

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISILOGIA E FARMACOLOGIA

**Participação do colículo superior e inferior na
organização de uma resposta simpática,
respiratória e somatomotora sincronizada**

Doutoranda: Flávia Camargos de Figueirêdo Müller Ribeiro

Orientador: Prof. Marco Antônio Peliky Fontes

Co-orientador: Roger Dampney/ Ann Goodchild

BELO HORIZONTE

2014

FLÁVIA CAMARGOS DE FIGUEIRÊDO MÜLLER RIBEIRO

**Participação do colículo superior e inferior na organização de
uma resposta simpática, respiratória e somatomotora
sincronizada**

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Fisiologia e Farmacologia do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Minas Gerais para obtenção do
Título de Doutor em Ciências Biológicas,
área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Prof. Marco Antônio Peliky Fontes

**BELO HORIZONTE
2014**

AGRADECIMENTOS

À Deus, por se fazer presente em cada segundo da minha vida e por me dar a certeza de que sempre estive no controle de tudo. Agradeço por fazer com que a minha caminhada na ciência fosse exatamente como a sua vontade; BOA, PERFEITA E AGRADÁVEL.

Aos meus pais, Franz e Mônica, amores da minha vida, que sempre me apoiaram e me incentivaram em todas as decisões. Palavras não são suficientes para expressar toda a minha gratidão. Eu não poderia ter ido tão longe sem o amor incondicional e palavras de incentivo de vocês.

Aos meus irmãos, Frederico, Franz e Barbara por sempre torcerem por mim. Vocês são minha alegria de viver.

Ao meu namorado Eduardo, por toda sua compreensão durante o período que ficamos longe um do outro. Mesmo com toda a distância, você sempre foi presente na minha vida. Obrigada por todo o amor, incentivo e paciência.

Ao meu querido orientador, Marco Antônio Fontes, pela orientação e por se fazer presente durante esses 4 anos de doutorado. Não seria possível alcançar essa vitória sem o seu apoio e confiança sempre. Essa conquista é o reflexo do seu incentivo constante e todo o aprendizado ao longo desses anos.

Ao Professor Roger Dampney, que abriu as portas do seu laboratório sem ao menos me conhecer. Uma pessoa ilustre no mundo da pesquisa que eu até então sonhava um dia em conhecer. Até hoje não consigo acreditar como tudo caminhou perfeitamente para que eu viesse a ter o privilégio de conhecer e trabalhar com uma pessoa tão incrível. Obrigada por acreditar em mim, por todos os ensinamentos e oportunidades.

À professora Ann Goodchild, uma co-orientadora maravilhosa que foi fundamental nesse doutorado. Sem a sua colaboração, idéias e apoio constante, essa conquista não teria acontecido. Obrigada por me ensinar a buscar sempre o melhor de mim.

À todos os Goodchildren; Belinda, Suead, Phill, Sarah, Lindsay e Sophie. Não teria alcançado essa vitória sem a amizade, carinho e ajuda de vocês! Vocês são o melhor grupo de pesquisa que eu tive o privilégio de trabalhar! Vou guardar sempre no coração os momentos inesquecíveis que vivemos juntos. Em especial à Belinda, uma pessoa linda que se tornou uma verdadeira amiga, vizinha e irmã.

Aos japoneses Kamon Iigaya e Joji Horiuchi, por toda a ajuda e por terem sido os primeiros a me ensinar a técnica perfeita do registro de atividade simpática e respiratória.

Aos amigos maravilhosos que conheci na Austrália, onde deixei parte do meu coração. VJ, Melissa Tallapragada, Bowen, Ibrahim, Marie-Ange, Melissa Inglott, Anita, Kayla, Vivienne, Marina, Selina, Steph, Lucia, Francesca, nunca esquecerei de nossas conversas durante experimentos e dos momentos de diversão e dificuldade dentro ou fora do lab. Todos vocês contribuíram de uma certa forma para realização deste trabalho. Espero reencontrá-los novamente em algum lugar desse mundo.

Aos queridos amigos Andreia, Thomas e agora o pequeno Enzo Fiedler, família maravilhosa que me encantou. Obrigada por tudo que fizeram por mim, principalmente pelo carinho e amizade.

Aos amigos da célula, por se fazerem presentes na minha vida sempre em orações.

Às amigas Pri, Gigi, Natália Machado, Érica, Nívia e Letícia, obrigada pelas nossas longas conversas e por me manterem firme nos momentos alegres e difíceis. Como dizia Vinícius de Moraes: "A gente não faz amigos, reconhece-os."

Aos professores do Laboratório de Hipertensão, Andrea Haibara, Maria José Campagnole e Robson Santos, à vocês o meu respeito e admiração.

Aos colegas do Laboratório de Hipertensão, obrigada por fazerem os momentos divididos na sala de cirurgia e sala de experimento mais divertidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior por ter financiado minha bolsa de pesquisa e o período sanduíche na Austrália.

Resumo

O colículo superior (SC) e colículo inferior (IC) estão envolvidos na geração de respostas comportamentais e cardiovasculares ao estímulo visual ou auditivo de ameaça. Neste estudo, investigamos a possibilidade de existirem neurônios comando no SC e IC que podem simultaneamente gerar respostas simpáticas e respiratórias. Em ratos anestesiados com uretana, a microinjeção de bicuculina (50 pmol/ 50 nL) em sítios específicos, produziu uma resposta caracterizada por disparos de atividade simpática do nervo renal (RSNA) e atividade do nervo frênico (PNA) altamente sincronizados. Os disparos de RSNA e PNA foram acompanhados de aumentos na pressão arterial (PA) e a maioria dos casos na frequência cardíaca (FC). Disparos sincronizados de RSNA e PNA também foram observados após o bloqueio neuromuscular, ventilação artificial e vagotomia, mostrando que estes não eram dependentes do feedback aferente dos pulmões. Em posse destes resultados, nós testamos a hipótese de que em condições onde neurônios coliculares são desinibidos, respostas simpática, respiratória e somatomotora coordenadas podem ser geradas por um estímulo natural do ambiente. Potentes aumentos sincronizados na atividade simpática, respiratória e somatomotora foram gerados em resposta ao estímulo auditivo, visual e somatosensorial após a desinibição de receptores GABA_A em regiões específicas do colículo superior e inferior de ratos anestesiados, mas não em condições controle. Estas respostas foram observadas após remoção de grande parte do prosencéfalo, incluindo a amígdala e hipotálamo, indicando que as vias essenciais mediando essas respostas sincronizadas estão localizadas no tronco encefálico. A relação temporal entre as variáveis analisadas, sugerem que essas respostas são geradas por uma população de neurônios comando localizados no colículo superior e inferior.

Palavras chaves: colículo superior, colículo inferior, neurônio comando, comportamento defensivo, pressão arterial, atividade simpática, atividade do nervo frênico

Abstract

The superior (SC) and inferior (IC) colliculi are believed to generate immediately cardiovascular and behavioural responses to auditory and visual threatening stimuli. In this study we examined the possibility that there are command neurons within the colliculi that can simultaneously drive sympathetic and respiratory. In urethane-anaesthetized rats, microinjections of bicuculline (50 pmol in 50 nL) into sites within a circumscribed region in the deep layers of the superior colliculus and the central and external nuclei of the inferior colliculus evoked a highly distinctive response characterized by short bursts of renal sympathetic nerve activity (RSNA) and phrenic nerve activity (PNA). The bursts of RSNA and PNA were also accompanied by transient increases in arterial pressure and, in most cases, heart rate. Synchronized bursts of RSNA and PNA were also evoked after neuromuscular blockade, artificial ventilation, and vagotomy and so were not dependent on afferent feedback from the lungs. These findings raised the hypothesis that, under conditions where collicular neurons are disinhibited, co-ordinated cardiovascular, respiratory and somatomotor responses can be evoked by natural environmental stimuli. In response to natural auditory, visual or somatosensory stimuli, powerful synchronized increases in sympathetic, respiratory and somatomotor activity were generated following blockade of GABA_A receptors in a specific region in the midbrain colliculi of anesthetized rats, but not under control conditions. Such responses still occurred after removal of most of the forebrain, including the amygdala and hypothalamus, indicating that the essential pathways mediating these coordinated responses were located within the brainstem. The temporal relationships between the different outputs suggest that they are driven by a common population of “command neurons” within the colliculi.

Key words: superior colliculus, inferior colliculus, command neuron, defensive behavior, arterial pressure, sympathetic activity, phrenic nerve activity

LISTA DE ABREVIATURAS

SC - Colículo superior

IC - Colículo inferior

SNC – Sistema nervoso central

BMI - Bicuculina metiodide

DMH - Hipotálamo dorsomedial

EAA - Aminoácidos excitatórios

PAM - Pressão arterial média

FC - Frequência cardíaca

GABA_A - Receptor para ácido gama amino butírico (subtipo A)

HPA - Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

dIPAG - Porção dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal

NMDA - Ácido N-metil-D-aspartato

PAG - Substância cinzenta periaquedutal

CnF - Núcleo cuneiforme

LPB - Núcleo parabraquial lateral

mPFC - Córtex pré-frontal medial

RVLM - Bulbo ventrolateral rostral

RVMM - Bulbo ventromedial rostral

RSNA - Atividade simpática do nervo renal

SpSNA - Atividade simpática do nervo esplâncnico

PNA - Atividade do nervo frênico

ScNA - Atividade do nervo ciático

RPG - Gerador do ritmo respiratório

SUMÁRIO

1. Introdução	3
2. Objetivos	13
2.1. Objetivo Geral	13
2.2. Objetivos Específicos	13
3. Material e Métodos	15
3.1. Animais	15
3.2. Procedimentos Gerais	15
3.3. Protocolos Experimentais	20
3.4. Análise estatística	26
3. Resultados	29
4. Discussão	63
5. Conclusão	86
6. Referência Bibliográfica	88

1. INTRODUÇÃO

As situações de estresse psicológico encontram-se cada vez mais presentes no mundo atual, contribuindo para o aparecimento de doenças cardiovasculares. A resposta fisiológica ao estresse emocional consiste em um padrão integrado de alterações que incluem a ativação do sistema nervoso simpático (Julius, 1993), ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), alterações respiratórias, além de alterações comportamentais incluindo medo e ansiedade. Tanto humanos quanto animais de laboratório ao se depararem com estímulos que induzem o susto ou ansiedade, respondem imediatamente com um reflexo de sobresalto (Grillon et al., 1998, Liebsch et al., 1998, Winslow et al., 2002). Um estudo realizado em humanos, mostrou que um barulho súbito ou um estímulo somatosensorial inesperado produz uma inspiração abrupta e aumento na atividade simpática da pele (Hagbarth et al., 1972). O reflexo de sobresalto é uma resposta estereotipada consequente da exposição a um repentino e inesperado estímulo. Na maioria dos casos, o reflexo é provocado por estímulo acústico, mas outras modalidades tais como visual, tátil ou vestibular também produzem respostas estereotipadas (Grillon, 2008). O reflexo de sobresalto é caracterizado por alterações motoras, autonômicas e respiratórias que permitem uma reação de luta/ fuga e/ou proteção do corpo contra um estímulo inesperado (Meinck, 2006, Grillon, 2008). Este padrão de alterações incluem a vasoconstrição na região esplâncnica, rins e pele (Eliasson et al., 1951, Abrahams et al., 1960, Feigl et al., 1964), aumento da frequência cardíaca e força de contração miocárdica (Rosen, 1961), bem como aumento na amplitude e frequência respiratória. Esse padrão de respostas é desencadeado rapidamente em animais acordados, para que os mesmos

estejam preparados para atender às demandas de uma resposta de luta ou fuga segundos após a exposição ao estímulo inesperado. Este reflexo é essencial para a sobrevivência do indivíduo, uma vez que ele mobiliza recursos do organismo para lidar com uma situação de emergência.

