experimentos farmacológicos que nos han permitido ver qué posible papel tienen las motoneuronas laríngeas en el control de la presión subglóticas durante la respuesta cardiorrespiratoria evocada desde la SGPdl.

6.5. INTERACCIÓN DE LA SGPdI Y EL nA: EXPERIMENTOS CON ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA/QUÍMICA Y PRESIÓN SUBGLÓTICA

En esta última sección de esta tesis doctoral nos planteamos inicialmente la siguiente hipótesis y objetivos específicos:

H3: la microestimulación eléctrica y química de la SGPAdI modificará los niveles de presión subglótica y, consecuentemente, la actividad de las motoneuronas laríngeas.

OIIIa. Recuperar y actualizar la técnica de “glotis aislada in situ”, ya descrita y utilizada por nuestro grupo de investigación, para realizar mediciones de presión subglótica y resistencia laríngea, utilizando esta variable como indicador de la actividad laríngea.

OIIIb. Caracterizar, en rata, la respuesta laríngea y cardiorrespiratoria a la estimulación eléctrica y química de la SGPdI, utilizando la variable de presión subglótica como indicador de los cambios en la actividad laríngea.

Para abordarlos, tenemos que saber que la estimulación de la SGP revela que las distintas columnas que conforman esta área coordinan diferentes tipos de respuestas en función del estímulo (Bandler et al., 2000; Carrive, 1993; Faull et al., 2019; Linnman et al., 2012), permitiendo la modulación de una respuesta autonómica dependiente del tipo de estrés y de la percepción subjetiva del individuo ante una amenaza o estímulo estresante. Para ello, la SGP presenta numerosas proyecciones en forma de aferencias y eferencias. Las aferencias más importantes tienen su origen en la corteza prefrontal, la amígdala y el hipotálamo (Evans et al., 2018; Koutsikou et al., 2015; LeDoux, 2012; Singh et al., 2022; Tovote, 2016; Trevizan-Baú et al., 2021). La SGP, a su vez, proyecta a los núcleos cardiorrespiratorios pontomedulares implicados en la ritmogénesis cardiorrespiratoria que permite el desarrollo de diferentes patrones de respuestas cardiorrespiratorias y motoras en función del tipo de estímulo (Faull et al., 2019; González-García et al., 2023; Krohn et al., 2023; Kuner y Kuner, 2021). En concreto, la SGPdI controla las respuestas conductuales de lucha/huida,

hemodinámicamente por hipertensión, taquicardia y redistribución del flujo sanguíneo desde la zona abdominal y visceral hacia los músculos esqueléticos de las extremidades. Además, la respuesta va acompañada de midriasis, taquipnea, aumento del volumen corriente y vocalizaciones. Esto permite al animal hacer frente a situaciones de estrés ambiental que requieren una respuesta rápida (López-González et al., 2020; Motta et al., 2017; Trevizan-Bau et al., 2021; Geraldés et al., 2023). Otras funciones de la SGP incluyen la termorregulación, la participación en los mecanismos de vigilia y sueño, o la modulación del dolor neuropático o de la micción (de Menezes et al., 2009; Holstege, 2005; Kuner y Kuner, 2021). A nivel clínico, su actividad se ve modificada en diferentes procesos neurodegenerativos como el Alzheimer y la atrofia multisistémica (Benarroch et al., 2010; Parvizi et al., 2000).

Además, la SGP es un área que tiene una fuerte conexión con el GRVc, región que contiene premotoneuronas que regulan la actividad de áreas motoras involucradas en la vocalización (Jürgens, 2002a; Subramanian et al., 2021). De esta manera, se ha demostrado de estimulaciones químicas de la SGP (lateral y ventral) producen vocalizaciones en gatos (Subramanian y Holstege, 2014), monos (Jürgens, 2009), aves (Schmidt y Wild, 2014) y humanos (Holstege y Subramanian, 2016).

Existen estudios centrados en dilucidar el papel de la SGP, no sólo en las respuestas cardiorrespiratorias, sino en analizar su participación en funciones tan importantes como la vocalización o el habla. Los cambios en el ritmo respiratorio básico son un prerequisite para la supervivencia, pero también son necesarios para que se produzca dicha vocalización. Por otro lado, se sabe que la abducción y aducción de los pliegues vocales son llevadas a cabo por dos poblaciones distintas de motoneuronas situadas dentro del tercio caudal del nA (Pascual-Font et al., 2011). Estos cambios en la apertura en los pliegues vocales permiten usar la variable de presión subglótica como indicativo de cambios en la resistencia laríngea. En trabajos previos del grupo de investigación se ha caracterizado la actividad de las motoneuronas laríngeas del nA y los mecanismos reflejos que intervienen en las respuestas laríngeas respiratorias (Dawid-Milner et al. 1993; Lara et al. 2002). En esta tesis doctoral hemos recuperado una técnica utilizada por

nuestro equipo de trabajo hasta el año 2002 en rata, gato y perro (González-Barón et al. 1978, 1979a, 1979b, 1980, 1981; Dawid-Milner et al., 1988, 1995, 2001; Lara et al., 1993, 2002; Jimenez-Vargas et al., 1988), técnica de glotis aislada *in situ*, que nos ha permitido realizar mediciones en la presión subglótica, variable fundamental en nuestro estudio.

La mayoría de los roedores, además de las vocalizaciones audibles, disponen de una estructura anatómica que les permite generar vocalizaciones ultrasónicas para su comunicación (Brudzynski y Maldonado, 2018; Dent et al., 2018). Estas vocalizaciones ultrasónicas son silbidos producidos durante la fase de espiración y requieren el control tanto de la respiración como de los movimientos laríngeos (Riede, 2017). Estos movimientos deben ser controlados para mantener una presión subglótica adecuada dentro de unos límites estrechos (Riede, 2013) ya que esa presión es fundamental para controlar el inicio, el desplazamiento y la intensidad de la vocalización. El flujo de aire pasa a través de la glotis y luego se dirige hacia la bolsa ventral, un pequeño saco de aire del que disponen los roedores. Se genera entonces un silbido ultrasónico cuando se genera una fluctuación del flujo de aire por la interacción entre ese flujo de aire y la cavidad de la bolsa ventral (Riede et al. 2017). La presión subglótica es, por tanto, un buen indicador de los movimientos respiratorios y, a su vez, una variable clave en la producción vocal (Titze, 1988). Esta variable viene determinada por la fuerza con la que se contraen los músculos respiratorios, cuando se expanden y comprimen, y por el tamaño de la glotis, la cual está controlada la musculatura intrínseca de la laringe.

Riede et al., (2013) ha podido llevar a cabo una medición de presión subglótica en animal despierto al realizar una doble canulación de la tráquea, lo cual permitía a la rata recuperarse de la anestesia y poder realizar una medición de presión subglótica bajo diferentes condiciones. Con nuestra técnica de glotis aislada *in situ*, y al hacer todo el experimento con animal anestesiado por las características de nuestra cirugía, hemos podido descartar que los cambios de presión subglótica sean debidos a la contracción o relajación de los músculos respiratorios, ya que hemos aislado la vía aérea en dirección caudal. De esta manera, cualquier cambio en nuestra medición de presión subglótica y en la

resistencia laríngea podría ser debido a la acción de la musculatura intrínseca de la laringe, la cual controla toda la zona de la glotis (Riede, 2013). Además, también descartamos posibles influencias de estructuras orofaciales (incluyendo la lengua) ya que dejábamos abierta la boca del animal y fijábamos la lengua, impidiendo que afectara a los cambios de presión subglótica medidos.

6.5.1. Efecto de la estimulación eléctrica en la SGPdl sobre la presión subglótica

La SGP ha sido un área estudiada mediante la estimulación eléctrica y química para localizar las regiones que inician o integran los componentes viscerales y de conducta que son característicos de la respuesta de defensa descrita por Hilton y Redfern (1986). Esta respuesta se caracteriza cardiovascularmente por un aumento de presión arterial y frecuencia cardiaca, así como redistribución del flujo sanguíneo hacia las extremidades. En cuanto al componente respiratorio, se caracteriza por un incremento de la frecuencia respiratoria por disminución del tiempo espiratorio. Además, va acompañada de dilatación pupilar, retracción de la membrana nictitante, piloerección y liberación de catecolaminas por parte de la glándula suprarrenal (González-García et al., 2023). Con los experimentos realizados hasta día de hoy se ha podido comprobar que son la SGPI y SGPdl las que inician concretamente esta respuesta de defensa dentro de la SGP (de Menezes, 2009). La respiración es vital para la supervivencia. Dado que la respiración y la vocalización se producen en las vías respiratorias, el cierre laríngeo para la producción de sonidos debe controlarse con precisión y coordinarse con la respiración. Un fallo en esta coordinación podría provocar disfunciones en las cuerdas vocales y problemas respiratorios (Christopher et al., 1983; Hintze et al., 2017).

En este bloque experimental nos planteamos un grupo inicial de experimentos en los que la estimulación eléctrica se utilizó principalmente para localizar la zona de la SGPdl gracias a su respuesta de defensa característica. Además, pudimos también estudiar los cambios en la presión subglótica durante esta estimulación, los cuales están relacionados con los cambios en la resistencia laríngea y, por tanto, con la apertura y cierre de las cuerdas vocales.

Los resultados de este grupo experimental confirman que la estimulación eléctrica de la SGPdl evoca una respuesta de taquipnea, taquicardia e hipertensión ya caracterizada por nuestro grupo de investigación en trabajos anteriores (López-González et al., 2020; González García et al., 2023). A nivel respiratorio, al estimular la SGPdl, se produce un aumento de la frecuencia respiratoria debido a una disminución del tiempo espiratorio y del tiempo inspiratorio. Esta disminución del tiempo espiratorio se acompañó de un aumento del flujo espiratorio y también pudimos comprobar que se produjo un aumento de la actividad frénica (medición indirecta de la presión pleural y del flujo inspiratorio), lo que provocó un aumento del flujo inspiratorio.

A esta respuesta cardiorrespiratoria podemos añadir ahora una disminución de la resistencia laríngea medida como presión subglótica. La dilatación glótica durante la respuesta inspiratoria facilita los movimientos respiratorios gracias a la disminución de la resistencia de las vías respiratorias superiores. Estos hallazgos sugieren la implicación de esta región mesencefálica en la regulación de la actividad laríngea.

No se han tenido en cuenta en los resultados de este trabajo aquellos animales en los que no se producía la típica respuesta de defensa, lo que se relacionó con que la estimulación se estaba administrando en una región diferente a la SGPdl.

6.5.2. Efecto de la estimulación química en la SGPdl sobre la presión subglótica

Dentro de este bloque experimental, en un segundo grupo de animales, se procedió a la microestimulación química con glutamato de esta misma región mesencefálica. Mientras que los efectos de la estimulación eléctrica son difíciles de interpretar ya que afectan tanto a fibras de paso como a cuerpos celulares ubicados en la zona de estimulación, podemos afirmar que los efectos de la microinyección de glutamato sobre las variables cardiorrespiratorias registradas pueden atribuirse a la activación de cuerpos celulares situados en esta región de la SGPdl, y no son debidos a la activación de axones de paso. La elección del glutamato como método

para generar la estimulación de las neuronas de la SGPdl frente a otros como el ácido homocisteínico o la desinhibición con bicuculina, tiene su explicación por ser un método que ya hemos utilizado anteriormente (Dawid-Milner et al., 2001, 2003; Lara et al., 2002) y con el que hemos obtenido resultados fiables.

La estimulación química con glutamato produjo, al igual que ocurría en el grupo experimental de estimulación eléctrica, una respuesta simpatoexcitatoria caracterizada cardiovascularmente por hipertensión y taquicardia, mientras que, a nivel respiratorio, produjo taquipnea por disminución del tiempo espiratorio e inspiratorio, lo que se acompañó también con aumento de presión pleural y una disminución de la presión subglótica. Al igual que en el caso de la estimulación eléctrica, la estimulación química produjo un cambio similar en la magnitud de los cambios cardiorrespiratorios y laríngeos, exceptuando el incremento de presión arterial que, aunque significativo, fue de menor intensidad en el caso de la estimulación química.

De esta manera, por un lado, nuestras observaciones amplían y corroboran los resultados obtenidos en trabajos anteriores (López-González et al., 2020; González-García et al., 2023) en los que habíamos aplicado únicamente estimulación eléctrica sobre la SGPdl. Ahora podemos afirmar sin ningún tipo de duda que los somas neuronales de la SGPdl evocan la respuesta cardiorrespiratoria de defensa típica de esta región mesencefálica, además de poder sugerir que la SGPdl, no solo modula la respuesta de defensa característica del animal ante una situación de estrés ambiental, sino que puede desempeñar un papel en la modulación de la actividad laríngea en esas condiciones.

Esta respuesta cardiorrespiratoria característica de la SGPdl se sustenta en una serie de conexiones que mantiene con centros bulbopontinos. Se sobreentiende que la respuesta de aumento de frecuencia cardíaca y de presión arterial tiene como función principal el mantenimiento de una perfusión adecuada del músculo cardíaco y del sistema nervioso central, además de zonas que requieren un aporte de oxígeno adicional en estas situaciones de estrés medioambiental o situaciones de amenaza, de ahí que se acompañe también de

un aumento de la ventilación que asegure una adecuada oxigenación de la sangre arterial y facilite la eliminación de CO₂ metabólico (Loewy, 1991)

El incremento brusco de la presión arterial se debe a la actividad de las neuronas preganglionares simpáticas de la columna intermediolateral de la médula espinal. Dichas neuronas son activadas directamente desde el bulbo rostral ventrolateral (RVLM). Aunque la SGPdl no posee conexiones directas a dicho RVLM sí que posee conexiones con centros hipotalámicos (DMH-PeF) y protuberanciales (cPB y A5) que sí podrían modificar la actividad de estas neuronas de manera indirecta (Hayward, 2007; de Menezes et al., 2009; López-González et al., 2020). La inhibición o el cambio de la sensibilidad del umbral de activación del reflejo baroreceptor junto a la facilitación del reflejo quimiorreceptor a nivel del NTS son los mecanismos responsables del mantenimiento de la respuesta presora, taquicardizante y taquipnéica evocada desde la SGPdl (Silva-Carvalho et al., 1995; McDowall et al., 2006; Miki y Yoshimoto, 2010).

La disminución de la presión subglótica obtenida en nuestras condiciones experimentales sugiere que la SGPdl, a través de conexiones directas e indirectas con núcleos respiratorios pontinos (PBc/KF, A5) y medulares (nRA, nA), disminuye la resistencia laríngea. Podemos hipotetizar que los mecanismos respiratorios centrales que se activan durante la taquipnea evocada por la respuesta de defensa, anulan cualquier posible aumento de la actividad aductora laríngea que cabría esperar si el animal tuviera la intención de vocalizar, favoreciendo por tanto una disminución de la resistencia laríngea durante la taquipnea. En una publicación reciente (Park et al., 2024) se describe cómo la SGP podría actuar sobre centros inferiores a la hora de dar prioridad a la inspiración durante situaciones de estrés ambiental, modificando la actividad del complejo preBötzing y del nRA, respectivamente.

Así pues, a modo de resumen final, podemos afirmar que la SGPdl desempeña un papel importante en el cambio de la actividad de las motoneuronas laríngeas localizadas en el nA y, en consecuencia, de los músculos laríngeos estriados de la vía aérea superior durante la respuesta de defensa. Se necesitan trabajos futuros para poder dilucidar si la SGPdl podría modificar el aumento de la

actividad de las neuronas laríngeas inspiratorias y reducir la actividad de las espiratorias para facilitar la respuesta taquipnéica evocada durante la respuesta de defensa evocada a partir de la estimulación de la SGPdI.

CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS



7. CONCLUSIONES

1. La microestimulación eléctrica de la Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral induce un aumento significativo de la actividad neuronal ipsilateral a la estimulación, medida como expresión de la proteína c-Fos, en las regiones compacta y dispersa del núcleo Ambiguo.
2. Confirmamos la expresión del factor de transcripción FoxP2 en todas las divisiones del núcleo ambiguo, siendo más elevada en las regiones semicompacta y dispersa, directamente relacionadas con el control laríngeo. Dicha expresión no se ve afectada por la microestimulación eléctrica de la Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral.
3. Las motoneuronas de la región dispersa del núcleo ambiguo aumentan significativamente la co-expresión de c-Fos/FoxP2 tras la microestimulación eléctrica de la Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral.
4. El registro de la actividad eléctrica unitaria de neuronas localizadas en la región del núcleo ambiguo y zonas adyacentes durante la microestimulación de la Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral nos permitió caracterizar hasta 6 grupos neuronales diferentes: inspiratorias decrecientes, inspiratorias crecientes, espiratorias E1, espiratorias E2, cardiovasculares y no moduladas.
5. Todos los grupos neuronales registrados modificaban su actividad ante la estimulación eléctrica de la Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral. Además, la existencia de activaciones y excitaciones de latencia corta, facilitaciones, disfacilitaciones e inhibiciones por estimulación de la Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral de todos los grupos neuronales descritos, muestran la gran complejidad de las interacciones existentes entre estas regiones.
6. Confirmamos que tanto la microestimulación eléctrica como la química con glutamato de la Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral producen

una respuesta cardiorrespiratoria caracterizada por aumento de la frecuencia respiratoria, aumento de presión arterial y aumento de frecuencia cardiaca con valores muy significativos con respecto al estado de reposo del animal.

7. La implementación de la técnica de “glotis aislada *in situ*” posibilita una medición estable, fiable y de alto nivel de sensibilidad de la presión subglótica, variable que refleja la actividad de las motoneuronas laríngeas, tanto en situación de reposo como bajo la estimulación de la Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral.
8. En nuestras condiciones experimentales, la resistencia laríngea, medida en forma de presión subglótica, disminuye significativamente mediante la microestimulación eléctrica y química de la Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral.
9. Se propone que la activación de la Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral produce la activación de mecanismos centrales que aseguran el aumento de la actividad de las motoneuronas inspiratorias laríngeas, reduciendo la actividad de las espiratorias, facilitando la respuesta taquipnéica evocada durante la respuesta de defensa del animal.

CONCLUSIÓN GENERAL

Los resultados obtenidos demuestran por primera vez, mediante el uso de técnicas neuromorfológicas, electroneurofisiológicas y neurofarmacológicas, la modulación funcional que ejercen las neuronas de la Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral sobre la actividad de las motoneuronas laríngeas del núcleo ambiguo en la rata durante la respuesta de defensa evocada por la estimulación de dicha área mesencefálica.

7. CONCLUSIONS

1. Electrical microstimulation of the dorsolateral periaqueductal grey matter induces a significant increase in neuronal activity ipsilateral to stimulation, measured as c-Fos protein expression, in the compact and loose domains of the nucleus ambiguus.
2. We confirmed the expression of the transcription factor FoxP2 in all divisions of the nucleus ambiguus, with higher expression in the semicompact and loose formations, which are directly related to laryngeal control. This expression is not affected by electrical microstimulation of the dorsolateral periaqueductal grey matter.
3. Motor neurons in the loose formation of the nucleus ambiguus significantly increase c-Fos/FoxP2 co-expression after electrical microstimulation of the dorsolateral periaqueductal grey matter.
4. The recording of the unitary electrical activity of neurons located in the region of the nucleus ambiguus and adjacent areas during microstimulation of the dorsolateral periaqueductal grey matter, allowed us to characterise up to 6 different neuronal groups: Inspiratory with decreasing pattern of discharge, inspiratory with increasing pattern of discharge, expiratory E1, expiratory E2, cardiovascular and unmodulated neurons.
5. All recorded neuronal groups modified their activity in response to electrical stimulation of the dorsolateral periaqueductal grey matter. Furthermore, the great complexity of the interactions between these regions is demonstrated by the presence of short-latency activations and excitations, facilitations, disfacilitations and inhibitions by stimulation of the dorsolateral periaqueductal grey matter of all the neuronal groups described.
6. We confirmed that both electrical and chemical microstimulation with glutamate of the dorsolateral periaqueductal grey matter produced a sympathoexcitatory response characterised by hypertension, tachycardia and tachypnoea, with very significant values compared to the animal's resting state.

7. The implementation of the "isolated glottis in situ" technique allows a stable, reliable and highly sensitive measurement of subglottic pressure, a variable that reflects laryngeal motor neuron activity, both at rest and during dorsolateral periaqueductal grey stimulation.
8. Under our experimental conditions, laryngeal resistance, measured as subglottic pressure, is significantly reduced by electrical and chemical microstimulation of the dorsolateral periaqueductal grey matter.
9. It is proposed that activation of the dorsolateral Periaqueductal Grey Substance produces the activation of central mechanisms that ensure increased activity of laryngeal inspiratory motor neurons, reducing the activity of expiratory motor neurons and facilitating the tachypnoeic response evoked during the animal's defence response.

GENERAL CONCLUSION

The results obtained demonstrate for the first time, using neuromorphological, electroneurophysiological and neuropharmacological techniques, the functional modulation exerted by neurons of the dorsolateral periaqueductal grey matter on the activity of the laryngeal motor neurons of the nucleus ambiguus in the rat during the defence response evoked by stimulation of this mesencephalic area.

BIBLIOGRAFÍA



8. BIBLIOGRAFÍA

- Albin, R. L., & Gilman, S. (1990). Autoradiographic localization of inhibitory and excitatory amino acid neurotransmitter receptors in human normal and olivopontocerebellar atrophy cerebellar cortex. *Brain Res*, 522(1), 37–45. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91574-z](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91574-z)
- Alexander M. P. (2001). Chronic akinetic mutism after mesencephalic-diencephalic infarction: remediated with dopaminergic medications. *Neurorehabil Neural Repair*, 15(2), 151–156. <https://doi.org/10.1177/154596830101500208>
- Allen, E., Minutello, K., Murcek, B.W. (2023) Anatomy, Head and Neck, Larynx Recurrent Laryngeal Nerve. StatPearls Publishing; Treasure Island (FL).
- Anderson, T. M., & Ramirez, J. M. (2017). Respiratory rhythm generation: triple oscillator hypothesis. *F1000Research*, 6, 139. <https://doi.org/10.12688/f1000research.10193.1>
- Anderson, T. M., Garcia, A. J., Baertsch, N. A., Pollak, J., Bloom, J. C., Wei, A. D., Rai, K. G., & Ramirez, J. M. (2016). A novel excitatory network for the control of breathing. *Nature*, 536(7614), 76–80. <https://doi.org/10.1038/nature18944>
- 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>
- Ashhad, S., Kam, K., Del Negro, C. A., & Feldman, J. L. (2022). Breathing Rhythm and Pattern and Their Influence on Emotion. *Annu Rev Neurosci*, 45, 223–247. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-090121-014424>
- 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 Comput Biol*, 14(4), e1006148. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006148>

- Azkue, J. J., Knöpfel, T., Kuhn, R., Mateos, J. M., & Grandes, P. (1997). Distribution of the metabotropic glutamate receptor subtype mGluR5 in rat midbrain periaqueductal grey and relationship with ascending spinofugal afferents. *Neurosci Lett*, 228(1), 1–4. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(97\)00357-1](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(97)00357-1)
- Baertsch, N. A., Severs, L. J., Anderson, T. M., & Ramirez, J. M. (2019). A spatially dynamic network underlies the generation of inspiratory behaviors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 116(15), 7493–7502. <https://doi.org/10.1073/pnas.1900523116>
- 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 Res*, 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. (1996). Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and the integration of emotional expression. *Prog Brain Res*, 107, 285–300. [https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(08\)61871-3](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)61871-3)
- Bandler, R., & Shipley, M. T. (1994). Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? *Trends Neurosci*, 17(9), 379–389. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(94\)90047-7](https://doi.org/10.1016/0166-2236(94)90047-7)
- Bandler, R., Keay, K. A., Floyd, N., & Price, J. (2000). Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. *Brain Res Bull*, 53(1), 95–104. [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(00\)00313-0](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(00)00313-0)
- Barbaresi, P. (2005). GABA-immunoreactive neurons and terminals in the cat periaqueductal gray matter: a light and electron microscopic study. *J Neurocytol*, 34(6), 471–487. <https://doi.org/10.1007/s11068-006-9440-7>
- Barbaresi, P. (2010). Postnatal development of GABA-immunoreactive neurons and terminals in rat periaqueductal gray matter: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol*, 518(12), 2240–2260. <https://doi.org/10.1002/cne.22329>

- Bautista, T. G., & Dutschmann, M. (2014). Ponto-medullary nuclei involved in the generation of sequential pharyngeal swallowing and concomitant protective laryngeal adduction in situ. *J Physiol*, 592(12), 2605–2623. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.272468>
- Behbehani M. M. (1995). Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog Neurobiol*, 46(6), 575–605. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(95\)00009-k](https://doi.org/10.1016/0301-0082(95)00009-k)
- Behbehani, M. M., Jiang, M., Chandler, S. D., & Ennis, M. (1990). The effect of GABA and its antagonists on midbrain periaqueductal gray neurons in the rat. *Pain*, 40(2), 195–204. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(90\)90070-T](https://doi.org/10.1016/0304-3959(90)90070-T)
- BeMent, S. L., & Ranck, J. B., Jr (1969). A model for electrical stimulation of central myelinated fibers with monopolar electrodes. *Exp Neurol*, 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.0b013e31823fcdee>
- Benarroch, E. E., Schmeichel, A. M., Low, P. A., & Parisi, J. E. (2010). Differential involvement of the periaqueductal gray in multiple system atrophy. *Auton Neurosci*, 158(1-2), 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2010.07.009>
- Benumof Jonathan L. Airway Management. Principles and Practice. 1st Edition 1996, Preface.
- Benzinger, H., & Massopust, L. C. (1983). Brain stem projections from cortical area 18 in the albino rat. *Exp Brain Res*, 50(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/BF00238228>
- Berquist, S. (2013). Sound production in the isolated mouse larynx. Masters thesis, UCLA; (<https://escholarship.org/uc/item/0hr2b5x5#page-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. *J Comp Neurol*, 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. *J Anat*, 193 (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. *J Comp Neurol*, 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 Struct Funct*, 218(1), 187–208. <https://doi.org/10.1007/s00429-012-0393-6>
- Blanchard, D. C., Blanchard, R. J., & Griebel, G. (2005). Defensive responses to predator threat in the rat and mouse. *Curr Protoc Neurosci, Chapter 8*. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0819s30>
- 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. *J Comp Neurol*, 520(5), 1047–1061. <https://doi.org/10.1002/cne.22769>
- Boers, J., Kirkwood, P. A., de Weerd, H., & Holstege, G. (2006). Ultrastructural evidence for direct excitatory retroambiguus projections to cutaneous trunci and abdominal external oblique muscle motoneurons in the cat. *Brain Res Bull*, 68(4), 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2005.08.011>
- Borelli, K. G., Ferreira-Netto, C., Coimbra, N. C., and Brandao, M. L. (2005). Foslike immunoreactivity in the brain associated with freezing or escape induced by inhibition of either glutamic acid decarboxylase or GABAA receptors in the dorsal periaqueductal gray. *Brain Res*. 1051, 100–111.