Diversos núcleos encefálicos estão envolvidos na geração e integração das respostas cardiorrespiratórias produzidas por diferentes tipos de estímulo. Um conjunto de estruturas do sistema nervoso central (SNC) tais como substância cinzenta periaquedutal (PAG), hipotálamo dorsomedial (DMH), amígdala (Schmitt and Karli, 1980), colículo superior (SC) e colículo inferior (IC) (Brandao et al., 1993, Brandao et al., 1999, Brandao et al., 2003, Brandao et al., 2005), são descritos como parte do sistema cerebral aversivo. Estudos mostram que aumentos graduais na intensidade da estimulação elétrica na coluna dorsolateral da PAG, camada profunda do SC e IC produzem uma resposta comportamental de defesa, caracterizada por alerta (estado de alerta), freezing (imobilidade defensiva) e fuga, seguida por alterações autonômicas, como aumento na pressão arterial, frequência e contratilidade cardíaca (Hilton, 1982, Keay et al., 1988, Dean et al., 1989, Brandao et al., 1993, Lamprea et al., 2002) e anti-nociceptivas (Nashold et al., 1969, Vargas et al., 2000, Castilho and Brandao, 2001, Bittencourt et al., 2005). Adicionalmente, Meloni & Davis mostraram que a microinjeção de bicuculina, um antagonista de receptor GABA_A, no colículo superior produz uma exacerbação no reflexo de sobresalto de maneira dose-dependente (Meloni and Davis, 2000). É interessante notar que a exacerbação do reflexo de sobresalto foi observada somente após a desinibição das camadas profundas do SC e não das camadas superficiais. De maneira similar, Brandão e

colaboradores demonstraram que a microinjeção de bicuculina no colículo inferior (IC) produziu uma resposta comportamental caracterizada por pulos e corridas rápidas (Brandao et al., 1988). Esses estudos sugerem uma ação gabaérgica tônica inibitória em neurônios do colículo superior e inferior, que participam da geração de respostas de alerta/ defesa.

1.1. Colículo superior

O colículo superior (SC) é uma região mesencefálica conhecida pela sua importância no controle da orientação espacial quando guiada por estímulos visuais, auditivos e somatosensoriais (Grobstein, 1988, Dean et al., 1989, King, 2004, Boehnke and Munoz, 2008, Felsen and Mainen, 2008). Macroscopicamente, o SC é visto como duas protuberâncias na superfície dorsal do mesencéfalo sendo anatomicamente dividido em camadas diferentes e bem delimitadas. Neurônios localizados nas camadas superficiais são responsivos quase exclusivamente à estímulos visuais, enquanto neurônios localizados nas camadas intermediárias e profundas expressam sensibilidade à estímulos sensoriais de diversas modalidades (visual, auditivo e somatosensorial) e participam do controle motor para orientação visual (Gandhi and Katnani, 2011).

O SC recebe sinais visuais entre outros provenientes de um estímulo externo e processa essa informação para produzir uma resposta somatomotora apropriada (por exemplo resposta de orientação) (Dean et al., 1989, Gandhi and Katnani, 2011). Esta região mesencefálica encontra-se envolvida em dois tipos de respostas comportamentais dependendo da

intensidade do estímulo: (1) resposta de orientação frente a um estímulo fraco/ não ameaçador (ex: caça de uma presa), ou (2) fuga/ aversão produzida por um estímulo forte/ ameaçador tal como a presença de um predador (resposta defensiva) (Dean et al., 1989, Brandao et al., 1999, Brandao et al., 2005, Cohen and Castro-Alamancos, 2010). Redgrave e colaboradores mostraram que a microinjeção bilateral de picrotoxina, um antagonista de receptor GABA_A no SC, induziu fortes reações de aversão, defesa ou escape e exacerbação do reflexo de sobresalto a estímulos inesperados (Redgrave et al., 1981). Dessa forma, é possível afirmar que após a desinibição colicular, estímulos que em condições normais pareciam neutros, tornam-se ameaçadores e produzem respostas que somente estímulos ameaçadores são capazes de gerar (Blanchard et al., 1981). Um estudo realizando lesão eletrolítica do SC mostrou que lesões coliculares resultam em supressão do reflexo de sobresalto indicando que esses animais não são afetados por um estímulo visual ou auditivo (Goodale et al., 1975). Adicionalmente, foi mostrado que lesões do SC reduzem as respostas de defesa ao estímulo visual ameaçador, tal como a aproximação de um humano ao rato (Blanchard et al., 1981).

As respostas comportamentais observadas após desinibição do SC estão associadas a respostas autonômicas, incluindo alterações na frequência cardíaca (FC), pressão arterial média (PAM) e padrão respiratório (Keay et al., 1988). Keay e colaboradores mostraram que a estimulação elétrica das camadas superficiais e intermediárias do SC reduziram a pressão arterial sem alterar a frequência cardíaca, enquanto que a estimulação da camada profunda produziu aumentos na pressão arterial acompanhada por bradicardia ou taquicardia. Respostas similares porém com duração maior foram obtidas

após microinjeções unilaterais de bicuculina. Neste mesmo estudo ainda foram observados aumentos na frequência e amplitude respiratória após estimulação elétrica do SC (Keay et al., 1988). A estimulação química do SC de ratos anestesiados com o aminoácido excitatório N-metil D-aspartato (NMDA), gera em sua maioria aumentos na PAM, acompanhados por aumentos na FC e respiração (Keay et al., 1990). Em conjunto, esses estudos mostram que respostas cardiovasculares, respiratórias e comportamentais essenciais durante uma resposta de alerta são geradas após estimulação do colículo superior.

1.2. Colículo Inferior

O colículo inferior (IC), localizado lateralmente ao colículo superior e substância cinzenta periaquedutal, é descrito como um importante relé da informação auditiva ascendente para o núcleo geniculado medial (MGN) e córtex temporal. Esta região recebe sinais convergentes de núcleos auditivos e exerce uma função crítica mediando respostas comportamentais apropriadas à estímulos auditivos via projeções para o colículo superior (Casseday and Covey, 1996). A região dorsal do IC, composta pelo núcleo pericentral e núcleo dorsal, tem sido descrita como uma região envolvida na produção de convulsões audiogênicas (Simler et al., 1994, Klein et al., 2004), enquanto a região ventral do IC, composta pelo núcleo central e braço do colículo inferior (BIC), está predominantemente envolvida na filtragem de estímulos acústicos de natureza aversiva (Ferreira-Netto et al., 2007).

Estudos mostram que a desinibição do colículo inferior produz respostas de defesa caracterizadas pelo freezing, seguida por uma reação

explosiva de fuga, com corridas rápidas, pulos e giros (Brandao et al., 1988, Calvo and Coimbra, 2006). É interessante ressaltar a ocorrência de comportamentos de escape após microinjeção de bicuculina no IC de ratos acordados e descerebrados, indicando que este comportamento não necessariamente envolve processamento cortical, mas é integrado em um nível bem primitivo de organização subcortical (Brandao et al., 1988). Em todos estes estudos, as respostas comportamentais foram correlacionadas com uma diminuição na transmissão gabaérgica no IC (Frye et al., 1983, Breese et al., 1984). Um trabalho do mesmo grupo ainda mostrou que a ativação de receptores NMDA em sítios específicos do IC gera padrões distintos de comportamento, dependendo da população neuronal ativada (Cardoso et al., 1994). Esses comportamentos observados variaram desde reações adversas caracterizadas por corridas e pulos a estados de imobilidade que progrediam com convulsões.

De maneira similar ao SC, foi mostrado que as respostas comportamentais observadas após a ativação de neurônios no colículo inferior utilizando bicuculina metiodide, são acompanhadas por alterações cardiovasculares como aumentos na pressão arterial e frequência cardíaca (Brandao et al., 1988) e outras alterações autonômicas características de uma reação de defesa, tais como a ereção dos pêlos, micção e defecação (Brandao et al., 1988, Brandao et al., 1993, Brandao et al., 2001). Estes estudos mostram que o IC está envolvido em respostas comportamentais e autonômicas que mimetizam um comportamento de medo produzido por ameaças ambientais (Brandao et al., 1988, Brandao et al., 1993, Brandao et al., 1994, Cardoso et al., 1994, Brandao et al., 1999, Troncoso et al., 2003).

Como mencionado anteriormente, estudos propõem que o IC é parte de um sistema generalizado do mesencéfalo, juntamente com SC e PAG, envolvido na integração de respostas somatomotoras e autonômicas frente um estímulo ameaçador sinalizado por estímulos visuais, auditivos e somatosensórios (Brandao et al., 1994, Stein, 1998).

1.3. Relação entre colículos e demais regiões cerebrais

Projeções aferentes para o colículo superior e colículo inferior

O colículo superior é um centro integrador multimodal que recebe aferências visuais, auditivas, somatosensoriais, vestibulares e propioceptivas (Meredith and Stein, 1983, 1985). Vários estudos mostraram que o SC tem uma organização anatômica complexa, recebendo projeções de aproximadamente 40 estruturas subcorticais (Edwards et al., 1979, Dean et al., 1989). Foram mostradas projeções diretas da retina e indiretas do córtex visual para o SC (Dean et al., 1989). Além disso, as informações auditivas parecem ser mediadas através da via central auditiva, conduzida do colículo inferior para o colículo superior (Sparks, 1988). Evidências anatômicas e funcionais sugerem uma modulação tônica inibitória da substância negra pars reticulata (SNpr) para o SC. Outras evidências ainda sugerem a presença de interneurônios gabaérgicos no SC responsáveis pela supressão da resposta comportamental produzida por estimulação sensorial (Okada, 1974, Sherk, 1979).

O colículo inferior contém uma densidade de receptores GABA_A maior que qualquer outra região cerebral, e acredita-se que estes estão principalmente envolvidos no controle tônico de respostas motoras induzidas

por sinais auditivos (Edgar and Schwartz, 1990, Fubara et al., 1996, Peruzzi and Dut, 2004). O IC é estruturalmente parecido em todas as espécies animais e é referido como um centro integrador que recebe aferências do córtex auditivo e somatosensorial, núcleo coclear, complexo olivar, lemnisco lateral entre outras estruturas (Casseday et al., 1976, Leitner and Cohen, 1985, Casseday and Covey, 1996, Li et al., 1998). De forma similar ao SC, estudos anatômicos mostraram projeções da substância negra e globo pálido para o colículo inferior em diferentes espécies animais (Olazabal and Moore, 1989, Moriizumi and Hattori, 1991, Casseday and Covey, 1996).