- Bouchet, C. A., and Ingram, S. L. (2020). Cannabinoids in the descending pain modulatory circuit: Role in inflammation. *Pharmacol. Ther.* 209:107495. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107495>
- Boulanger-Bertolus, J., & Mouly, A. M. (2021). Ultrasonic Vocalizations Emission across Development in Rats: Coordination with Respiration and Impact on Brain Neural Dynamics. *Brain Sci*, 11(5), 616. <https://doi.org/10.3390/brainsci11050616>
- Boulanger-Bertolus, J., Rincón-Cortés, M., Sullivan, R. M., & Mouly, A. M. (2017). Understanding pup affective state through ethologically significant ultrasonic vocalization frequency. *Sci Rep*, 7(1), 13483. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13518-6>
- Boulenguez, P., Gauthier, P., & Kastner, A. (2007). Respiratory neuron subpopulations and pathways potentially involved in the reactivation of phrenic motoneurons after C2 hemisection. *Brain Res*, 1148, 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.02.060>
- Brudzynski, K., & Maldonado-Alvarez, L. (2018). Identification of Ubiquinones in Honey: A New View on Their Potential Contribution to Honey's Antioxidant State. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(12), 3067. <https://doi.org/10.3390/molecules23123067>
- 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. *J Comp Neurol*, 335(2), 267–282. <https://doi.org/10.1002/cne.903350210>
- Butler, J. E., Hudson, A. L., & Gandevia, S. C. (2014). The neural control of human inspiratory muscles. *Prog Brain Res*, 209, 295–308. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63274-6.00015-1>
- Buttry, J. L., & Goshgarian, H. G. (2015). WGA-Alexa transsynaptic labeling in the phrenic motor system of adult rats: Intrapleural injection versus intradiaphragmatic injection. *J Neurosci Methods*, 241, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.12.013>

- Carrive P. (1993). The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behav Brain Res*, 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., & Dampney, R. A. (1989). Somatic and autonomic integration in the midbrain of the unanesthetized decerebrate cat: a distinctive pattern evoked by excitation of neurones in the subtentorial portion of the midbrain periaqueductal grey. *Brain Res*, 483(2), 251–258. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)90169-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)90169-8)
- Carvalho L., Moniz De Bettencourt J., Esguelha N., Marques M., Silva Carvalho J. (1987). Chemoreceptors in Respiratory Control. Springer; Dordrecht, The Netherlands: The Double Reflexogenic Action of Lobeline, Acetylcholine and Cyanides on the Carotid Body, Influence of Phentolamine and Sulpiride; pp. 334–341.
- Castellucci, G. A., McGinley, M. J., & McCormick, D. A. (2016). Knockout of Foxp2 disrupts vocal development in mice. *Sci Rep*, 6, 23305. <https://doi.org/10.1038/srep23305>
- Chabout, J., Sarkar, A., Patel, S. R., Radden, T., Dunson, D. B., Fisher, S. E., & Jarvis, E. D. (2016). A Foxp2 Mutation Implicated in Human Speech Deficits Alters Sequencing of Ultrasonic Vocalizations in Adult Male Mice. *Front Behav Neurosci*, 10, 197. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00197>
- Chamberlin, N. L., Eikermann, M., Fassbender, P., White, D. P., & Malhotra, A. (2007). Genioglossus premotoneurons and the negative pressure reflex in rats. *J Physiol*, 579(Pt 2), 515–526. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.121889>
- Chan, R. K., & Sawchenko, P. E. (1994). Spatially and temporally differentiated patterns of c-fos expression in brainstem catecholaminergic cell groups induced by cardiovascular challenges in the rat. *J Comp Neurol*, 348(3), 433–460. <https://doi.org/10.1002/cne.903480309>
- Chan, R. K., & Sawchenko, P. E. (1998). Organization and transmitter specificity of medullary neurons activated by sustained hypertension: implications for

- understanding baroreceptor reflex circuitry. *J Neurosci*, 18(1), 371–387.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-01-00371.1998>
- Chanaud, C.M., Ludlow, C.L. (1992) Single motor unit activity of human intrinsic laryngeal muscles during respiration. *Ann Otol Rhinol* 102:832-40.
- Chen, Y. C., Kuo, H. Y., Bornschein, U., Takahashi, H., Chen, S. Y., Lu, K. M., Yang, H. Y., Chen, G. M., Lin, J. R., Lee, Y. H., Chou, Y. C., Cheng, S. J., Chien, C. T., Enard, W., Hevers, W., Pääbo, S., Graybiel, A. M., & Liu, F. C. (2016). Foxp2 controls synaptic wiring of corticostriatal circuits and vocal communication by opposing Mef2c. *Nat Neurosci*, 19(11), 1513–1522. <https://doi.org/10.1038/nn.4380>
- 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>
- Christopher, K. L., & Morris, M. J. (2010). Vocal cord dysfunction, paradoxical vocal fold motion, or laryngomalacia? Our understanding requires an interdisciplinary approach. *Otolaryngol Clin North Am*, 43(1), 43–viii. <https://doi.org/10.1016/j.otc.2009.12.002>
- Christopher, K. L., Wood, R. P., 2nd, Eckert, R. C., Blager, F. B., Raney, R. A., & Souhrada, J. F. (1983). Vocal-cord dysfunction presenting as asthma. *N Engl J Med*, 308(26), 1566–1570. <https://doi.org/10.1056/NEJM198306303082605>
- Chung, G., Shim, H. G., Kim, C. Y., Ryu, H. H., Jang, D. C., Kim, S. H., Lee, J., Kim, C. E., Kim, Y. K., Lee, Y. S., Kim, J., Kim, S. K., Worley, P. F., & Kim, S. J. (2020). Persistent activity of metabotropic glutamate receptor 5 in the periaqueductal gray constrains emergence of chronic neuropathic pain. *Curr Biol*, 30(23), 4631–4642.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.09.008>
- Coltman, J.W. (1976). Jet driven mechanisms in edge tones and organ pipes. *J Acoust. Soc. Am.* 60, 725–733. <https://doi.org/10.1121/1.381120>

- Conti, F., Barbaresi, P., & Fabri, M. (1988). Cytochrome oxidase histochemistry reveals regional subdivisions in the rat periaqueductal gray matter. *Neuroscience*, 24(2), 629–633. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(88\)90356-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(88)90356-9)
- Cowie, R. J., & Holstege, G. (1992). Dorsal mesencephalic projections to pons, medulla, and spinal cord in the cat: limbic and non-limbic components. *The J Comp Neurol*, 319(4), 536–559. <https://doi.org/10.1002/cne.903190406>
- Creighton, F. X., Hapner, E., Klein, A., Rosen, A., Jinnah, H. A., & Johns, M. M. (2015). Diagnostic Delays in Spasmodic Dysphonia: A Call for Clinician Education. *J Voice*, 29(5), 592–594. <https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2013.10.022>
- Damasceno, R. S., Takakura, A. C., & Moreira, T. S. (2014). Regulation of the chemosensory control of breathing by Kölliker-Fuse neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 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. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 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. *Adv Physiol Educ*, 40(3), 283–296. <https://doi.org/10.1152/advan.00027.2016>
- 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. *Auton Neurosci*, 175(1-2), 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2012.12.008>
- Dampney, R. A., Horiuchi, J., Tagawa, T., Fontes, M. A., Potts, P. D., & Polson, J. W. (2003). Medullary and supramedullary mechanisms regulating sympathetic vasomotor tone. *Acta Physiol Scand*, 177(3), 209–218. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.2003.01070.x>

- Davis, P. J., & Nail, B. S. (1984). On the location and size of laryngeal motoneurons in the cat and rabbit. *J Comp Neurol*, 230(1), 13–32. <https://doi.org/10.1002/cne.902300103>
- 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 Res*, 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., Díaz-Calavia, E. J., Narváez, J. A., Clavijo, E., & González-Barón, S. (1989). Efecto del humo del tabaco aplicado en distintos niveles de las vías respiratorias. *Rev Esp Fisiol*, 45 Suppl, 197–202.
- 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 Arch*, 441(4), 434–443. <https://doi.org/10.1007/s004240000450>
- Dawid-Milner, M. S., Lara, J. P., Milan, 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. *J Physiol*, 487 (3), 739–749. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1995.sp020914>
- de Britto, A. A., & Moraes, D. J. (2017). Non-chemosensitive parafacial neurons simultaneously regulate active expiration and airway patency under hypercapnia in rats. *J Physiol*, 595(6), 2043–2064. <https://doi.org/10.1113/JP273335>
- 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. *J Physiol*, 587(Pt 6), 1201–1215. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.161463>
- De Troyer, A., & Estenne, M. (1984). Coordination between rib cage muscles and diaphragm during quiet breathing in humans. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, 57(3), 899–906. <https://doi.org/10.1152/jappl.1984.57.3.899>
- De Troyer, A., Kirkwood, P. A., & Wilson, T. A. (2005). Respiratory action of the intercostal muscles. *Physiol Rev*, 85(2), 717–756. <https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2004>
- De Troyer, A., Legrand, A., Gevenois, P. A., & Wilson, T. A. (1998). Mechanical advantage of the human parasternal intercostal and triangularis sterni muscles. *J Physiol*, 513(3),915–925. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.915ba.x>
- Del Negro, C.A., Funk, G.D., Feldman, J.L. (2018). Breathing matters. *Nat. Rev. Neurosci*, 19:351–367. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0003-6>, PMID: 29740175
- den Hoed, J., Devaraju, K., & Fisher, S. E. (2021). Molecular networks of the FOXP2 transcription factor in the brain. *EMBO Rep*, 22(8), e52803. <https://doi.org/10.15252/embr.202152803>
- Deng, H., Xiao, X., and Wang, Z. (2016). Periaqueductal gray neuronal activities underlie different aspects of defensive behaviors. *J. Neurosci.* 36, 7580–7588.
- 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. *J Physiol*, 598(11), 2061–2079. <https://doi.org/10.1113/JP279605>
- 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 Res*, 1279, 58–70. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.02.085>

- Do Monte, F. H., Canteras, N. S., Fernandes, D., Assreuy, J., & Carobrez, A. P. (2008). New perspectives on beta-adrenergic mediation of innate and learned fear responses to predator odor. *J Neurosci*, *28*(49), 13296–13302. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2843-08.2008>
- Drager, L. F., Genta, P. R., Pedrosa, R. P., Nerbass, F. B., Gonzaga, C. C., Krieger, E. M., & Lorenzi-Filho, G. (2010). Characteristics and predictors of obstructive sleep apnea in patients with systemic hypertension. *Am J Cardiol*, *105*(8), 1135–1139. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2009.12.017>
- Dragunow, M., & Faull, R. L. (1989). Rolipram induces c-fos protein-like immunoreactivity in ependymal and glial-like cells in adult rat brain. *Brain Res*, *501*(2), 382–388. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)90655-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)90655-0)
- Dragunow, M., & Robertson, H. A. (1987). Generalized seizures induce c-fos protein(s) in mammalian neurons. *Neurosci Lett*, *82*(2), 157–161. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(87\)90121-2](https://doi.org/10.1016/0304-3940(87)90121-2)
- Druart, M., Groszer, M., & Le Magueresse, C. (2020). An Etiological Foxp2 Mutation Impairs Neuronal Gain in Layer VI Cortico-Thalamic Cells through Increased GABAB/GIRK Signaling. *J Neurosci*, *40*(44), 8543–8555. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2615-19.2020>
- 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. *Eur J Neurosci*, *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. *Respir Physiol Neurobiol*, *284*, 103563. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2020.103563>
- Ellenberger, H. H., & Feldman, J. L. (1988). Monosynaptic transmission of respiratory drive to phrenic motoneurons from brainstem bulbospinal neurons in rats. *J Comp Neurol*, *269*(1), 47–57. <https://doi.org/10.1002/cne.902690104>

- Ellenberger, H. H., & Feldman, J. L. (1990a). Brainstem connections of the rostral ventral respiratory group of the rat. *Brain Res*, 513(1), 35–42. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91086-v](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91086-v)
- Ellenberger, H. H., Vera, P. L., Haselton, J. R., Haselton, C. L., & Schneiderman, N. (1990b). Brainstem projections to the phrenic nucleus: an anterograde and retrograde HRP study in the rabbit. *Brain Res Bull*, 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., and Pääbo, S. (2002). Molecular evolution of FOXP2, a gene involved in speech and language. *Nature* 418, 869–872. <https://doi.org/10.1038/nature01025>
- 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>
- Evans, D. A., Stempel, A. V., Vale, R., Ruehle, S., Lefler, Y., & Branco, T. (2018). A synaptic threshold mechanism for computing escape decisions. *Nature*, 558(7711), 590–594. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0244-6>
- Ezure, K., & Tanaka, I. (1996). Contralateral projections of barosensitive neurons of the nucleus tractus solitarii. *Neurosci Lett*, 219(1), 37–40. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(96\)13169-4](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(96)13169-4)
- 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. *Neurosci Res*, 45(1), 41–51. [https://doi.org/10.1016/s0168-0102\(02\)00197-9](https://doi.org/10.1016/s0168-0102(02)00197-9)
- Farley, G. R., Barlow, S. M., & Netsell, R. (1992). Factors influencing neural activity in parabrachial regions during cat vocalizations. *Exp Brain Res*, 89(2), 341–351. <https://doi.org/10.1007/BF00228250>
- Faull, O. K., Jenkinson, M., Ezra, M., & Pattinson, K. T.s (2016). Conditioned respiratory threat in the subdivisions of the human periaqueductal gray. *eLife*, 5, e12047. <https://doi.org/10.7554/eLife.12047>
- 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. *Neurosci Biobehav Rev*, 98, 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.12.020>
- Feher, J. Control of ventilation. In *Quantitative Human Physiology an Introduction*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2017; pp. 672–681, ISBN 9780128008836.
- Fernandes, A. C. N., Ferreira, M. V. N., Serra, L. M., da Silva, E. M., Sampaio, A. L., & Kuckelhaus, S. A. S. (2022). Methodological Approaches for Vocal Folds Experiments in Laryngology: A Scoping Review. *J Voice*. <https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2022.07.025>
- Fernández, S., Garaycochea, O., Martínez-Arellano, A., & Alcalde, J. (2020). Does More Compression Mean More Pressure? A New Classification for Muscle Tension Dysphonia. *J Speech Lang Hear Res*, 63(7), 2177–2184. https://doi.org/10.1044/2020_JSLHR-20-00042
- Feuk, L., Kalervo, A., Lipsanen-Nyman, M., Skaug, J., Nakabayashi, K., Finucane, B., Hartung, D., Innes, M., Kerem, B., Nowaczyk, M. J., Rivlin, J., Roberts, W., Senman, L., Summers, A., Szatmari, P., Wong, V., Vincent, J. B., Zeesman, S., Osborne, L. R., Cardy, J. O., ... Hannula-Jouppi, K. (2006). Absence of a paternally inherited FOXP2 gene in developmental verbal dyspraxia. *Am J Hum Genet*, 79(5), 965–972. <https://doi.org/10.1086/508902>