Projeções eferentes do colículo superior e colículo inferior

As projeções eferentes do colículo superior têm sido estudadas principalmente com relação ao controle das funções motoras relacionadas ao comportamento de orientação ou fuga (Dean et al., 1989, Gandhi and Katnani, 2011). Foram descritas projeções para os núcleos reticulares pontino e bulbar, mas estas são na maioria mediais e não parecem incluir núcleos que modulam a atividade simpática e respiratória como o bulbo ventro-lateral ou os grupos respiratórios ventrais e dorsais (Redgrave et al., 1987). Estudos prévios mostraram uma projeção direta do SC para PAG, direcionada exclusivamente para porção dorsolateral (dIPAG) (Furigo et al., 2010), que encontra-se envolvida na regulação de atividade simpática e respiratória (Keay et al., 1990, ligaya et al., 2010). É importante ressaltar que a dIPAG e o SC possuem conexões anatômicas com diversas regiões envolvidas na resposta cardiovascular ao estresse emocional. Tanto o SC quanto o IC recebem projeções do córtex prefrontal medial (mPFC) (An et al., 1998, Floyd et al.,

2001) e projetam-se para o núcleo cuneiforme (Redgrave et al., 1988). Adicionalmente existe uma projeção do SC para o hipotálamo lateral que também está envolvido na modulação simpática e respiratória.

De maneira similar, estudos anatômicos do IC, avaliaram suas projeções no processamento auditivo (Caicedo and Herbert, 1993, Aparicio et al., 2010) e pouco se sabe sobre as possíveis vias envolvidas no controle simpático e respiratório. Foi descrita uma projeção densa e direta do IC para as camadas intermediárias e profundas do SC (Garcia Del Cano et al., 2006). Além disso, esse núcleo também projeta-se exclusivamente e densamente para a dIPAG (Garcia Del Cano et al., 2006).

Justificativa

Populações distintas de neurônios no SC podem gerar padrões diferentes de respostas coordenadas que são de início rápido e apropriadas para um estímulo particular (Dean et al., 1989, Gandhi and Katnani, 2011). Da mesma maneira, evidências anatômicas, neuropsicológicas e comportamentais envolvendo o IC, tem proposto a existência de neurônios no IC que respondem a um estímulo auditivo particular, tal como o som emitido pela presa ou predador. Esse estímulo é capaz de gerar respostas imediatas chamadas “padrão de ações fixas” que são apropriadas para cada tipo de estímulo (Casseday and Covey, 1996).

Essas observações levantam a possibilidade de que existem neurônios no colículo superior e inferior capazes de gerar além de respostas somatomotoras, respostas cardiorespiratórias coordenadas apropriadas para

uma resposta de defesa (fuga), iniciada por um estímulo ameaçador. Embora a maioria dos estudos sobre a participação do IC e SC na resposta de defesa avaliem a resposta comportamental dos animais, pouco foi investigado sobre as alterações autonômicas e respiratórias que acompanham esse fenômeno. Em particular, os "padrões de ações fixas" referidos por Casseday & Covey (1996) provavelmente incluem essas alterações autonômicas e respiratórias e levantam a possibilidade de que as respostas motora e autonômica possam ser geradas por neurônios comando localizados no IC e SC. Neurônio comando é um único neurônio ou um grupamento de neurônios responsáveis pela co-ativação de uma ampla variedade de respostas por meio de múltiplas projeções para diferentes vias de saída. (Jansen et al., 1995b).

2. OBJETIVO GERAL

Estudar a participação do colículo superior e inferior na geração de uma resposta autonômica cardio-respiratória e somatomotora coordenada produzidas pelo estímulo naturalístico. Os resultados desse estudo foram recentemente publicados (Iigaya et al., 2012, Muller-Ribeiro et al., 2014).

2.1. Objetivos Específicos

1) Avaliar os efeitos da desinibição de neurônios localizados no colículo superior e inferior sobre os parâmetros cardiovasculares, atividade simpática do nervo renal e atividade do nervo frênico de ratos anestesiados;

2) Avaliar a resposta cardiovascular, respiratória e somatomotora de animais anestesiados a diferentes estímulos naturalísticos - estímulo auditivo, visual e somatosensorial após desinibição de neurônios localizados no colículo superior e inferior;

3) Comparar os efeitos da desinibição de neurônios localizados nos lados direito e esquerdo do colículo superior e inferior sobre os parâmetros cardiovasculares, respiratório e somatomotor produzidas pelo estímulo naturalístico;

4) Avaliar o efeito da inibição bilateral de diferentes núcleos relés tais como hipotálamo dorsomedial (DMH), substância cinzenta periaqueductal (PAG), núcleo cuneiforme (CnF) e núcleo parabraquial lateral (LPB) sobre a resposta simpática, respiratória e somatomotora sincronizada produzida pelo estímulo naturalístico;

5) Reavaliar as possíveis conexões anatômicas do colículo superior e inferior;

6) Avaliar se as estruturas prosencefálicas são essenciais para geração da resposta cardiovascular, simpática e respiratória sincronizada ao estímulo naturalístico após a desinibição de neurônios coliculares em animais anestesiados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Sprague-Dawley pesando entre 330-550 g, provenientes do Laboratório de animais da Universidade de Sydney e do Centro de recursos de animais, Perth, Austrália. Os animais foram acondicionados em caixas de plástico (64 cm x 20 cm), contendo 4 animais com livre acesso à água e comida. Os animais eram mantidos em um biotério com ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura mantida a 22 - 23°C, 60% de umidade. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os regulamentos determinados pelo Guia de Experimentação Animal do Conselho de Saúde Nacional e Pesquisa Médica da Austrália e aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Universidade de Sydney e Macquarie University (Sydney, Austrália).

3.2. Procedimentos Gerais

3.2.1. Anestesia

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos da primeira série de experimentos, os animais foram inicialmente anestesiados com isoflurano (2,0 - 2,5% em 100% de oxigênio), administrado por via inalatória. Após canulação de artéria e veia femoral, a anestesia foi gradualmente substituída por uretana (1.3 g/kg, i.v), suplementado quando necessário. Na segunda série de experimentos, os animais foram anestesiados com uretana (1.3 g/kg, i.p), suplementado quando necessário. A adequação da anestesia foi verificada pela ausência do reflexo corneal e resposta ao estímulo nociceptivo na pata

traseira. A temperatura corporal foi mantida entre 37-38°C por um colchão de aquecimento.

3.2.2. Traqueostomia

Na superfície ventral do pescoço, próximo ao manúbrio esternal, foi realizada uma pequena incisão na pele do animal. Os músculos e tecido conjuntivo foram divulsionados para localização da traquéia. Foi realizado um pequeno orifício entre dois anéis cartilagosos para a inserção de uma cânula (JELCO Plus - nº 14G 7068 – Johnson & Johnson MEDICAL). Dessa forma, possibilitou-se aspiração endotraqueal (se necessário), manutenção das vias aéreas pervias e ventilação artificial em determinados protocolos experimentais. A ventilação artificial foi realizada através de um respirador para ratos (UGO Basile, Italy) com 100% de oxigênio, misturado com ar ambiente. O CO₂ expirado foi continuamente monitorado e mantido entre 3,5 - 4,5% (Capstar - 100, CWE Inc., USA) através do ajuste do volume (200 - 400 ml volume corrente) e frequência respiratória.

3.2.3. Canulação de artéria e veia femoral

Foi realizada uma incisão na região inguinal direita para dissecação do feixe vasculo-nervoso femoral. A artéria femoral direita e a veia foram expostas e dissecadas para inserção de uma cânula intra-arterial e uma cânula intra-venosa, respectivamente. A cânula intra-arterial (DI 0,58 mm, DE 0,6 mm, tubo de polietileno, Microtube Extrusions) foi inserida na artéria femoral e conectada a um transdutor de pressão para registro contínuo de pressão arterial pulsátil e FC. Os sinais de pressão arterial média (PAM) e FC

foram obtidos a partir da pressão arterial pulsátil utilizando um conversor ACDC (1401, Cambridge Electronic Design (CED) Ltd, UK) e analisados através do sistema Power Lab (AD Instruments) e spike software (versão 6,2 CED). A cânula intra-venosa (DI 0,58 mm, DE 0,96 mm, tubo de polietileno, Microtube Extrusions) foi inserida na veia femoral para a administração dos fármacos.

3.2.4. Localização e isolamento dos nervos renal, esplâncnico, frênico e ciático

Os animais tiveram o flanco lateral esquerdo tricotomizado. Uma área delimitada entre a última costela e a pata traseira foi exposta após a retirada da pele. Em seguida, foi divulsionada a musculatura paravertebral da região retroperitoneal até a localização do rim para o nervo renal e localização do gânglio celíaco para o nervo esplâncnico. As extremidades da abertura cirúrgica foram fixadas em um campo operatório e com o auxílio de uma lupa, o nervo renal e nervo esplâncnico foram cuidadosamente localizados e dissecados (McDowall et al., 2007, Horiuchi et al., 2009, Iigaya et al., 2010). Esses nervos foram escolhidos pelo fato de representarem medidas do fluxo neuronal simpático da medula espinhal que inervam um dos maiores leitos vasculares no rato, o fluxo sanguíneo abdominal/mesentérico. Adicionalmente, a atividade simpática do nervo renal (RSNA) é diretamente correlacionada com a pressão arterial e acredita-se ser um indicador da atividade vasomotora simpática.

O nervo frênico esquerdo foi isolado a partir da exposição subescapular dorsal e dissecado medialmente ao plexo braquial. O nervo frênico inerva o

diafragma e permite a medida direta do controle respiratório central. Em determinados protocolos experimentais, os animais foram paralisados (brometo de pancuronium 2mg/ml) e o nervo vago foi cortado bilateralmente para eliminar a aferência dos receptores de estiramento pulmonar.

O nervo ciático foi exposto no meio da coxa a partir de uma preparação dorsolateral. O músculo biceps femoral foi separado do músculo vasto lateral e o nervo foi então dissecado. Com exceção do nervo renal, os nervos frênico esplâncnico e ciático tiveram sua extremidade distal cortadas e amarradas com linha de sutura. Os nervos foram posicionados sobre um par de eletrodos de prata acoplados a um micromanipulador, amplificados (x10000 CWE Inc., Ardmore, PA, USA), filtrados (0,1 - 3kHz) e amostrados a 5 kHz. O sistema de aquisição Spike 2 software (CED Ltd., Cambridge, UK) ou sistema Power Lab (AD Instruments) foram utilizados para retificar e integrar o sinal de atividade simpática do nervo renal (RSNA), atividade simpática do nervo esplâncnico (SpSNA), atividade do nervo frênico (PNA) e atividade do nervo ciático (ScNA). Dentro do campo cirúrgico foi adicionado óleo mineral (Nujol – Schering-Plough) à $\pm 37,5^{\circ}$ C, para evitar ressecamento, isolar a captação do sinal dos nervos de ruídos externos e para condução da onda ultrassônica. Toda essa preparação permaneceu em observação por cerca de 30 minutos ou até estabilização das variáveis registradas para que se iniciassem os protocolos experimentais.

3.2.5. Craniotomia e localização do colículo superior e inferior

Os animais foram posicionados em um aparelho estereotáxico, com a cabeça posicionada a 3,3 mm abaixo da linha interaural. Uma pequena porção

da superfície dorsal (McDowall et al., 2007, Horiuchi et al., 2009, Iigaya et al., 2010) do cérebro foi exposta para posterior inserção de micropipetas nos sítios do SC e IC de acordo com as coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson: 7.1 - 8.4 mm caudal ao bregma, 1.0 – 2.8 lateral a linha média e 4.0 – 7.5 mm ventral ao bregma (Paxinos and Watson, 2004). As pipetas de vidro (DI 0.2 mm, DE 1 mm; SDR Clinical Technology Ltd.) foram confeccionadas a partir de um puxador de eletrodo à laser programável (P-2000 Laser Based Micropipette Puller, Sutter Instruments Co.).

3.2.6. Drogas

Microinjeção de bicuculina metiodide (50 pmol / 50 nl, Tocris) e picrotoxina (50 pmol / 50 nl, Sigma-Aldrich Inc.), ambos antagonistas de receptor GABA_A, foram feitas no colículo superior e inferior utilizando uma micropipeta de vidro posicionada verticalmente em um micromanipulador. Para inibição do DMH, PAG, CnF e LPB foi utilizado muscimol (100 pmol / 100 nl, Sigma-Aldrich Inc.), agonista de receptor GABA_A. Os fármacos continham microesferas de fluorescência (0.5% Lumafluor) para facilitar posterior análise histológica.

3.2.7. Histologia

No final de cada experimento, os animais foram eutanasiados com overdose de cloreto de potássio (KCl, 3 M, 1 ml i.v.). Os cérebros foram removidos e armazenados durante 24 horas em formaldeído 4%. Os cortes coronais (100 µm) foram feitos com o auxílio de um vibrátomo (Leica VT 1000S, Leica Microsystems, Sydney, Australia), montados em lâminas

gelatinizadas e corados com vermelho neutro a 1%. Os sítios de microinjeção foram determinados utilizando um microscópio de fluorescência (Zeiss, Gottingen, Germany) e o Atlas de Paxinos & Watson como referência (Paxinos and Watson, 2004).

3.3. Protocolos Experimentais

Protocolo 1: Efeito da desinibição de neurônios do SC e IC sobre os parâmetros cardiovasculares, atividade simpática do nervo renal e atividade do nervo frênico de ratos anestesiados respirando espontaneamente.

Os animais foram inicialmente anestesiados com isoflurano (2.0 – 2.5%) seguido de uretana (1.3g/kg, iv.) e respiravam espontaneamente. Foram realizadas microinjeções de bicuculina metiodide (50 pmol / 50 nl) em 119 sítios do SC e IC utilizando coordenadas de 7.1 - 8.4 mm caudal ao bregma, 1.0 – 2.8 lateral a linha média e 4.0 – 7.5 mm ventral ao bregma. Após a microinjeção de bicuculina, foi aguardado um período de pelo menos 30 minutos ou até que as variáveis retornassem ao valor basal para realização de uma nova microinjeção em um sítio localizado 0,5 mm distante do sítio de microinjeção anterior (figura 1).

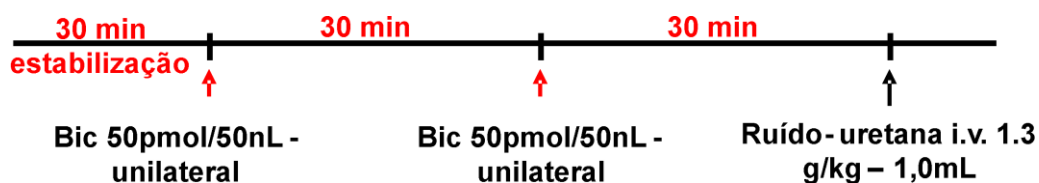


Figura 1: Diagrama esquemático do protocolo experimental 1 e 2.

Protocolo 2: Efeito da desinibição de neurônios do SC e IC sobre os parâmetros cardiovasculares, atividade simpática do nervo renal e atividade do nervo frênico de ratos anestesiados e artificialmente ventilados.

Em 2 experimentos adicionais, os animais foram inicialmente anestesiados com isoflurano (2.0 – 2.5%) seguido de uretana (1.3g/kg, iv.), vagotomizados, paralisados, e artificialmente ventilados. De maneira similar ao protocolo anterior, foram realizadas microinjeções de bicuculina metiodide (50 pmol / 50 nl) no SC e IC utilizando as coordenadas de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson [(Paxinos and Watson, 2004)(figura 1)].

Protocolo 3: Efeito da desinibição dos lados direito e esquerdo do colículo superior e inferior na resposta cardiovascular, respiratória e somatomotora de animais anestesiados a diferentes estímulos naturalísticos.

Neste protocolo experimental, os animais foram anestesiados com uretana (1.3g/kg ip), paralisados, vagotomizados e artificialmente ventilados. Foram realizadas microinjeções de picrotoxina (50 pmol / 50 nl) nos lados direito e esquerdo do SC e IC seguido por estímulos naturalísticos (figura 2). O estímulo naturalístico foi testado em todos os animais antes e após desinibição da região. Foram utilizados 3 diferentes modalidades de estímulos sensoriais: 1) estímulo auditivo; 2) estímulo visual e 3) estímulo somatosensorial. O estímulo auditivo consistia do som de uma palma feita aproximadamente a 30 cm do animal. Em um teste separado, um microfone (B&K 4138 1/8 inch microfone 20 Hz a 60 kHz) e um amplificador (B&K 2610) foram usados para

registrar o som gerado pelas palmas realizadas durante os experimentos. A saída do sinal registrado foi digitalizada a 96 kHz (Edirol UA25EX) e uma análise espectral foi feita utilizando o Matlab (The Mathworks – V7.11). Presumindo que as barras de orelha do estereotáxico causam uma atenuação de 40 dB (maior que a atenuação produzida por protetores de orelha), a amplitude do som após a atenuação foi 30-40 dB maior que o limiar audiométrico para um rato, acima da frequência de 8 kHz a 30 kHz, que corresponde a faixa de frequência de melhor audição dos ratos (Heffner et al., 1994). O estímulo visual consistia de uma luz clara direcionada diretamente ao olho do animal à uma distância de aproximadamente 20 cm, enquanto o estímulo somatosensorial foi um aperto forte na pata traseira com duração de aproximadamente 2 segundos utilizando uma pinça.

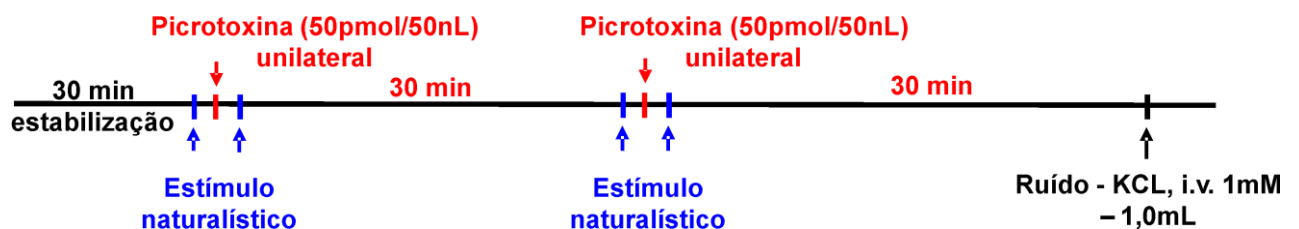


Figura 2: Diagrama esquemático do protocolo experimental 3.

Protocolo 4: Análise de possíveis conexões do colículo superior e inferior

Para determinação das conexões anatômicas do colículo, foi realizada microinjeção de colera toxina b, CTB – Alexa 555 (0.5 – 1%, 50 nl, Invitrogen) no SC (AP = - 7.6 mm, LL = 1.5 mm e DV = 4.5 mm) e IC (AP = -7.6 mm, LL = 2.0 mm e DV = 4.0 mm). A microinjeção de CTB foi realizada através de uma micropipeta de vidro posicionada verticalmente em um micromanipulador, 5 dias antes da eutanásia dos animais (figura 3). A interpretação da projeção como aferente ou eferente foi baseada na análise microscópica dos cortes coronais onde a projeção aferente é caracterizada pela marcação bem definida de corpos de neurônios (figura 16) enquanto que a projeção eferente é caracterizada pela marcação difusa que representa marcação de terminais axonais (figura 18).

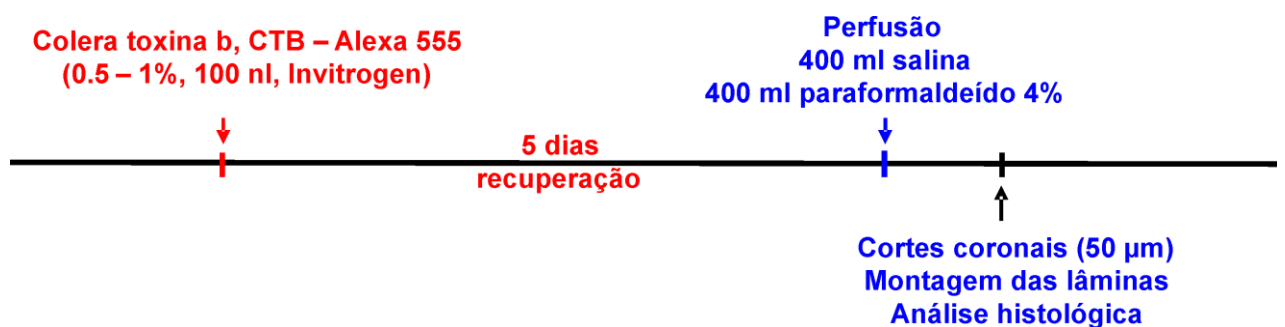


Figura 3: Diagrama esquemático do protocolo experimental 4.

Protocolo 5: Avaliar o efeito da inibição de diferentes regiões cerebrais sobre a resposta simpática, respiratória e somatomotora sincronizada produzida pelo estímulo naturalístico.

Após identificação do sítio de microinjeção responsivo ao estímulo naturalístico, foi realizada microinjeção bilateral de muscimol (100 pmol / 100 nl) nas seguintes regiões: hipotálamo dorsomedial (AP = -3.2 mm, LL = 1.2 mm e DV = 6.5 mm); substância cinzenta periaqueductal (AP = -7.6 mm, LL = 0.6 mm e DV = 4.0 – 6.0 mm), núcleo cuneiforme (AP = -7.6 mm, LL = 1.5 mm e DV = 5.5 – 6.0 mm) e núcleo parabraquial lateral (AP = -9.4 mm, 2.1 mm e DV = 5.0 – 6.0 mm). Após inibição das regiões citadas acima, a microinjeção de picrotoxina seguida pelo estímulo naturalístico foi testada novamente (figura 4).