- Fields H. (2004). State-dependent opioid control of pain. *Nat Rev Neurosci*, 5(7), 565–575. <https://doi.org/10.1038/nrn1431>
- Fontes, M. A., Tagawa, T., Polson, J. W., Cavanagh, S. J., & Dampney, R. A. (2001). Descending pathways mediating cardiovascular response from dorsomedial hypothalamic nucleus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 280(6), H2891–H2901. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.280.6.H2891>
- Fryszak, R. J., & Neafsey, E. J. (1991). The effect of medial frontal cortex lesions on respiration, "freezing," and ultrasonic vocalizations during conditioned emotional responses in rats. *Cereb Cortex*, 1(5), 418–425. <https://doi.org/10.1093/cercor/1.5.418>
- 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. *J Comp Neurol*, 492(2), 145–177. <https://doi.org/10.1002/cne.20738>
- Gang, S., Sato, Y., Kohama, I., & Aoki, M. (1995). Afferent projections to the Böttinger complex from the upper cervical cord and other respiratory related structures in the brainstem in cats: retrograde WGA-HRP tracing. *J Auton Nerv Syst*, 56(1-2), 1–7. [https://doi.org/10.1016/0165-1838\(95\)00049-x](https://doi.org/10.1016/0165-1838(95)00049-x)
- Garaycochea, O., Alcalde, J., & Fernández, S. (2021). Aerodynamic Measures in Muscle Tension Dysphonia. *J Voice*, 35(6), 930. <https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2020.03.002>
- García-Tapia, R., Fernández, S. (1996). Fisiología de la fonación. En: García-Tapia R, Cobeta I. Diagnóstico y tratamiento de los trastornos de la voz. Madrid: Garsi; p. 54-74.
- Gaytán, S. P., & Pásaro, R. (1998). Connections of the rostral ventral respiratory neuronal cell group: an anterograde and retrograde tracing study in the rat. *Brain Res Bull*, 47(6), 625–642. [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(98\)00125-7](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(98)00125-7)

- Geerling, J. C., Shin, J. W., Chimenti, P. C., & Loewy, A. D. (2010). Paraventricular hypothalamic nucleus: axonal projections to the brainstem. *J Comp Neurol*, 518(9), 1460–1499. <https://doi.org/10.1002/cne.22283>
- Geerling, J. C., Yokota, S., Rukhadze, I., Roe, D., & Chamberlin, N. L. (2017). Kölliker-Fuse GABAergic and glutamatergic neurons project to distinct targets. *J Comp Neurol*, 525(8), 1844–1860. <https://doi.org/10.1002/cne.24164>
- Geraldes, V., Laranjo, S., Nunes, C., & Rocha, I. (2023). Central Autonomic Network Regions and Hypertension: Unveiling Sympathetic Activation and Genetic Therapeutic Perspectives. *Biology*, 12(8), 1153. <https://doi.org/10.3390/biology12081153>
- 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. *J Comp Neurol*, 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)
- González Barón, S., Molina, M., & García-Matilla, F. (1980). Isoprenaline effect on larynx resistance in the cat. *Rev Esp Fisiol*, 36(2), 217–218.
- 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., 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. *Rev Esp Fisiol*, 37(2), 211–220.

- González-García, M., Carrillo-Franco, L., Peinado-Aragón, 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 Arch*, 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. *J Neurosci 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)
- Graham, J. C., Hoffman, G. E., & Sved, A. F. (1995). c-Fos expression in brain in response to hypotension and hypertension in conscious rats. *Journal of the autonomic nervous system*, 55(1-2), 92–104. [https://doi.org/10.1016/0165-1838\(95\)00032-s](https://doi.org/10.1016/0165-1838(95)00032-s)
- Gregg, T. R., & Siegel, A. (2003). Differential effects of NK1 receptors in the midbrain periaqueductal gray upon defensive rage and predatory attack in the cat. *Brain Res*, 994(1), 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.09.024>
- Grindstaff, R. J., Grindstaff, R. R., & Cunningham, J. T. (2000). Baroreceptor sensitivity of rat supraoptic vasopressin neurons involves noncholinergic neurons in the DBB. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 279(5), R1934–R1943. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.279.5.R1934>
- Gross, C. T., & Canteras, N. S. (2012). The many paths to fear. *Nat Rev Neurosci*, 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. *Neurosci Bull*, 36(6), 585–597. <https://doi.org/10.1007/s12264-020-00468-9>

- Guyenet P. G. (2006). Novel two-rhythm generator theory of breathing in mammals. *J Physiol*, 570(Pt 2), 207. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.101709>
- Guyenet, P. G., & Wang, H. (2001). Pre-Bötzinger neurons with preinspiratory discharges "in vivo" express NK1 receptors in the rat. *J Neurophysiol*, 86(1), 438–446. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.86.1.438>
- 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 Biol*, 5(12), e321. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050321>
- Haesler, S., Wada, K., Nshdejan, A., Morrissey, E. E., Lints, T., Jarvis, E. D., & Scharff, C. (2004). FoxP2 expression in avian vocal learners and non-learners. *J Neurosci*, 24(13), 3164–3175. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4369-03.2004>
- Håkansson, J., Jiang, W., Xue, Q., Zheng, X., Ding, M., Agarwal, A. A., & Elemans, C. P. H. (2022). Aerodynamics and motor control of ultrasonic vocalizations for social communication in mice and rats. *BMC Biol*, 20(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s12915-021-01185-z>
- Hamilton, R. B., & Norgren, R. (1984). Central projections of gustatory nerves in the rat. *J Comp Neurol*, 222(4), 560–577. <https://doi.org/10.1002/cne.902220408>
- Hanley, M. R., Jackson, T. R., Vallejo, M., Patterson, S. I., Thastrup, O., Lightman, S., Rogers, J., Henderson, G., & Pini, A. (1988). Neural function: metabolism and actions of inositol metabolites in mammalian brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 320(1199), 381–398. <https://doi.org/10.1098/rstb.1988.0083>
- 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>
- Haxhiu, M. A., Yamamoto, B. K., Dreshaj, I. A., & Ferguson, D. G. (2002). Activation of the midbrain periaqueductal gray induces airway smooth

- muscle relaxation. *Appl Physiol*, 93(2), 440–449.
<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00752.2001>
- 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. *Anat Embryol*, 200(3), 301–311.
<https://doi.org/10.1007/s004290050281>
- Hayward, L. F. (2007). Midbrain modulation of the cardiac baroreflex involves excitation of lateral parabrachial neurons in the rat. *Brain Res*, 1145, 117–127. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.01.140>
- Hegoburu, C., Shionoya, K., Garcia, S., Messaoudi, B., Thévenet, M., & Mouly, A. M. (2011). The RUB Cage: Respiration-Ultrasonic Vocalizations-Behavior Acquisition Setup for Assessing Emotional Memory in Rats. *Front Behav Neurosci*, 5, 25. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00025>
- Heinricher, M. M., Tavares, I., Leith, J. L., & Lumb, B. M. (2009). Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain Res Rev*, 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. *Phys. Fluids*, 25:107101. <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 J Comp Neurol*, 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. *J Comp Neurol*, 293(4), 540–580.
<https://doi.org/10.1002/cne.902930404>
- Herdegen, T., & Leah, J. D. (1998). Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res*, 28(3), 370–490.
[https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(98\)00018-6](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(98)00018-6)

- Herdegen, T., Kummer, W., Fiallos, C. E., Leah, J., & Bravo, R. (1991). Expression of c-JUN, JUN B and JUN D proteins in rat nervous system following transection of vagus nerve and cervical sympathetic trunk. *Neurosci*, 45(2), 413–422. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(91\)90237-i](https://doi.org/10.1016/0306-4522(91)90237-i)
- Hermann, D. M., Luppi, P. H., Peyron, C., Hinckel, P., & Jouvet, M. (1997). Afferent projections to the rat nuclei raphe magnus, raphe pallidus and reticularis gigantocellularis pars alpha demonstrated by iontophoretic application of cholera toxin (subunit b). *J Chem Neuroanat*, 13(1), 1–21. [https://doi.org/10.1016/s0891-0618\(97\)00019-7](https://doi.org/10.1016/s0891-0618(97)00019-7)
- 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>
- Hernandez-Morato, I., Pitman, M. J., & Sharma, S. (2016). Muscle specific nucleus ambiguus neurons isolation and culturing. *J Neurosci Methods*, 273, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.07.014>
- Hernández-Morato, I., Valderrama-Canales, F. J., Berdugo, G., Arias, G., McHanwell, S., Sañudo, J., Vázquez, T., & Pascual-Font, A. (2013). Reorganization of laryngeal motoneurons after crush injury in the recurrent laryngeal nerve of the rat. *J Anat.*, 222(4), 451–461. <https://doi.org/10.1111/joa.12031>
- Hickey, S. L., Berto, S., & Konopka, G. (2019). Chromatin Decondensation by FOXP2 Promotes Human Neuron Maturation and Expression of Neurodevelopmental Disease Genes. *Cell Rep*, 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. *J Exp Biol*, 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. *J Physiol*, 378, 213–228. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1986.sp016215>
- Hinrichsen, C. F., & Ryan, A. T. (1981). Localization of laryngeal motoneurons in the rat: morphologic evidence for dual innervation? *Exp Neurol*, 74(2), 341–355. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(81\)90174-6](https://doi.org/10.1016/0014-4886(81)90174-6)
- Hintze, J. M., Ludlow, C. L., Bansberg, S. F., Adler, C. H., & Lott, D. G. (2017). Spasmodic Dysphonia: A Review. Part 2: Characterization of Pathophysiology. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 157(4), 558–564. <https://doi.org/10.1177/0194599817728465>
- Hirano, M., Bless, D.M. (1993). Videostroboscopic examination of the larynx. San Diego (CA): Singular. p. 23–34.
- Hirano, M., Sato, K., & Nakashima, T. (1999). Fibroblasts in human vocal fold mucosa. *Acta Otolaryngol*, 119(2), 271–276. <https://doi.org/10.1080/00016489950181800>
- 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 Otolaryngol*, 127(2), 213–220. <https://doi.org/10.1080/00016480600794479>
- Hirokawa, N., Niwa, S., & Tanaka, Y. (2010). Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron*, 68(4), 610–638. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.039>
- Hofer, M. A., & Shair, H. N. (1992). Ultrasonic vocalization by rat pups during recovery from deep hypothermia. *Dev Psychobiol*, 25(7), 511–528. <https://doi.org/10.1002/dev.420250705>
- Holstege G. (2005). Micturition and the soul. *J Comp Neurol*, 493(1), 15–20. <https://doi.org/10.1002/cne.20785>

- Holstege G. (2014). The periaqueductal gray controls brainstem emotional motor systems including respiration. *Prog Brain Res*, 209, 379–405. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63274-6.00020-5>
- Holstege, G. (1987). Anatomical evidence for an ipsilateral rubrospinal pathway and for direct rubrospinal projections to motoneurons in the cat. *Neurosci Lett*, 74(3), 269–274. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(87\)90308-9](https://doi.org/10.1016/0304-3940(87)90308-9)
- Holstege, G. (1989). Anatomical study of the final common pathway for vocalization in the cat. *J Comp Neurol*, 284(2), 242–252. <https://doi.org/10.1002/cne.902840208>
- Holstege, G. (1991). Descending motor pathways and the spinal motor system: limbic and non-limbic components. *Prog Brain Res*, 87, 307–421. [https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(08\)63057-5](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)63057-5)
- Holstege, G. (1996). The somatic motor system. *Prog Brain Res*, 107, 9–26. [https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(08\)61856-7](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)61856-7)
- Holstege, G., & Subramanian, H. H. (2016). Two different motor systems are needed to generate human speech. *J Comp Neurol*, 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)
- Holstege, G., Meiners, L., & Tan, K. (1985). Projections of the bed nucleus of the stria terminalis to the mesencephalon, pons, and medulla oblongata in the cat. *Exp Brain Res*, 58(2), 379–391. <https://doi.org/10.1007/BF00235319>
- Horch, H. W., & Katz, L. C. (2002). BDNF release from single cells elicits local dendritic growth in nearby neurons. *Nat Neurosci*, 5(11), 1177–1184. <https://doi.org/10.1038/nn927>
- 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. *J Physiol*, 587(Pt 21), 5149–5162. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.179739>