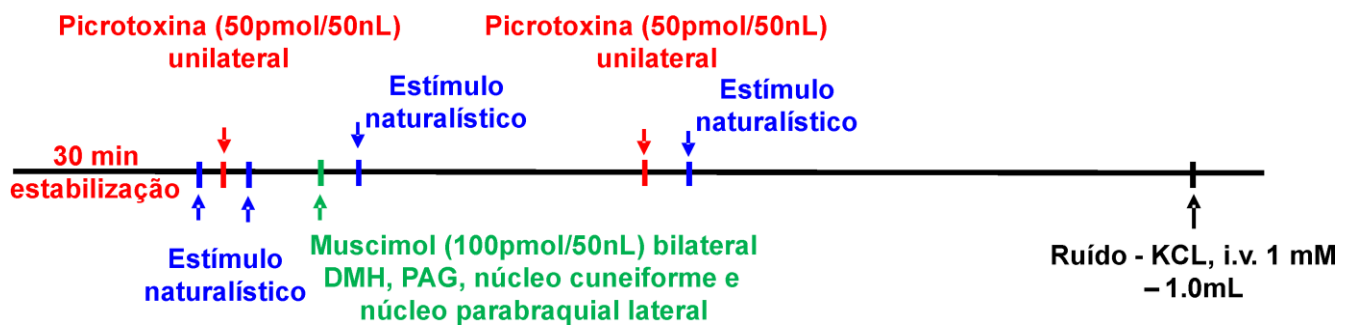


Figura 4: Diagrama esquemático do protocolo experimental 5.

Protocolo 6: Avaliar a resposta cardiovascular, respiratória e somatomotora de animais anestesiados ao estímulo naturalístico após descerebração pré-colicular.

Em 4 animais, a microinjeção de bicuculina metiodide seguida pelo estímulo naturalístico foi testada antes e após a descerebração. Foram feitos 2 buracos na calota craniana para acesso ao cérebro. Em seguida foi feita uma incisão na dura mater e transecção anteriormente ao colículo utilizando uma pinça fina. A descerebração à nível pré-colicular foi então iniciada utilizando um sistema de sucção (figura 5). Durante a sucção do tecido cerebral, a pressão arterial média dos animais foi reduzida (~5 - 10 mmHg) através da infusão de pentobarbital 13 mg kg⁻¹, 5 ml i.v. , velocidade de 1ml min⁻¹) para reduzir o sangramento.

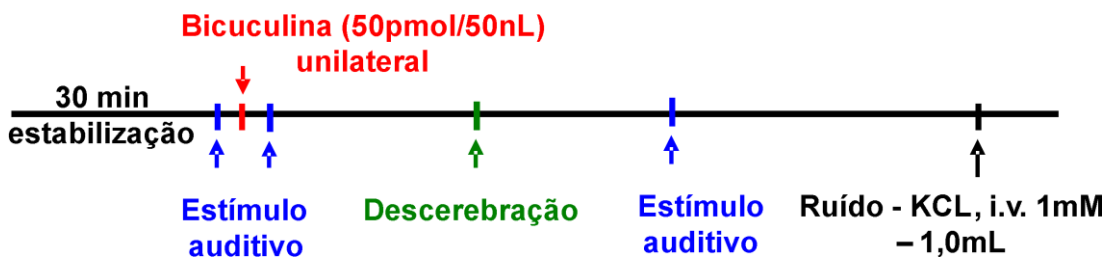


Figura 5: Diagrama esquemático do protocolo experimental 6.

3.4. Análise Estatística

A média de disparos cíclicos foi feita para determinar a relação de tempo entre os disparos dos nervos renal e frênico e as alterações associadas na PAM e FC produzidas pela microinjeção de bicuculina no primeiro protocolo experimental. Para isto, os registros de RSNA e PNA foram retificados e posteriormente integrados com constante de tempo de 0.1 s. O pico de disparo da RSNA foi primeiramente identificado e em seguida os sinais das outras variáveis simultaneamente registradas (RSNA, PNA, MAP e FC) foram analisados entre 1.5 s antes a 2.5 s depois do trigger point (200 amostras/s). Este processo foi repetido para 10 disparos de RSNA e a média dessas 10 curvas foram calculadas para todas as variáveis analisadas. A média de disparos cíclicos também foi usada para quantificar se o grau de ocorrência de disparos de RSNA foi correlacionado com o ritmo respiratório normal, chamado de index de correlação respiratório. Essa medida foi feita calculando a proporção da amplitude de oscilação (máximo - mínimo) da média de atividade do nervo frênico calculada pela “média de disparos cíclicos em um período de 1,5 a 0,75 segundos antes do trigger point (pico de RSNA) até a média da amplitude das oscilações da PNA no mesmo período de tempo para cada um dos 10 registros individuais que foram usados para determinar a média de disparos cíclicos. Uma razão de 100% implicaria que o disparo de RSNA ocorreu exatamente no mesmo tempo do ciclo respiratório normal para cada um dos 10 registros individuais, enquanto um valor próximo à zero implicaria que o disparo de RSNA não teria nenhuma relação consistente com o ciclo respiratório normal.

As alterações produzidas pela microinjeção de bicuculina ainda no primeiro protocolo experimental foram comparadas utilizando teste-*t* de student. Diferenças entre 3 grupos experimentais foram analisadas pelo teste de variância (ANOVA). O teste chi-quadrado foi usado para determinar se as diferenças na distribuição regional dos sítios de microinjeção que produziram diferentes tipos de respostas eram estatisticamente significantes.

Para os protocolos com estímulo naturalístico, a média de disparos cíclicos foi utilizada para determinar a relação de tempo entre os disparos de SpSNA, PNA e ScNA e as alterações na MAP produzidas pelo estímulo auditivo, visual e somatosensorial. Para isto, o registro de SpSNA, PNA e ScNA foram retificados e posteriormente integrados (constante de tempo de 20 ms). Para cada estímulo, o pico de disparo de SpSNA foram primeiramente identificado e em seguida amostras dos sinais das outras 4 variáveis simultaneamente registradas (SpSNA, PNA, ScNA e MAP) foram analisados entre 2.5 s antes a 2.5 s depois do trigger point (200 amostras/s). Este processo foi repetido para 4 - 19 estímulos e a média dessas curvas foram calculadas para todas as variáveis analisadas. O tempo do início no aumento na média dos sinais de SpSNA, PNA e ScNA foram então identificados em cada caso como o ponto onde: (i) o valor da media do sinal aumentou, relativamente ao valor precedente, em que a quantidade foi duas vezes maior que o desvio padrão de 10 valores precedents e (ii) a média do sinal continuou a aumentar subseqüentemente em direção ao valor do pico.

A média de disparos cíclicos também foi utilizada para comparar a magnitude dos aumentos na MAP e os disparos de SpSNA e PNA produzidos

pelo estímulo auditivo, visual e somatosensorial. Para isto, foi analisado o aumento máximo nos valores médios de MAP, SpSNA e PNA relativo aos níveis basais (pré estímulo). O nível basal considerado foi a média do valor das variáveis no período de 2,5 a 0,5 segundos antes do estímulo. A magnitude dos disparos de ScNA não foi analisada pois não foi detectado um nível de atividade basal do nervo ciático.

Nestes experimentos, o teste *t* foi usado para determinar se a diferença no tempo entre o início do aumento na (i) SpSNA e PNA, e (ii) SpSNA e ScNA produzidos pelo estímulo auditivo e visual foram significativamente diferentes de zero. Um teste *t* não pareado foi usado para determinar se a magnitude dos aumentos na PAM, SpSNA ou PNA eram significativamente diferentes quando produzidos por diferentes modalidades de estímulo. O nível de significância considerado foi $P < 0.05$.

4. RESULTADOS

Descrição geral das respostas cardiovasculares e respiratórias produzidas pela microinjeção de bicuculina no colículo e regiões adjacentes.

Foram feitas microinjeções de bicuculina (50 pmol) em 119 sítios do colículo superior e inferior de ratos anestesiados respirando espontaneamente. Os sítios de microinjeção foram representados de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (Paxinos and Watson, 2004) em 3 diferentes níveis (7.20, 7.80 e 8.3 mm caudal ao bregma) e marcados em diferentes cores de acordo com o padrão de resposta observado. Os sítios de microinjeção localizaram-se nas camadas intermediárias e profundas do colículo superior, núcleo externo e central do colículo inferior, substância cinzenta periaquedutal (PAG), núcleo cuneiforme e núcleo pré cuneiforme (figura 6).