- Huckstepp, R. T., Cardoza, K. P., Henderson, L. E., & Feldman, J. L. (2015). Role of parafacial nuclei in control of breathing in adult rats. *J Neurosci*, *35*(3), 1052–1067. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2953-14.2015>
- Hülsmann, S. (2021). The post-inspiratory complex (PiCo), what is the evidence? *J Physiol.*, *599*(1), 357–359. <https://doi.org/10.1113/JP280492>
- Hülsmann, S., Oke, Y., Mesuret, G., Latal, A. T., Fortuna, M. G., Niebert, M., Hirrlinger, J., Fischer, J., & Hammerschmidt, K. (2019). The postnatal development of ultrasonic vocalization-associated breathing is altered in glycine transporter 2-deficient mice. *J Physiol*, *597*(1), 173–191. <https://doi.org/10.1113/JP276976>
- Hunt, S. P., Pini, A., & Evan, G. (1987). Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*, *328*(6131), 632–634. <https://doi.org/10.1038/328632a0>
- Illing, R. B., & Graybiel, A. M. (1986). Complementary and non-matching afferent compartments in the cat's superior colliculus: innervation of the acetylcholinesterase-poor domain of the intermediate gray layer. *Neuroscience*, *18*(2), 373–394. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(86\)90160-0](https://doi.org/10.1016/0306-4522(86)90160-0)
- Inagi, K., Schultz, E., & Ford, C. N. (1998). An anatomic study of the rat larynx: establishing the rat model for neuromuscular function. *Otolaryngol Head Neck Surg*, *118*(1), 74–81. [https://doi.org/10.1016/S0194-5998\(98\)70378-X](https://doi.org/10.1016/S0194-5998(98)70378-X)
- Janczewski, W. A., & Feldman, J. L. (2006). Distinct rhythm generators for inspiration and expiration in the juvenile rat. *J Physiol*, *570*(2), 407–420. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.098848>
- Jensen, V. N., Alilain, W. J., & Crone, S. A. (2020). Role of Propriospinal Neurons in Control of Respiratory Muscles and Recovery of Breathing Following Injury. *Front Syst Neurosci*, *13*, 84. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2019.00084>
- Jiang, J. J., Yumoto, E., Lin, S. J., Kadota, Y., Kurokawa, H., & Hanson, D. G. (1998). Quantitative measurement of mucosal wave by high-speed

- photography in excised larynges. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 107(2), 98–103. <https://doi.org/10.1177/000348949810700203>
- Jiménez-Vargas, J., Fernández-González, S., & Dawid-Milner, S. (1988). Efectos respiratorios de nicotina y naloxona. *Rev Med Univ Navarra*, 32(1), 51–52.
- Jiménez-Vargas, J., González-Barón, S., & Asirón, M. (1973). Resistencia de la laringe en la tos. *Rev Esp Fisiol*, 29(3), 181–188.
- Johnson, A. M., Ciucci, M. R., Russell, J. A., Hammer, M. J., & Connor, N. P. (2010). Ultrasonic output from the excised rat larynx. *J Acoust Soc Am*, 128, EL75–EL79. <https://doi.org/10.1121/1.3462234>
- Jones, B. E., & Moore, R. Y. (1977). Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. II. Autoradiographic study. *Brain Res*, 127(1), 25–53.
- Jones, B. E., & Yang, T. Z. (1985). The efferent projections from the reticular formation and the locus coeruleus studied by anterograde and retrograde axonal transport in the rat. *J Comp Neurol*, 242(1), 56–92. <https://doi.org/10.1002/cne.902420105>
- 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 Struct Funct*, 221(9), 4353–4368. <https://doi.org/10.1007/s00429-015-1165-x>
- Jürgens U. (1974). On the elicibility of vocalization from the cortical larynx area. *Brain Res*, 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. (1982). Afferents to the cortical larynx area in the monkey. *Brain Res*, 239(2), 377–389. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)90516-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)90516-9)
- Jürgens U. (1994). The role of the periaqueductal grey in vocal behaviour. *Behav Brain Res*, 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). Neural pathways underlying vocal control. *Neurosci Biobehav Rev*, 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. *J Voice Foundation*, 23(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2007.07.005>
- Jürgens, U. (2002b). A study of the central control of vocalization using the squirrel monkey. *Med Eng Phys*, 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)
- Kaur, S., De Luca, R., Khanday, M. A., Bandaru, S. S., Thomas, R. C., Broadhurst, R. Y., Venner, A., Todd, W. D., Fuller, P. M., Arrigoni, E., & Saper, C. B. (2020). Role of serotonergic dorsal raphe neurons in hypercapnia-induced arousals. *Nat Commun*, 11(1), 2769. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16518-9>
- Kawai Y. (2018). Differential Ascending Projections From the Male Rat Caudal Nucleus of the Tractus Solitarius: An Interface Between Local Microcircuits and Global Macrocircuits. *Front Neuroanat*, 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. *Neurosci Biobehav Rev*, 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: Paparella MM, Shumrick DA, Gluckman JL, Meyerhoff WL. Otorrinolaringología. Vol.I. 3ª ed.: Editorial Médica Panamericana; p.398-408.
- Kirzinger, A., & Jürgens, U. (1982). Cortical lesion effects and vocalization in the squirrel monkey. *Brain Res*, 233(2), 299–315. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)91204-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)91204-5)
- Kittelberger, J. M., Land, B. R., & Bass, A. H. (2006). Midbrain periaqueductal gray and vocal patterning in a teleost fish. *J Neurophysiol*, 96(1), 71–85. <https://doi.org/10.1152/jn.00067.2006>
- 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*, 144(10), 3264–3276. <https://doi.org/10.1093/brain/awab224>

- Klop, E. M., Mouton, L. J., & Holstege, G. (2006). Periparabigeminal and adjoining mesencephalic tegmental field projections to the dorsolateral periaqueductal grey in cat - a possible role for oculomotor input in the defensive system. *Eur J Neurosci*, 23(8), 2145–2157. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04740.x>
- Klop, E. M., Mouton, L. J., Hulsebosch, R., Boers, J., & Holstege, G. (2005). In cat four times as many lamina I neurons project to the parabrachial nuclei and twice as many to the periaqueductal gray as to the thalamus. *Neuroscience*, 134(1), 189–197. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.03.035>
- Kobler, J. B., Datta, S., Goyal, R. K., & Benecchi, E. J. (1994). Innervation of the larynx, pharynx, and upper esophageal sphincter of the rat. *J Comp Neurol*, 349(1), 129–147. <https://doi.org/10.1002/cne.903490109>
- 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. *Sci Rep*, 10(1), 4787. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61740-6>
- Koutsikou, S., Watson, T. C., Crook, J.J., Leith, J.L., Lawrenson, C.L., Apps, R., Lumb, B.M. (2015). The Periaqueductal Gray Orchestrates Sensory and Motor Circuits at Multiple Levels of the Neuraxis. *J Neurosci* 35:14132-47. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0261-15.2015>
- Krause, J., Lalueza-Fox, C., Orlando, L., Enard, W., Green, R. E., Burbano, H. A., Hublin, J. J., Hänni, C., Fortea, J., de la Rasilla, M., Bertranpetit, J., Rosas, A., & Pääbo, S. (2007). The derived FOXP2 variant of modern humans was shared with Neandertals. *Curr Biol*, 17(21), 1908–1912. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.10.008>

- 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>
- Krout, K. E., & Loewy, A. D. (2000). Periaqueductal gray matter projections to midline and intralaminar thalamic nuclei of the rat. *J Comp Neurol*, *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. *J Comp Neurol*, *401*(4), 437–454.
- Krukoff T. L. (1993). Expression of c-fos in studies of central autonomic and sensory systems. *Mol Neurobiol*, *7*(3-4), 247–263. <https://doi.org/10.1007/BF02769178>
- Kuipers, R., Mensinga, G. M., Boers, J., Klop, E. M., & Holstege, G. (2006). Infralimbic cortex projects to all parts of the pontine and medullary lateral tegmental field in cat. *Eur J Neurosci*, *23*(11), 3014–3024. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04843.x>
- Kuner, R., & Kuner, T. (2021). Cellular Circuits in the Brain and Their Modulation in Acute and Chronic Pain. *Physiol Rev*, *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*, *146*(8), 3542–3557. <https://doi.org/10.1093/brain/awad090>
- Kyuhou, S., & Gemba, H. (1998). Two vocalization-related subregions in the midbrain periaqueductal gray of the guinea pig. *Neuroreport*, *9*(7), 1607–1610. <https://doi.org/10.1097/00001756-199805110-00064>
- 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>

- Lantéri-Minet, M., Weil-Fugazza, J., de Pommery, J., & Menétrey, D. (1994). Hindbrain structures involved in pain processing as revealed by the expression of c-Fos and other immediate early gene proteins. *Neurosci*, 58(2), 287–298. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90035-3](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90035-3)
- 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 Res*, 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>
- Lawn A. M. (1966). The localization, in the nucleus ambiguus of the rabbit, of the cells of origin of motor nerve fibers in the glossopharyngeal nerve and various branches of the vagus nerve by means of retrograde degeneration. *J Comp Neurol*, 127(2), 293–306. <https://doi.org/10.1002/cne.901270210>
- LeDoux, J. (2012). Rethinking the emotional brain. *Neuron* 73:653–676. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.004>
- Lee, H. S., Kim, M. A., Valentino, R. J., & Waterhouse, B. D. (2003). Glutamatergic afferent projections to the dorsal raphe nucleus of the rat. *Brain Res*, 963(1-2), 57–71. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)03841-6](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)03841-6)
- Lefler, Y., Campagner, D., & Branco, T. (2020). The role of the periaqueductal gray in escape behavior. *Curr Opin Neurobiol*, 60, 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.11.014>

- Lenell, C., Broadfoot, C. K., Schaen-Heacock, N. E., & Ciucci, M. R. (2021). Biological and Acoustic Sex Differences in Rat Ultrasonic Vocalization. *Brain Sci*, 11(4), 459. <https://doi.org/10.3390/brainsci11040459>
- Levendoski, E. E., Leydon, C., & Thibeault, S. L. (2014). Vocal fold epithelial barrier in health and injury: a research review. *J Speech Lang Hear Res*, 57(5), 1679–1691. https://doi.org/10.1044/2014_JSLHR-S-13-0283
- Li, S., Weidenfeld, J., & Morrissey, E. E. (2004). Transcriptional and DNA binding activity of the Foxp1/2/4 family is modulated by heterotypic and homotypic protein interactions. *Mol Cell Biol*, 24(2), 809–822. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.2.809-822.2004>
- Li, Y. W., & Dampney, R. A. (1992). Expression of c-fos protein in the medulla oblongata of conscious rabbits in response to baroreceptor activation. *Neurosci Lett*, 144(1-2), 70–74. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(92\)90718-m](https://doi.org/10.1016/0304-3940(92)90718-m)
- Li, Y. W., & Dampney, R. A. (1994). Expression of Fos-like protein in brain following sustained hypertension and hypotension in conscious rabbits. *Neurosci*, 61(3), 613–634. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90439-1](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90439-1)
- Li, Y. W., & Dampney, R. A. (1995). Clonidine and rilmenidine suppress hypotension-induced Fos expression in the lower brainstem of the conscious rabbit. *Neurosci*, 66(2), 391–402. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)00583-q](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)00583-q)
- Lima, J. D., Sobrinho, C. R., Falquetto, B., Santos, L. K., Takakura, A. C., Mulkey, D. K., & Moreira, T. S. (2019). Cholinergic neurons in the pedunculopontine tegmental nucleus modulate breathing in rats by direct projections to the retrotrapezoid nucleus. *J Physiol*, 597(7), 1919–1934. <https://doi.org/10.1113/JP277617>
- Linman, 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. *J Neurosci 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)
- Lipski, J., Zhang, X., Kruszewska, B., & Kanjhan, R. (1994). Morphological study of long axonal projections of ventral medullary inspiratory neurons in the rat. *Brain Res*, *640*(1-2), 171–184. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91871-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91871-6)
- 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. *Eur Respir Rev*, *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. *J Physiol Biochem*, *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. *Exp Physiol*, *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. Á., Díaz-Casares, A., & Dawid-Milner, M. S. (2020). Pontine A5 region modulation of the cardiorespiratory response evoked from the midbrain dorsolateral periaqueductal grey. *J Physiol Biochem*, *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. *Stud Rockefeller Inst Med Res Repr*, 132, 85–144.
- Lu, C. L., & Jürgens, U. (1993). Effects of chemical stimulation in the periaqueductal gray on vocalization in the squirrel monkey. *Brain Res Bull*, 32(2), 143–151. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(93\)90068-m](https://doi.org/10.1016/0361-9230(93)90068-m)
- Lu, J., Zhou, T. C., & Saper, C. B. (2006). Identification of wake-active dopaminergic neurons in the ventral periaqueductal gray matter. *J Neurosci*, 26(1), 193–202. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2244-05.2006>
- Ludlow C. L. (2011). Central nervous system control of interactions between vocalization and respiration in mammals. *Head Neck*, 33 Suppl 1, S21–S25. <https://doi.org/10.1002/hed.21904>
- Lumb, B. M., & Lovick, T. A. (1993). The rostral hypothalamus: an area for the integration of autonomic and sensory responsiveness. *J Neurophysiol*, 70(4), 1570–1577. <https://doi.org/10.1152/jn.1993.70.4.1570>
- Lungova, V., & Thibeault, S. L. (2020). Mechanisms of larynx and vocal fold development and pathogenesis. *Cell Mol Life Sci*, 77(19), 3781–3795. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03506-x>
- 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)
- MacDermot, K. D., Bonora, E., Sykes, N., Coupe, A. M., Lai, C. S., Vernes, S. C., Vargha-Khadem, F., McKenzie, F., Smith, R. L., Monaco, A. P., & Fisher, S. E. (2005). Identification of FOXP2 truncation as a novel cause of developmental speech and language deficits. *Am J Hum Genet*, 76(6), 1074–1080. <https://doi.org/10.1086/430841>
- Magoun, H. W., Atlas, D., Ingersoll, E. H., & Ranson, S. W. (1937). Associated Facial, Vocal and Respiratory Components of Emotional Expression: An

- Experimental Study. *J Neurol Psychopathol*, 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. *Curr Biol*, 26(19), R880–R881.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.08.032>
- Mantyh, P. W. (1983). Connections of midbrain periaqueductal gray in the monkey. II. Descending efferent projections. *J Neurophysiol*, 49(3), 582–594. <https://doi.org/10.1152/jn.1983.49.3.582>
- Markham, C. M., Blanchard, D. C., Canteras, N. S., Cuyno, C. D., & Blanchard, R. J. (2004). Modulation of predatory odor processing following lesions to the dorsal preammillary nucleus. *Neurosci Lett*, 372(1-2), 22–26.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.09.006>
- 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>
- McDowall, L. M., Horiuchi, J., Killinger, S., & Dampney, R. A. (2006). Modulation of the baroreceptor reflex by the dorsomedial hypothalamic nucleus and perifornical area. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 290(4), R1020–R1026. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00541.2005>
- 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. *J Neurosci*, 35(18), 7041–7055. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5128-14.2015>
- McGregor, I. S., Hargreaves, G. A., Apfelbach, R., & Hunt, G. E. (2004). Neural correlates of cat odor-induced anxiety in rats: region-specific effects of the benzodiazepine midazolam. *J Neurosci*, 24(17), 4134–4144.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0187-04.2004>

- 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 Res*, 24(1), 11–28. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(70\)90271-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(70)90271-4)
- Miki, K., & Yoshimoto, M. (2010). Role of differential changes in sympathetic nerve activity in the preparatory adjustments of cardiovascular functions during freezing behaviour in rats. *Exp Physiol*, 95(1), 56–60. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2009.050187>
- Miri A. K. (2014). Mechanical characterization of vocal fold tissue: a review study. *J Voice*, 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. *J Comp Neurol*, 295(4), 624–661. <https://doi.org/10.1002/cne.902950408>
- 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>
- Mor, N., Simonyan, K., & Blitzer, A. (2018). Central voice production and pathophysiology of spasmodic dysphonia. *Laryngoscope*, 128(1), 177–183. <https://doi.org/10.1002/lary.26655>
- 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>
- Morgan, A., Fisher, S. E., Scheffer, I., & Hildebrand, M. (2016). *FOXP2*-Related Speech and Language Disorder. In M. P. Adam (Eds.) et al., *GeneReviews*®. University of Washington, Seattle.
- Morgan, J. I., & Curran, T. (1991). Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu*

- Rev Neurosci*, 14, 421–451.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ne.14.030191.002225>
- Morgan, J. I., Cohen, D. R., Hempstead, J. L., & Curran, T. (1987). Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science*, 237(4811), 192–197.
<https://doi.org/10.1126/science.3037702>
- Morris, K. F., Nuding, S. C., Segers, L. S., Iceman, K. E., O'Connor, R., Dean, J. B., Ott, M. M., Alencar, P. A., Shuman, D., Horton, K. K., Taylor-Clark, T. E., Bolser, D. C., & Lindsey, B. G. (2018). Carotid chemoreceptors tune breathing via multipath routing: reticular chain and loop operations supported by parallel spike train correlations. *J Neurophysiol*, 119(2), 700–722. <https://doi.org/10.1152/jn.00630.2017>
- 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>
- Motta, S. C., Carobrez, A. P., and Canteras, N. S. (2017). The periaqueductal gray and primal emotional processing critical to influence complex defensive responses, fear learning and reward seeking. *Neurosci Biobehav Rev*, 76, 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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(12), 4870–4875.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0900939106>
- Nasri, S., Sercarz, J. A., & Berke, G. S. (1994). Noninvasive measurement of traveling wave velocity in the canine larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 103(10), 758–766.
<https://doi.org/10.1177/000348949410301003>

- Navarrete-Opazo, A. A., Cook-Snyder, D. R., Miller, J. R., Callison, J. J., McCarthy, N., Palkovic, B., Stuth, E. A. E., Zuperku, E. J., & Stucke, A. G. (2020). Endogenous glutamatergic inputs to the Parabrachial Nucleus/Kölliker-Fuse Complex determine respiratory rate. *Respir Physiol Neurobiol*, 277, 103401. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2020.103401>
- Nguyen, E., Grajales-Reyes, J. G., Gereau, R. W. T., and Ross, S. E. (2023). Cell typespecific dissection of sensory pathways involved in descending modulation. *Trends Neurosci*. 46, 539–550. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2023.04.002>
- Nieder, A., & Mooney, R. (2020). The neurobiology of innate, volitional and learned vocalizations in mammals and birds. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 375(1789), 20190054. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0054>
- 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>
- Noordzij, J. P., & Ossoff, R. H. (2006). Anatomy and physiology of the larynx. *Otolaryngol Clin North Am*, 39(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.otc.2005.10.004>
- Nudel, R., & Newbury, D. F. (2013). FOXP2. *Wiley Interdiscip Rev Cogn Sci*, 4(5), 547–560. <https://doi.org/10.1002/wcs.1247>
- 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. *J Anat*, 172, 1–15.
- Ogawa, S. K., Cohen, J. Y., Hwang, D., Uchida, N., & Watabe-Uchida, M. (2014). Organization of monosynaptic inputs to the serotonin and dopamine neuromodulatory systems. *Cell Rep*, 8(4), 1105–1118. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.042>

- 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. *Neurosci Res*, 62(4), 286–298. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2008.10.004>
- Oku, Y., Masumiya, H., & Okada, Y. (2007). Postnatal developmental changes in activation profiles of the respiratory neuronal network in the rat ventral medulla. *J Physiol*, 585(Pt 1), 175–186. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.138180>
- Okubo, J., Kitamura, S., Ogata, K., & Sakai, A. (1987). Localization of rabbit laryngeal motoneurons in the nucleus ambiguus. *Exp Neurol*, 96(3), 528–539. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(87\)90216-0](https://doi.org/10.1016/0014-4886(87)90216-0)
- 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>
- Onimaru, H., & Homma, I. (2003). A novel functional neuron group for respiratory rhythm generation in the ventral medulla. *J Neurosci*, 23(4), 1478–1486. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-04-01478.2003>
- Oswald, F., Klöble, P., Ruland, A., Rosenkranz, D., Hinz, B., Butter, F., Ramljak, S., Zechner, U., & Herlyn, H. (2017). The FOXP2-Driven Network in Developmental Disorders and Neurodegeneration. *Front Cell Neurosci*, 11, 212. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00212>
- Pagliardini, S., Janczewski, W. A., Tan, W., Dickson, C. T., Deisseroth, K., & Feldman, J. L. (2011). Active expiration induced by excitation of ventral medulla in adult anesthetized rats. *J Neurosci*, 31(8), 2895–2905. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5338-10.2011>
- Palazzo, E., Luongo, L., de Novellis, V., Berrino, L., Rossi, F., & Maione, S. (2010). Moving towards supraspinal TRPV1 receptors for chronic pain relief. *Mol Pain*, 6, 66. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-6-66>

- 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>
- Parvizi, J., Van Hoesen, G. W., & Damasio, A. (2000). Selective pathological changes of the periaqueductal gray matter in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 48(3), 344–353.
- 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. *J Anat*, 219(2), 217–228. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2011.01390.x>
- Patrickson, J. W., Smith, T. E., & Zhou, S. S. (1991). Motor neurons of the laryngeal nerves. *Anat Rec*, 230(4), 551–556. <https://doi.org/10.1002/ar.1092300415>
- Paxinos, G. and Watson, C. (2007) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6th Edition, Academic Press, San Diego.
- Peng, B., Jiao, Y., Zhang, Y., Li, S., Chen, S., Xu, S., Gao, P., Fan, Y., & Yu, W. (2023). Bulbospinal nociceptive ON and OFF cells related neural circuits and transmitters. *Front. Pharmacol.* 14:1159753. doi: 10.3389/fphar.2023.1159753
- Perrin-Terrin, A. S., Jeton, F., Pichon, A., Frugière, A., Richalet, J. P., Bodineau, L., & Voituren, N. (2016). The c-FOS Protein Immunohistological Detection: A Useful Tool As a Marker of Central Pathways Involved in Specific Physiological Responses In Vivo and Ex Vivo. *J Vis Exp*, (110), 53613. <https://doi.org/10.3791/53613>
- 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. *Dev Psychobiol*, 55(8), 818–828. <https://doi.org/10.1002/dev.21072>
- Petrov, T., Krukoff, T. L., & Jhamandas, J. H. (1995). Convergent influence of the central nucleus of the amygdala and the paraventricular hypothalamic

- nucleus upon brainstem autonomic neurons as revealed by c-fos expression and anatomical tracing. *J Neurosci Res*, 42(6), 835–845. <https://doi.org/10.1002/jnr.490420612>
- Peyron, C., Rampon, C., Petit, J. M., & Luppi, P. H. (2018). Sub-regions of the dorsal raphé nucleus receive different inputs from the brainstem. *Sleep Med*, 49, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2018.07.002>
- Pisanski, A., & Pagliardini, S. (2019). The parafacial respiratory group and the control of active expiration. *Physiol Neurobiol*, 265, 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2018.06.010>
- Pollak-Dorocic, I., Fürth, D., Xuan, Y., Johansson, Y., Pozzi, L., Silberberg, G., Carlén, M., & Meletis, K. (2014). A whole-brain atlas of inputs to serotonergic neurons of the dorsal and median raphe nuclei. *Neuron*, 83(3), 663–678. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.002>
- Portillo, F., & Pásaro, R. (1988). Location of motoneurons supplying the intrinsic laryngeal muscles of rats. Horseradish peroxidase and fluorescence double-labeling study. *Brain Behav Evol*, 32(4), 220–225. <https://doi.org/10.1159/000116549>
- Ramirez, J. M., Schwarzacher, S. W., Pierrefiche, O., Olivera, B. M., & Richter, D. W. (1998). Selective lesioning of the cat pre-Bötzinger complex in vivo eliminates breathing but not gasping. *J Physiol*, 507(3), 895–907. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.895bs.x>
- Ramón y Cajal, S. (1909). *Histologie du Systeme Nerveux de l'homme et des vertebres*. Vol. 1. Paris: Maloine. p 747–750.
- Redgrave, P., Dean, P., Mitchell, I. J., Odekunle, A., & Clark, A. (1988). The projection from superior colliculus to cuneiform area in the rat. I. Anatomical studies. *Exp Brain Res*, 72(3), 611–625. <https://doi.org/10.1007/BF00250606>
- 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>
- Resstel, L. B., Lisboa, S. F., Aguiar, D. C., Corrêa, F. M., & Guimarães, F. S. (2008). Activation of CB1 cannabinoid receptors in the dorsolateral periaqueductal gray reduces the expression of contextual fear conditioning in rats. *Psychopharmacology*, 198(3), 405–411.
<https://doi.org/10.1007/s00213-008-1156-1>
- 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. *J Med Genet*, 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*, 29(1), 58–71. <https://doi.org/10.1152/physiol.00035.2013>
- Riede T. (2013). Stereotypic laryngeal and respiratory motor patterns generate different call types in rat ultrasound vocalization. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol*, 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. *R Soc Open Sci*, 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. *J Neurophysiol*, 123(3), 966–979. <https://doi.org/10.1152/jn.00590.2019>
- Riede, T., Thomson, S. L., Titze, I. R., & Goller, F. (2019). The evolution of the syrinx: An acoustic theory. *PLoS biology*, 17(2), e2006507.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006507>
- Riede, T., Zhao, Y., & LeDoux, M. S. (2015). Vocal development in dystonic rats. *Physiol Rep*, 3(4), e12350. <https://doi.org/10.14814/phy2.12350>

- Risold, P. Y., Canteras, N. S., & Swanson, L. W. (1994). Organization of projections from the anterior hypothalamic nucleus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *J Comp Neurol*, 348(1), 1–40. <https://doi.org/10.1002/cne.903480102>
- Roberts, L.H. (1975). Evidence for the laryngeal source of ultrasonic and audible cries of rodents. *J. Zool.* 175:243–257. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1975.tb01399.x>
- Robertson, S. D., Plummer, N. W., de Marchena, J., & Jensen, P. (2013). Developmental origins of central norepinephrine neuron diversity. *Nat Neurosci*, 16(8), 1016–1023. <https://doi.org/10.1038/nn.3458>
- 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>
- Roncon, C. M., Yamashita, P. S. M., Frias, A. T., Audi, E. A., Graeff, F. G., Coimbra, N. C., et al. (2017). m-Opioid and 5-HT1A receptors in the dorsomedial hypothalamus interact for the regulation of panic-related defensive responses. *J Psychopharmacol*, 31(6), 715–721. <https://doi.org/10.1177/0269881117693747>
- Rosin, D. L., Chang, D. A., & Guyenet, P. G. (2006). Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus. *J Comp Neurol*, 499(1), 64–89. <https://doi.org/10.1002/cne.21105>
- Rübsamen, R., & Schweizer, H. (1986). Control of echolocation pulses by neurons of the nucleus ambiguus in the rufous horseshoe bat, *Rhinolophus rouxi*. II. Afferent and efferent connections of the motor nucleus of the laryngeal nerves. *J Comp Physiol A*, 159(5), 689–699. <https://doi.org/10.1007/BF00612041>
- Samineni, V. K., Grajales-Reyes, J. G., Copits, B. A., O'Brien, D. E., Trigg, S. L., Gomez, A. M., Bruchas, M. R., & Gereau, R. W. (2017). Divergent modulation of nociception by glutamatergic and GABAergic neuronal