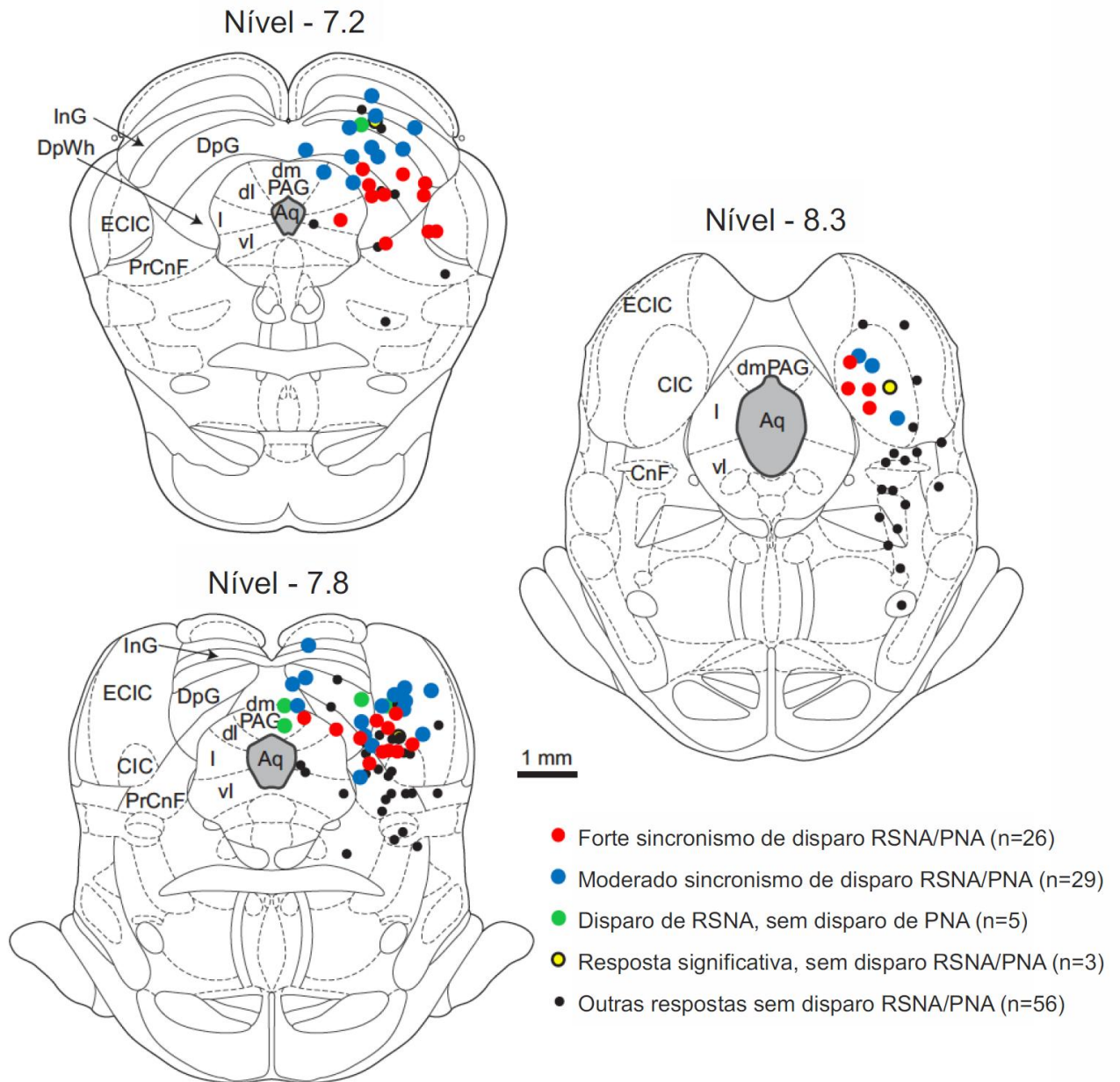


Figura 6: Diagrama esquemático das seções coronais do Atlas de Paxinos e Watson ilustrando os sítios de microinjeção de bicuculina no colículo superior e inferior. As diferentes cores indicam o padrão de resposta obtido em cada sítio de microinjeção. InG, camada cinza intermediária do colículo superior; DpG, camada cinza profunda do colículo superior; DpWh, camada branca profunda do colículo superior; ECIC, cortex externo do colículo inferior; CnF, núcleo cuneiforme; PrCnF, núcleo pré-cuneiforme; dmPAG, porção dorsomedial da substância cinzenta periaquedutal; dl, porção dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal; l, porção lateral da substância cinzenta periaquedutal; vl, porção ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal; Aq, aqueduto; CIC, comissura do colículo inferior.

A microinjeção unilateral de bicuculina (50 pmol) no colículo superior e inferior produziu diferentes padrões de respostas classificadas de acordo com as alterações observadas na atividade do nervo frênico (PNA) e sua relação com as alterações na atividade simpática do nervo renal (RSNA). No primeiro tipo de resposta (n=8), foram observados aumentos na PNA e RSNA acima de 50% do nível basal acompanhados de alterações na PAM e FC (figura 7). Na maioria dos casos, a microinjeção de bicuculina produziu alterações no padrão de atividade simpática do nervo renal, tais como disparos intensos com intervalos de tempo de 2-5 segundos. No entanto, neste primeiro tipo de resposta observado, a atividade do nervo frênico manteve um ritmo regular constante durante os disparos intensos de RSNA (figura 7C).

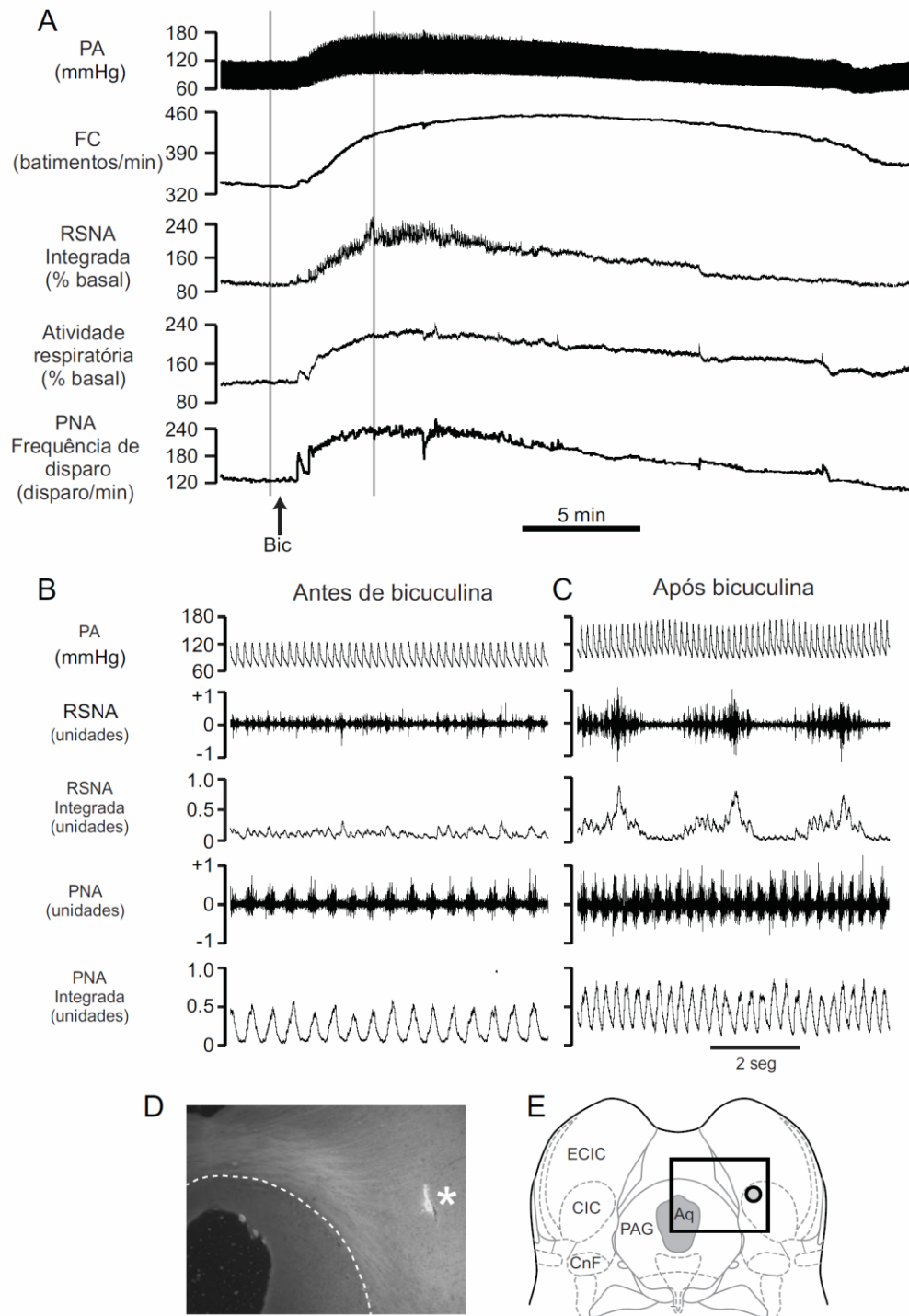


Figura 7: Exemplo de uma resposta produzida pela microinjeção de bicuculina sem disparos sincronizados de RSNA/PNA. O registro mostra as alterações na PA, FC, RSNA, PNA e frequência respiratória (A). Exemplo do registro expandido antes e após a microinjeção de bicuculina nos pontos indicados pela linha vertical cinza (B e C). Fotomicrografia do sítio de microinjeção indicado pelo * (D). Diagrama esquemático do corte coronal, ilustrando o sítio de microinjeção (E).

No segundo tipo, a resposta foi caracterizada por disparos sincronizados de RSNA e PNA (figura 8). O início dos disparos sincronizados de RSNA e PNA ocorreram na maioria dos casos após o pico de um disparo regular de PNA (figura 8C). Cada disparo sincronizado de RSNA e PNA ainda foi acompanhado por um aumento na pressão arterial. Os disparos intensos de PNA observados após a desinibição desses sítios foram constantemente associados com disparos sincronizados na RSNA (figura 8D).

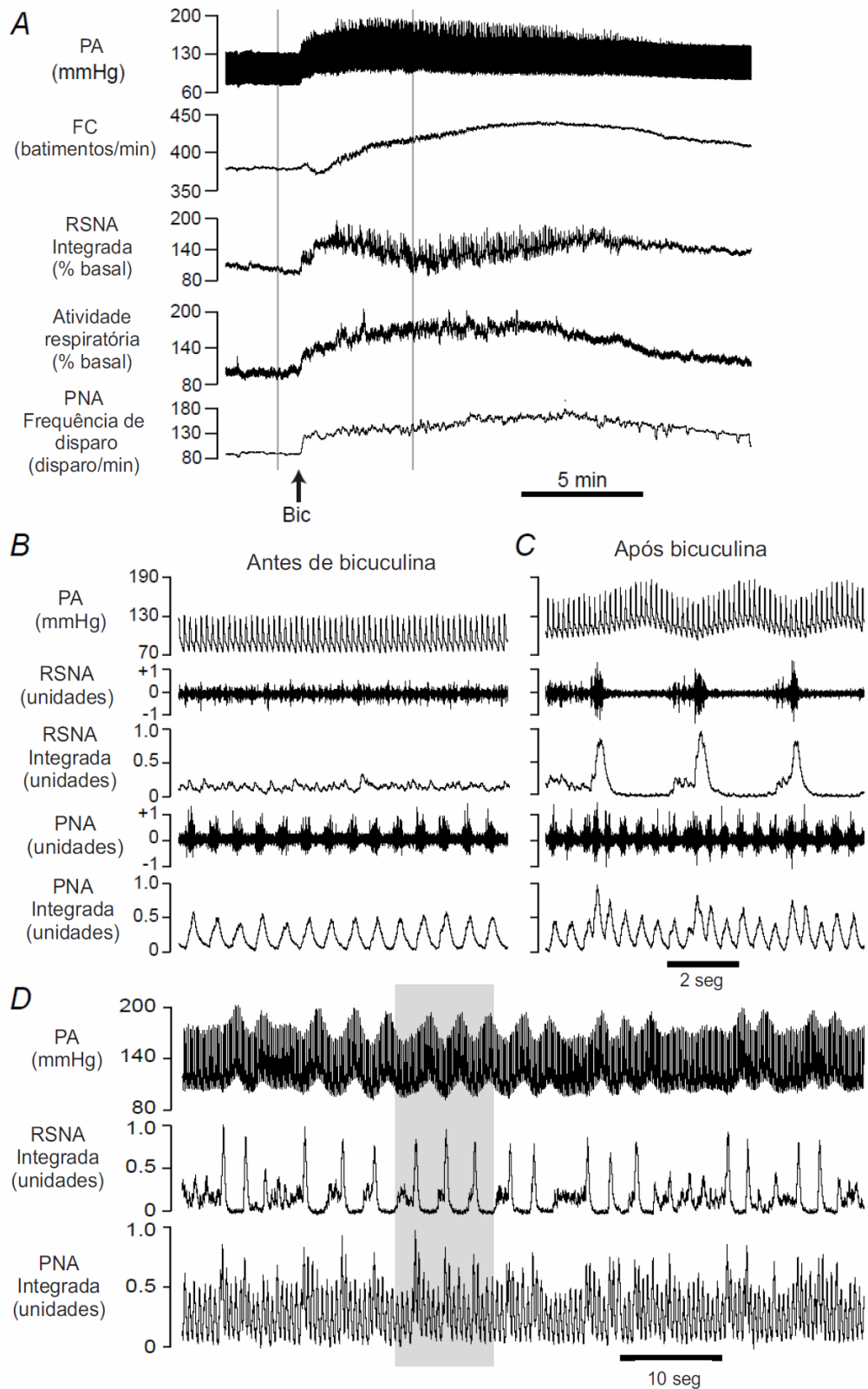


Figura 8: Exemplo de uma resposta com fortes disparos sincronizados de RSNA/PNA produzida pela microinjeção de bicuculina (A). B e C: Exemplo do registro expandido antes e após microinjeção de bicuculina nos pontos indicados pela linha vertical cinza. D: Exemplo do registro por um período de tempo maior, incluindo o exemplo (indicado pela barra vertical cinza) mostrado em C.

A média de disparos cíclicos foi usada para quantificar a magnitude e latência dos disparos sincronizados de RSNA e PNA e as alterações na PAM e FC. As respostas foram classificadas como forte, moderada e resposta em que as alterações na PNA não foram associadas com alterações na RSNA (figura 9). Respostas com forte disparo sincronizado de RSNA e PNA foram definidas como respostas em que a amplitude do pico de disparo sincronizado da PNA foi pelo menos 100% maior que a média basal (figura 9 A). Essas respostas foram observadas em 26 sítios de microinjeção. Respostas com moderado disparo sincronizado de RSNA e PNA foram definidas como respostas em que a amplitude do pico de disparo sincronizado da PNA foi 30 - 99 % maior que a média basal (figura 9 B). Essas respostas foram observadas em 29 sítios de microinjeção. A média de disparos cíclicos foi feita em 5 respostas nas quais a atividade do nervo frênico manteve um ritmo regular durante os disparos de RSNA após a microinjeção de bicuculina. Essa análise confirmou que em todos os casos, a média de disparos de RSNA não foi associada com aumentos significativos na atividade do nervo frênico (figura 9 C).

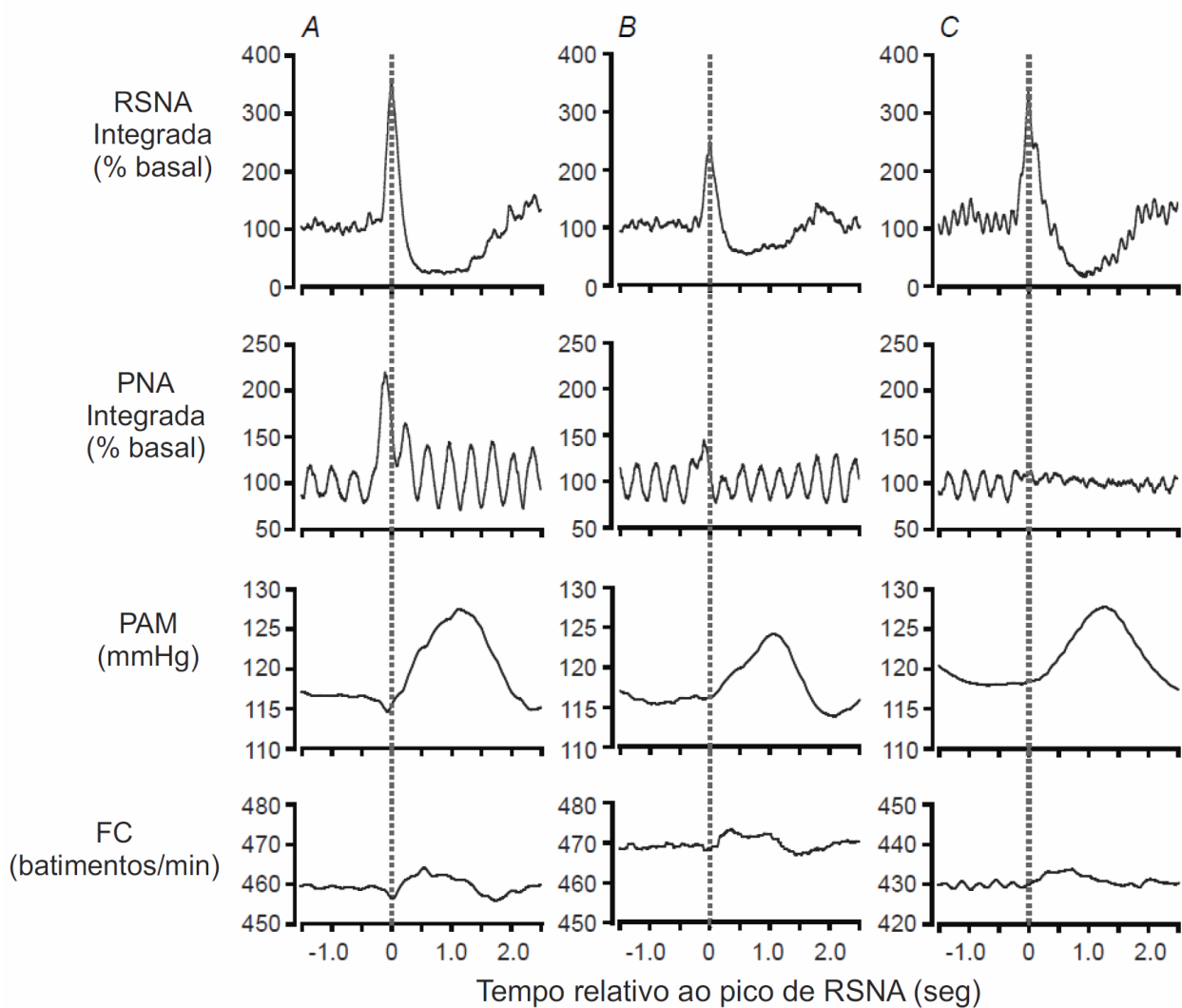


Figura 9: Exemplo da média de disparos cíclicos mostrando a média de 10 curvas de RSNA integrada, PNA integrada, PAM e FC para uma resposta com disparos de RSNA/PNA fortemente sincronizados (A), disparos de RSNA/PNA moderadamente sincronizados (B) e disparos de RSNA/PNA não sincronizados (C). A linha pontilhada ilustra o ponto de disparo e os sinais foram agrupados no período de 1.5 s antes a 2.5 s depois do ponto de disparo.

Imediatamente após cada disparo forte de RSNA, foi observada uma redução no nível de RSNA comparada à atividade basal com duração de 1-2 segundos. Essa redução pós disparo de RSNA foi consistentemente observada quando o disparo de RSNA era ou não associado com o disparo sincronizado de PNA (figuras 7C, 8C e 9).

Nos 56 sítios de microinjeção restantes (figura 6), as respostas produzidas pela microinjeção de bicuculina não se enquadraram em nenhuma das categorias descritas acima. Na maioria dos casos nenhuma alteração ou uma pequena resposta entre RSNA e PNA foi observada.

Diferenças significativas nas alterações de PAM, FC, RSNA e PNA produzidas pela microinjeção de bicuculina foram encontradas ao compararmos os grupos com forte e moderado disparos sincronizados de RSNA/PNA (figura 10).

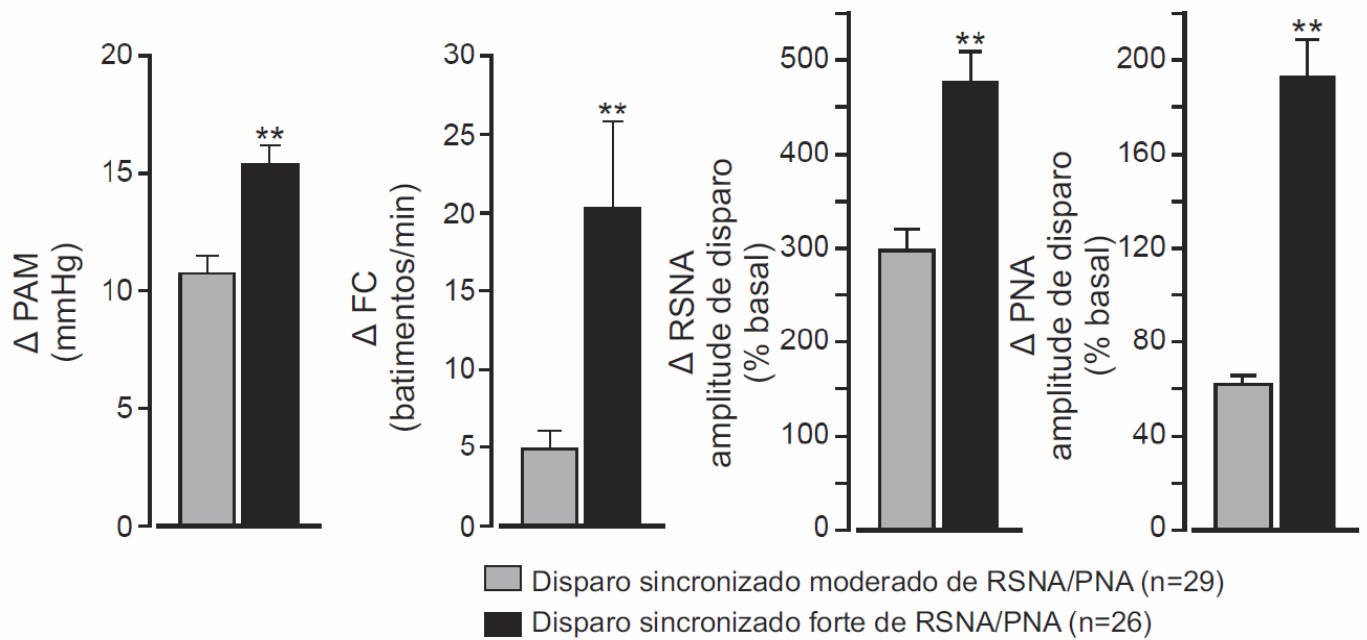


Figura 10: Alterações na PAM, FC, RSNA e PNA produzidas pela microinjeção unilateral de bicuculina. ** P < 0,001 grupo com disparos de RSNA/PNA fortemente sincronizados vs. grupo com disparos de RSNA/PNA moderadamente sincronizados.

Na maioria dos sítios de microinjeção que produziram forte disparo sincronizado de RSNA/PNA (17 sítios de 26), houve um início de bradicardia transiente seguido por taquicardia como exemplificado na figura 11.

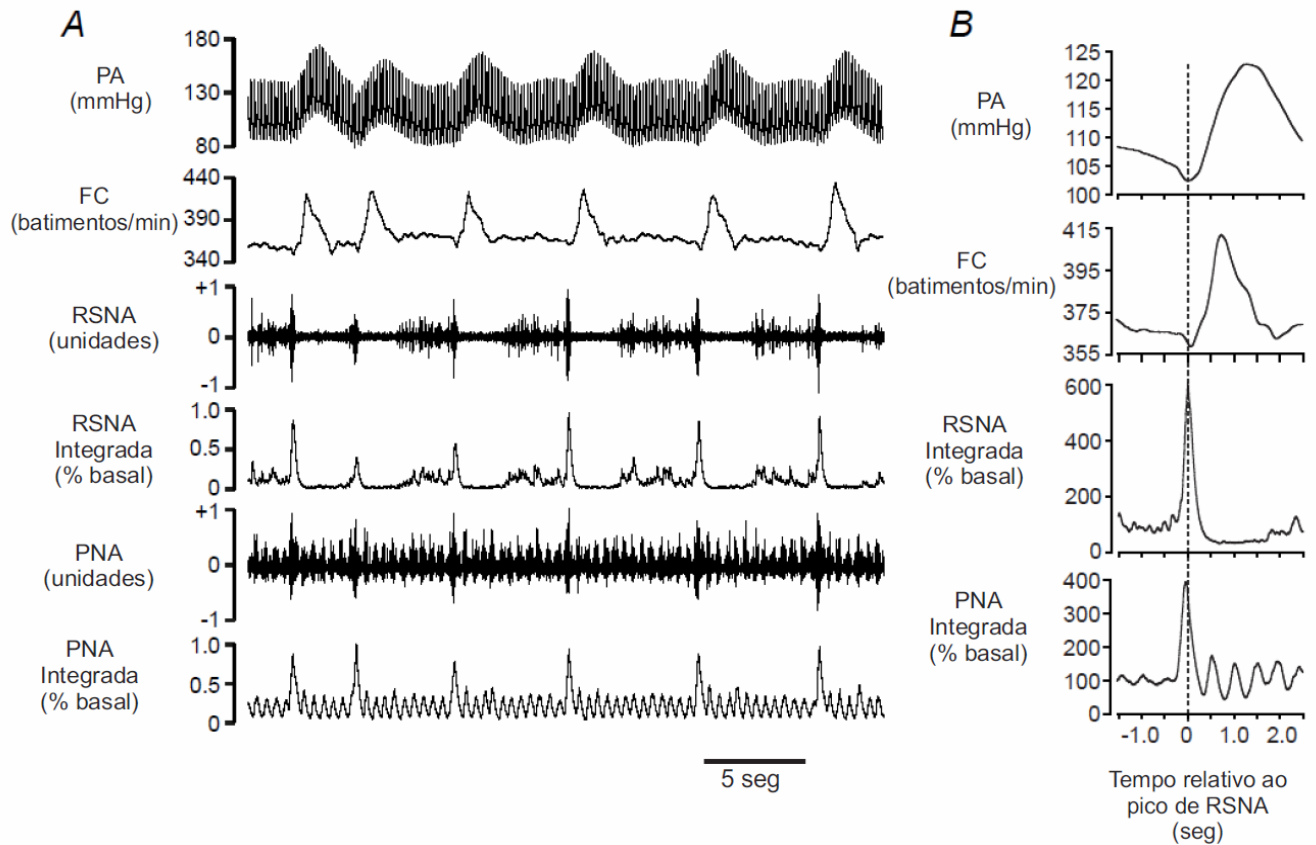


Figura 11: A: Registro mostrando o exemplo de uma resposta produzida pela microinjeção de bicuculina com disparos de RSNA acompanhados por disparos de PNA e alterações associadas na PAM e FC. B: resultados da média de disparos cíclicos para essa resposta onde o pico do sinal de RSNA integrado foi tirado como ponto de disparo (indicado pela linha pontilhada). É importante notar que a resposta de FC foi bifásica, com um transiente inicial de bradicardia seguida por taquicardia.

Localização dos sítios de microinjeção produzindo diferentes tipos de repostas

Como mostrado na figura 6, repostas com forte ou moderado disparo sincronizado de RSNA/PNA foram produzidas por microinjeções localizadas no colículo superior e inferior ou porções dorsomedial, dorsolateral e lateral da PAG, com exceção de 2 microinjeções localizadas na região dorsal do núcleo pré cuneiforme. Em particular, repostas com forte disparo sincronizado de RSNA/PNA foram produzidas por microinjeções localizadas na camada profunda do colículo superior e núcleo central e externo do colículo inferior. Em contraste, repostas com moderado disparo sincronizado de RSNA/PNA foram produzidas por microinjeções localizadas em regiões dorsais do núcleo externo do colículo inferior e nas camadas intermediárias e profunda do colículo superior (figura 6). As microinjeções de bicuculina em regiões ventrais ao colículo superior e inferior não produziram repostas ou produziram repostas sem sincronismo de disparos de RSNA e PNA.

O teste chi quadrado foi feito para determinar se as diferenças observadas na distribuição dos sítios de microinjeção produzindo diferentes repostas eram estatisticamente significativas. Para isto, 3 diferentes regiões foram definidas como demonstrado na figura 12. Essas 3 regiões eram: 1) porção dorsal do colículo, 2) porção ventral do colículo e 3) região fora do colículo. A maioria das repostas com forte disparo sincronizado de RSNA/PNA (92%) foram obtidas na região ventral do colículo enquanto que repostas com moderado disparo sincronizado de RSNA/PNA (67%) e com pequeno ou nenhum disparo sincronizado de RSNA/PNA foram obtidas na região dorsal do colículo e região fora do colículo ($P < 0,001$).

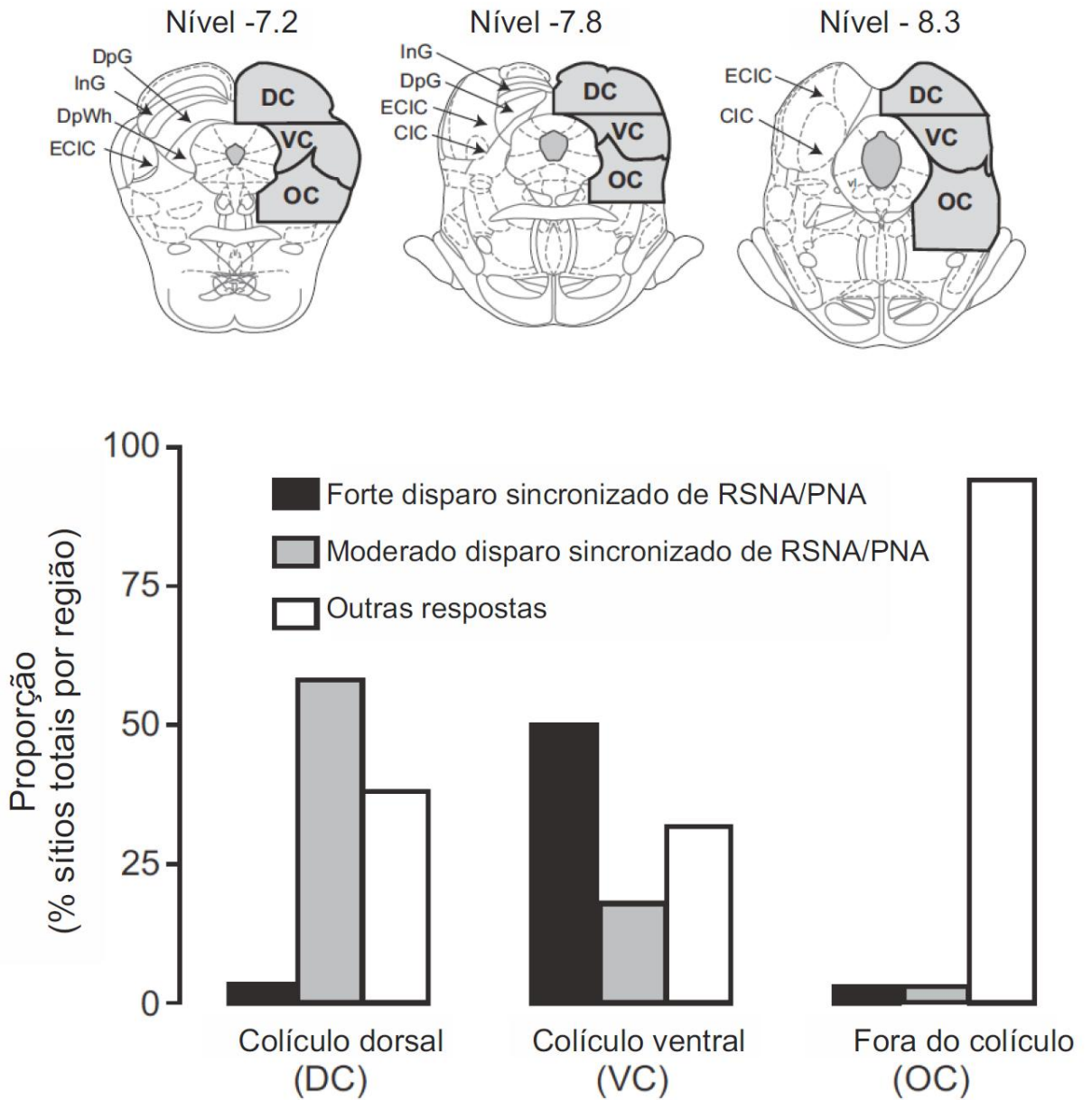


Figura 12: Proporções relativas das respostas com forte, moderado e pequeno ou nenhum disparo de RSNA/PNA sincronizado. (DC) porção dorsal do colículo, (VC) porção ventral do colículo e (OC) regiões fora do colículo.

Relação de tempo entre os disparos de RSNA e PNA

A média de disparos cíclicos foi usada para determinar a latência entre os picos de disparo de RSNA e PNA, onde o ponto inicial foi o pico do disparo de RSNA. Como mostrado na figura 4, o pico de PNA ocorreu antes do pico de RSNA. No caso das respostas com forte disparo sincronizado de RSNA e PNA, a diferença de tempo entre o pico de disparo foi 41 ± 8 ms.

O início dos disparos de PNA aconteceram imediatamente após o pico do disparo regular de PNA (figura 8C). O fato desses disparos irregulares de PNA não acontecerem randomicamente durante o ciclo respiratório normal reflete nos resultados da análise da média de disparos cíclicos, que mostrou que a média de PNA que antecedeu os disparos sincronizados de RSNA/PNA mostrou um padrão cíclico na mesma frequência do ritmo respiratório regular (figuras 9 e 11B). O grau de ocorrência do disparo de RSNA correlacionado com o ritmo respiratório normal em curso foi calculado pelo index de correlação do ciclo respiratório. Nesse index de correlação de ciclo respiratório, um valor de 100% implica que o disparo de RSNA ocorreu exatamente no mesmo ponto do ciclo respiratório normal, enquanto que um valor próximo a zero implica o tempo de disparo de RSNA não apresentou uma correlação consistente com o ciclo respiratório normal. Esses resultados mostram que o index de correlação respiratória foi $30,6 \pm 2,6\%$ para as 26 respostas onde ocorreu forte disparo sincronizado de RSNA/PNA, indicando que os disparos sincronizados de RSNA/PNA não aconteceram em pontos randomizados no ciclo respiratório normal. Como mostrado anteriormente, o início do disparo de PNA ocorreu em maior frequência imediatamente após o pico de um disparo regular de PNA (figura 8C).

Para as 29 respostas onde ocorreu moderado disparo sincronizado de RSNA/PNA, e para as 5 respostas onde os disparos de RSNA/PNA aconteceram mas sem alteração significativa no padrão de PNA