- subpopulations in the periaqueductal gray. *eNeuro* 4:ENEURO.0129-16.2017. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0129-16.2017>
- 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. *J Physiol*, 538(Pt 3), 941–946. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.013302>
- Samuels, B. C., Zaretsky, D. V., & DiMicco, J. A. (2004). Dorsomedial hypothalamic sites where disinhibition evokes tachycardia correlate with location of raphe-projecting neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 287(2), R472–R478. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00667.2003>
- Saran, M., Georgakopoulos, B., & Bordoni, B. (2023). Anatomy, Head and Neck, Larynx Vocal Cords. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Sasaki, C. T., & Isaacson, G. (1988). Functional anatomy of the larynx. *Otolaryngol Clin North Am*, 21(4), 595–612.
- Sasaki, C. T., Fukuda, H., & Kirchner, J. A. (1973). Laryngeal abductor activity in response to varying ventilatory resistance. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*, 77(6), ORL403–ORL410.
- Schadt, C. R., Cox, K. L., Tramontana, M. G., Byrne, D. W., Davis, T. L., Fang, J. Y., Konrad, P. E., Padaliya, B., Mutter, R. W., Gill, C. E., Richardson, C. R., & Charles, P. D. (2006). Depression and intelligence in patients with Parkinson's disease and deep-brain stimulation. *J Natl Med Assoc*, 98(7), 1121–1125.
- Schmidt, M. F., & Martin Wild, J. (2014). The respiratory-vocal system of songbirds: anatomy, physiology, and neural control. *Prog Brain Res*, 212, 297–335. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63488-7.00015-X>
- Schottelkotte, K. M., and Crone, S. A. (2022). Forebrain control of breathing: Anatomy and potential functions. *Front. Neurol.* 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. *Exp Brain Res*, 79(1), 192–206. <https://doi.org/10.1007/BF00228889>
- Schulz, S. B., Haesler, S., Scharff, C., & Rochefort, C. (2010). Knockdown of FoxP2 alters spine density in Area X of the zebra finch. *Genes Brain Behav*, 9(7), 732–740. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2010.00607.x>
- Schwarz, L. A., & Luo, L. (2015). Organization of the locus coeruleus-norepinephrine system. *Curr Biol*, 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*, 134(1), 24–35. <https://doi.org/10.1093/brain/awq327>
- Semenenko, F. M., & Lumb, B. M. (1992). Projections of anterior hypothalamic neurones to the dorsal and ventral periaqueductal grey in the rat. *Brain Res*, 582(2), 237–245. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90139-z](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90139-z)
- Shannon, R., & Freeman, D. (1981). Nucleus retroambigualis respiratory neurons: responses to intercostal and abdominal muscle afferents. *Respir Physiol*, 45(3), 357–375. [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(81\)90018-9](https://doi.org/10.1016/0034-5687(81)90018-9)
- 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)
- Shiba, K., Umezaki, T., Zheng, Y., & Miller, A. D. (1997). The nucleus retroambigualis controls laryngeal muscle activity during vocalization in the cat. *Exp Brain Res*, 115(3), 513–519. <https://doi.org/10.1007/pl00005721>
- Shinozaki, Y., Yokota, S., Miwakeichi, F., Pokorski, M., Aoyama, R., Fukuda, K., Yoshida, H., Toyama, Y., Nakamura, M., & Okada, Y. (2019). Structural and functional identification of two distinct inspiratory neuronal populations at the level of the phrenic nucleus in the rat cervical spinal cord. *Brain Struct Funct*, 224(1), 57–72. <https://doi.org/10.1007/s00429-018-1757-3>

- 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. *Proc Natl Acad Sci USA*, *102*(27), 9643–9648. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503739102>
- Shu, W., Yang, H., Zhang, L., Lu, M. M., & Morrissey, E. E. (2001). Characterization of a new subfamily of winged-helix/forkhead (Fox) genes that are expressed in the lung and act as transcriptional repressors. *J Biol Chem*, *276*(29), 27488–27497. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100636200>
- Siegfried, B., & de Souza, R. L. (1989). NMDA receptor blockade in the periaqueductal grey prevents stress-induced analgesia in attacked mice. *Eur J Pharmacol*, *168*(2), 239–242. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(89\)90570-0](https://doi.org/10.1016/0014-2999(89)90570-0)
- Sillery, E., Bittar, R. G., Robson, M. D., Behrens, T. E., Stein, J., Aziz, T. Z., & Johansen-Berg, H. (2005). Connectivity of the human periventricular-periaqueductal gray region. *J Neurosurg*, *103*(6), 1030–1034. <https://doi.org/10.3171/jns.2005.103.6.1030>
- Silva-Carvalho, L., Dawid-Milner, M. S., Goldsmith, G. E., & Spyer, K. M. (1995). Hypothalamic modulation of the arterial chemoreceptor reflex in the anaesthetized cat: role of the nucleus tractus solitarii. *J physiol*, *487* (3), 751–760. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1995.sp020915>
- Silva, J. N., Lucena, E. V., Silva, T. M., Damasceno, R. S., Takakura, A. C., & Moreira, T. S. (2016b). 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, J. N., Oliveira, L. M., Souza, F. C., Moreira, T. S., & Takakura, A. C. (2019). Distinct pathways to the parafacial respiratory group to trigger active expiration in adult rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *317*(3), L402–L413. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00467.2018>

- Silva, J. N., Tanabe, F. M., Moreira, T. S., & Takakura, A. C. (2016a). Neuroanatomical and physiological evidence that the retrotrapezoid nucleus/parafacial region regulates expiration in adult rats. *Respir Physiol Neurobiol*, 227, 9–22. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2016.02.005>
- 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. *Mol Metab*, 55, 101401. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101401>
- 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. *J Neurophysiol*, 98(6), 3370–3387. <https://doi.org/10.1152/jn.00985.2007>
- Smith, J. C., Ellenberger, H. H., Ballanyi, K., Richter, D. W., & Feldman, J. L. (1991). Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science*, 254(5032), 726–729. <https://doi.org/10.1126/science.1683005>
- 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 Struct Funct*, 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. *J Neurosci*, 26(1), 300–310. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3029-05.2006>
- Spiteri, E., Konopka, G., Coppola, G., Bomar, J., Oldham, M., Ou, J., Vernes, S. C., Fisher, S. E., Ren, B., & Geschwind, D. H. (2007). Identification of the transcriptional targets of FOXP2, a gene linked to speech and language, in developing human brain. *Am J Hum Genet*, 81(6), 1144–1157. <https://doi.org/10.1086/522237>

- 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. *Respir Physiol Neurobiol*, 250, 14–18. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2018.01.014>
- Subramanian, H. H., & Holstege, G. (2009). The nucleus retroambiguus control of respiration. *J Neurosci*, 29(12), 3824–3832. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0607-09.2009>
- Subramanian, H. H., & Holstege, G. (2010). Periaqueductal gray control of breathing. *Adv Exp Med Biol*, 669, 353–358. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5692-7_72
- Subramanian, H. H., & Holstege, G. (2013). Stimulation of the midbrain periaqueductal gray modulates preinspiratory neurons in the ventrolateral medulla in the rat in vivo. *J Comp Neurol*, 521(13), 3083–3098. <https://doi.org/10.1002/cne.23334>
- Subramanian, H. H., & Holstege, G. (2014). 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*, 212, 351–384. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63488-7.00017-3>
- Subramanian, H. H., Balnave, R. J., & Holstege, G. (2008). The midbrain periaqueductal gray control of respiration. *J Neurosci*, 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. *J Voice*, 35(5), 804.e9–804.e25. <https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2020.01.022>
- Svec, J. G., Sram, F., & Schutte, H. K. (2007). Videokymography in voice disorders: what to look for?. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 116(3), 172–180. <https://doi.org/10.1177/000348940711600303>
- Swanson L. W. (2000). Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. *Brain Res*, 886(1-2), 113–164. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02905-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02905-X)

- Swenson, R. S., & Castro, A. J. (1983). The afferent connections of the inferior olivary complex in rats: a study using the retrograde transport of horseradish peroxidase. *Am J Anat*, 166(3), 329–341. <https://doi.org/10.1002/aja.1001660307>
- Tan, W., Janczewski, W. A., Yang, P., Shao, X. M., Callaway, E. M., & Feldman, J. L. (2008). Silencing preBötzinger complex somatostatin-expressing neurons induces persistent apnea in awake rat. *Nat Neurosci*, 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 preBötzinger complex neurons in adult rats. *J Comp Neurol*, 518(10), 1862–1878. <https://doi.org/10.1002/cne.22308>
- Tassorelli, C., & Joseph, S. A. (1995). Systemic nitroglycerin induces Fos immunoreactivity in brainstem and forebrain structures of the rat. *Brain Res*, 682(1-2), 167–181. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00348-t](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00348-t)
- Thiessen, D. D., Kittrell, E. M., & Graham, J. M. (1980). Biomechanics of ultrasound emissions in the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Behav Neural Biol*, 29(4), 415–429. [https://doi.org/10.1016/s0163-1047\(80\)92597-2](https://doi.org/10.1016/s0163-1047(80)92597-2)
- Thoby-Brisson, M., Karlén, M., Wu, N., Charnay, P., Champagnat, J., & Fortin, G. (2009). Genetic identification of an embryonic parafacial oscillator coupling to the preBötzinger complex. *Nat Neurosci*, 12(8), 1028–1035. <https://doi.org/10.1038/nn.2354>
- 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. *J Speech Lang Hear Res*, 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. *J Speech Lang Hear Res*, 52(3), 802–811. [https://doi.org/10.1044/1092-4388\(2008/08-0087\)](https://doi.org/10.1044/1092-4388(2008/08-0087))

- Tian, G. F., Peever, J. H., & Duffin, J. (1998). Bötzinger-complex expiratory neurons monosynaptically inhibit phrenic motoneurons in the decerebrate rat. *Exp Brain Res*, 122(2), 149–156. <https://doi.org/10.1007/s002210050502>
- Titze I. R. (1989). On the relation between subglottal pressure and fundamental frequency in phonation. *J Acoust Soc Am*, 85(2), 901–906. <https://doi.org/10.1121/1.397562>
- Titze, I. R. (1988). Regulation of vocal power and efficiency by subglottal pressure and glottal width. In: Fujimura O, editor. *Vocal physiology: voice production, mechanisms and functions*. New York: Raven Press; p. 227–37.
- Titze, I. R., Jiang, J. J., & Hsiao, T. Y. (1993). Measurement of mucosal wave propagation and vertical phase difference in vocal fold vibration. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 102(1), 58–63. <https://doi.org/10.1177/000348949310200111>
- Titze, I. R., Story, B. H., Burnett, G. C., Holzrichter, J. F., Ng, L. C., & Lea, W. A. (2000). Comparison between electroglottography and electromagnetic glottography. *J Acoust Soc Am*, 107(1), 581–588. <https://doi.org/10.1121/1.428324>
- Titze, I.R, Riede, T., & Mau, T. (2016). Predicting Achievable Fundamental Frequency Ranges in Vocalization Across Species. *PLoS Comput Biol*, 12(6), e1004907. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004907>
- 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. *J Neurosci*, 39(49), 9757–9766. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0502-19.2019>
- 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. *J Anat*, 232(2), 227–237. <https://doi.org/10.1111/joa.12743>

- Tovote, P. (2016). Midbrain circuits for defensive behaviour. *Nature* 534:206-12. doi:10.1038/nature17996
- 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. *J Comp Neurol*, 529(9), 2243–2264. <https://doi.org/10.1002/cne.25091>
- Trevizan-Baú, P., Furuya, W. I., Mazzone, S. B., Stanic, D., Dhingra, R. R., and Dutschmann, M. (2021b). Reciprocal connectivity of the periaqueductal gray with the ponto-medullary respiratory network in rat. *Brain Res.* 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., Takato, 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>
- 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. *Am J Med Genet A*, 161A(9), 2321–2326. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36055>
- Uludag, M., Aygun, N., & Isgor, A. (2017). The functional role of the pharyngeal plexus in vocal cord innervation in humans. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 274(2), 1121–1128. <https://doi.org/10.1007/s00405-016-4369-7>
- Umezaki, T., Zheng, Y., Shiba, K., & Miller, A. D. (1997). Role of nucleus retroambiguus in respiratory reflexes evoked by superior laryngeal and

- vestibular nerve afferents and in emesis. *Brain Res*, 769(2), 347–356.
[https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(97\)00756-7](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(97)00756-7)
- 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. *Biol Psychiatry*, 81(3), 220–230.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.02.008>
- Vagg, D. J., Bandler, R., & Keay, K. A. (2008). Hypovolemic shock: critical involvement of a projection from the ventrolateral periaqueductal gray to the caudal midline medulla. *Neuroscience*, 152(4), 1099–1109.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.10.070>
- Van Daele, D. J., & Cassell, M. D. (2009). Multiple forebrain systems converge on motor neurons innervating the thyroarytenoid muscle. *Neuroscience*, 162(2), 501–524.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.05.005>
- Van der Heijden, M. E., & Zoghbi, H. Y. (2020). Development of the brainstem respiratory circuit. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 9(3), e366.
<https://doi.org/10.1002/wdev.366>
- Van Houtte, E., Van Lierde, K., & Claeys, S. (2011). Pathophysiology and treatment of muscle tension dysphonia: a review of the current knowledge. *J Voice*, 25(2), 202–207.
<https://doi.org/10.1016/j.jvoice.2009.10.009>
- VanderHorst, V. G., Terasawa, E., & Ralston, H. J., 3rd (2001). Monosynaptic projections from the nucleus retroambiguus region to laryngeal motoneurons in the rhesus monkey. *Neuroscience*, 107(1), 117–125.
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(01\)00343-8](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(01)00343-8)
- 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. *J Comp Neurol*, 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)

- 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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(21), 12695–12700. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.21.12695>
- Vaughn, E., Eichhorn, S., Jung, W., Zhuang, X., and Dulac, C. (2022). Threedimensional interrogation of cell types and instinctive behavior in the periaqueductal gray. *bioRxiv* 2022.06.27.497769, <https://doi.org/10.1101/2022.06.27.497769>
- Vázquez-León, P., Miranda-Páez, A., Valencia-Flores, K., & Sánchez-Castillo, H. (2023). Defensive and Emotional Behavior Modulation by Serotonin in the Periaqueductal Gray. *Cell Mol Neurobiol*, 43(4), 1453–1468. <https://doi.org/10.1007/s10571-022-01262-z>
- 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 Genet*, 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. *Braz J Med Biol Res*, 36(5), 557–566. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2003000500002>
- Wallen-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. *J Neurosci*, 26(47), 12294–12307. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3855-06.2006>

- Wang, X., Guo, R., Zhao, W., & Pilowsky, P. M. (2016). Medullary mediation of the laryngeal adductor reflex: A possible role in sudden infant death syndrome. *Respir Physiol Neurobiol*, 226, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2016.01.002>
- 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. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 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. *Curr Opin Physiol*, 10, 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2019.04.023>
- Wetzel, D. M., Kelley, D. B., & Campbell, B. A. (1980). Central control of ultrasonic vocalizations in neonatal rats: I. Brain stem motor nuclei. *J Comp Physiol Psychol*, 94(4), 596–605. <https://doi.org/10.1037/h0077699>
- Wu, J., Capelli, P., Bouvier, J., Goulding, M., Arber, S., & Fortin, G. (2017). A V0 core neuronal circuit for inspiration. *Nat Commun*, 8(1), 544. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00589-2>
- Xie, Z., Gu, H., Huang, M., Cheng, X., Shang, C., Tao, T., et al. (2022). Mechanically evoked defensive attack is controlled by GABAergic neurons in the anterior hypothalamic nucleus. *Nat. Neurosci.* 25, 72–85. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00985-4>
- 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>
- Yang, C. F., & Feldman, J. L. (2018). Efferent projections of excitatory and inhibitory preBötzinger Complex neurons. *J Comp Neurol*, 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. *Front Neuroanat*, 14, 58. <https://doi.org/10.3389/fnana.2020.00058>

- 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. *J Auton Nerv Syst*, 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. *J Comp Neurol*, 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. *J Comp Neurol*, 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 Res*, 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. *Neurosci Res*, 59(3), 341–346. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2007.08.004>
- Yokota, S., Tsumori, T., Ono, K., & Yasui, Y. (2001). Phrenic motoneurons receive monosynaptic inputs from the Kölliker-Fuse nucleus: a light- and electron-microscopic study in the rat. *Brain Res*, 888(2), 330–335. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)03106-1](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)03106-1)
- Yoshida, Y., Mitsumasu, T., Hirano, M., & Kanaseki, T. (1985). Somatotopic representation of the laryngeal motoneurons in the medulla of monkeys. *Acta Otolaryngol*, 100(3-4), 299–303. <https://doi.org/10.3109/00016488509104792>
- Yoshida, Y., Miyazaki, T., Hirano, M., Shin, T., & Kanaseki, T. (1982). Arrangement of motoneurons innervating the intrinsic laryngeal muscles of cats as

- demonstrated by horseradish peroxidase. *Acta Otolaryngol* 94:329–334.
<https://doi.org/10.3109/00016488209128920>
- 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 Otolaryngol Supp. 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. *Neurosci Bull*, 38(2), 149–165. <https://doi.org/10.1007/s12264-021-00742-4>
- 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, 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. *Front Neurosci*, 18, 1380171. <https://doi.org/10.3389/fnins.2024.1380171>
- Zhang, S. P., Davis, P. J., Bandler, R., & Carrive, P. (1994). Brain stem integration of vocalization: role of the midbrain periaqueductal gray *J Neurophysiol*, 72(3), 1337–1356.
<https://doi.org/10.1152/jn.1994.72.3.1337>
- Zhang, W., Hayward, L. F., & Davenport, P. W. (2007). Respiratory responses elicited by rostral versus caudal dorsal periaqueductal gray stimulation in rats. *Auton Neurosci*, 134(1-2), 45–54.
<https://doi.org/10.1016/j.autneu.2007.02.003>
- Zhang, Y., Zheng, X., & Xue, Q. (2020). A Deep Neural Network Based Glottal Flow Model for Predicting Fluid-Structure Interactions during Voice Production. *Appl Sci (Basel)*, 10(2), 705.
<https://doi.org/10.3390/app10020705>

- 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 Res*, 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)
- 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. *J Neurophysiol*, 117(3), 1030–1042. <https://doi.org/10.1152/jn.00591.2016>



9.1. ANEXO 1. ABREVIATURAS

CML, Corteza Motora Laríngea
cPB, Complejo Parabraquial
GRD, Grupo Respiratorio Dorsal
GRP, Grupo Respiratorio Pontino
GRV, Grupo Respiratorio Ventral
GRVc, Grupo Respiratorio Ventral Caudal
GRVr, Grupo Respiratorio Ventral Rostral
KF, Núcleo Kölliker-Fuse nucleus
nA, núcleo Ambiguo
nRA, núcleo RetroAmbiguo
NTS, Núcleo del Tracto Solitario
PB, Parabraquial
PBl, Parabraquial lateral
PBm-KF, Parabraquial medial y núcleo Kölliker-Fuse
PBm, Parabraquial medial
SGP, Sustancia Gris Periacueductal
SGPdl, Sustancia Gris Periacueductal dorsolateral
SGPl, Sustancia Gris Periacueductal lateral
SGPvl, Sustancia Gris Periacueductal ventrolateral
SGPdm, Sustancia Gris Periacueductal dorsomedial

9.2. ANEXO 2. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Esquema de las principales regiones mesencefálicas y pontomedulares implicadas en el control cardiorrespiratorio y laríngeo.....	40
Figura 2. Desarrollo de la laringe.....	42
Figura 3. Cartílagos laríngeos.....	44
Figura 4a. Musculatura extrínseca de la laringe (músculos suprahioides).....	46
Figura 4b. Musculatura extrínseca de la laringe (músculos infrahioides)	47
Figura 5. Musculatura intrínseca de la laringe.....	48
Figura 6. Inervación de la laringe.....	51
Figura 7. Esquema de las cuerdas vocales.....	52
Figura 8. Aferencias y Eferencias de las diferentes subregiones de la SGP.....	70
Figura 9. Ubicación de las motoneuronas laríngeas y faciales dentro del tronco encefálico.....	85
Tabla 1. Protocolo experimental de estimulación y anestesia en el estudio de la expresión de c-Fos/TH, FoxP2/TH y cFos/FoxP2.....	110
Tabla 2. Cuantificación relativa y distribución de neuronas que presentaban inmunoreactividad a c-Fos y FoxP2 (cFos-ir y FoxP2-ir) en el nA.....	132
Figura 10. Fotomicrografías de secciones coronales de la médula oblonga....	133
Figura 11. Inmunofluorescencia doble de células del nA a 63x de aumento.....	134
Tabla 3. Cuantificación de las neuronas registradas mediante registro extracelular unitario en las distintas regiones del nA y regiones adyacentes....	143
Figura 12. Dibujo esquemático de secciones parasagitales del cerebro de rata.....	144
Figura 13. Registro de tres neuronas con modulación respiratoria.....	145
Figura 14. Registro de neurona espiratoria E1.....	146
Figura 15. Registro de neurona con modulación cardiovascular.....	147
Figura 16. Localización de las zonas de la SGPdl estimuladas eléctricamente	149
Figura 17. SGPdl (estimulación eléctrica).....	150
Figura 18. Registro de presión subglótica, flujo respiratorio y presión pleural...	151
Tabla 4. Parámetros laríngeos y cardiorrespiratorios medidos antes (Reposo), durante (Estimulación) y 4 minutos después de la estimulación eléctrica en la SGPdl (Recuperación).....	152

Figura 19. Cambios respiratorios y respuesta laríngea tras estimulación eléctrica de SGPdl.....	153
Figura 20. Cambios cardiovasculares tras estimulación eléctrica de SGPdl....	154
Figura 21. Localización microinyección de PBS y glutamato dentro de la SGPdl.....	158
Figura 22. SGPdl (estimulación con glutamato).....	159
Tabla 5. Parámetros laríngeos y cardiorrespiratorios medidos antes (Reposo), durante (Estimulación) y 30 minutos después de la microinyección de PBS en la SGPdl (Recuperación).....	160
Tabla 6. Parámetros laríngeos y cardiorrespiratorios medidos antes (Reposo), durante (Estimulación) y 30 minutos después de la microinyección de glutamato en la SGPdl (Recuperación).....	161
Figura 23. Cambios respiratorios y respuesta laríngea tras estimulación química de SGPdl.....	162
Figura 24. Cambios cardiovasculares tras estimulación química de SGPdl...	163

9.2. ANEXO 3. PUBLICACIONES QUE AVALAN LA TESIS DOCTORAL

PUBLICACIÓN 1

González-García M, Carrillo-Franco L, Morales-Luque C, Ponce-Velasco M, Gago B, Dawid-Milner MS y López-González MV. Uncovering the neural control of laryngeal activity and subglottic pressure in anaesthetized rats: insights from mesencephalic regions. *Pflugers Arch.* **2024**. Advance online publication. doi: 10.1007/s00424-024-02976-3.

Abstract. To assess the possible interactions between the dorsolateral Periaqueductal Gray matter (dIPAG) and the different domains of the nucleus Ambiguus (nA), we have examined the pattern of double staining c-Fos/FoxP2 protein immunoreactivity (c-Fos-ir/FoxP2-ir) and Tyrosine Hydroxylase (TH) throughout the rostro-caudal extent of nA in spontaneously breathing anaesthetised male Sprague–Dawley rats during dIPAG electrical stimulation. Activation of the dIPAG elicited a selective increase in c-Fos-ir with an ipsilateral predominance in the somatas of the loose ($p < 0.05$) and compact formation ($p < 0.01$) within the nA and confirm the expression of FoxP2 bilaterally in all the domains within the nA. A second group of experiments was made to examine the importance of the dIPAG in modulating the laryngeal response evoked after electrical or chemical (glutamate) dIPAG stimulations. Both electrical and chemical stimulations evoked a significant decrease of laryngeal resistance (subglottal pressure) ($p < 0.001$) accompanied with an increase in respiratory rate together with a pressor and tachycardic response. The results of our study contribute with new data on the role of the mesencephalic neuronal circuits in the control mechanisms of subglottic pressure and laryngeal activity.

PUBLICACIÓN 2

González-García M, Carrillo-Franco L, Morales-Luque C, Dawid-Milner MS, López-González MV. Central Autonomic Mechanisms Involved in the Control of Laryngeal Activity and Vocalization. *Biology (Basel)*. **2024**;13(2):118. doi:10.3390/biology13020118

Abstract. In humans, speech is a complex process that requires the coordinated involvement of various components of the phonatory system, which are monitored by the central nervous system. The larynx in particular plays a crucial role, as it enables the vocal folds to meet and converts the exhaled air from our lungs into audible sounds. Voice production requires precise and sustained exhalation, which generates an air pressure/flow that creates the pressure in the glottis required for voice production. Voluntary vocal production begins in the laryngeal motor cortex (LMC), a structure found in all mammals, although the specific location in the cortex varies in humans. The LMC interfaces with various structures of the central autonomic network associated with cardiorespiratory regulation to allow the perfect coordination between breathing and vocalization. The main subcortical structure involved in this relationship is the mesencephalic periaqueductal grey matter (PAG). The PAG is the perfect link to the autonomic pontomedullary structures such as the parabrachial complex (PBc), the Kölliker-Fuse nucleus (KF), the nucleus tractus solitarius (NTS), and the nucleus retroambiguus (nRA), which modulate cardiovascular autonomic function activity in the vasomotor centers and respiratory activity at the level of the generators of the laryngeal-respiratory motor patterns that are essential for vocalization. These cores of autonomic structures are not only involved in the generation and modulation of cardiorespiratory responses to various stressors but also help to shape the cardiorespiratory motor patterns that are important for vocal production. Clinical studies show increased activity in the central circuits responsible for vocalization in certain speech disorders, such as spasmodic dysphonia because of laryngeal dystonia.

PUBLICACIÓN 3

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

Abstract. Connections between the midbrain dorsolateral periaqueductal grey (dIPAG) and the pontine A5 region have been shown. The stimulation of both regions evokes similar cardiovascular responses: tachycardia and hypertension. Accordingly, we have studied the interactions between dIPAG and A5 region in spontaneously breathing anesthetized rats. dIPAG was electrically stimulated (20-30 μ A 1-ms pulses were given for 5 s at 100 Hz). Changes in the evoked cardiorespiratory response were analysed before and after ipsilateral microinjections of muscimol (GABAergic agonist, 50 nl, 0.25 nmol, 5 s) within the A5 region. Electrical stimulation of the dIPAG produces, in the rat, a response characterized by tachypnoea ($p < 0.001$), hypertension ($p < 0.001$) and tachycardia ($p < 0.001$). The increase in respiratory rate was due to a decrease in expiratory time ($p < 0.01$). Pharmacological inhibition of the A5 region with muscimol produced a marked reduction of the tachycardia ($p < 0.001$) and the tachypnoea ($p < 0.01$) evoked from the dIPAG. Finally, to assess functional interactions between A5 and dIPAG, extracellular activity of putative A5 neurones were recorded during dIPAG electrical stimulation. Forty A5 cells were recorded, 16 of which were affected by dIPAG stimulation (40%). 4 cells showed activation, 5 cells excitation and 7 cells decreased spontaneous activity to dIPAG stimulation ($p < 0.001$). These results confirm a link between the A5 region and dIPAG. The potential role of these connections in the modulation of dIPAG evoked cardiorespiratory responses and their possible clinical implications are discussed.



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA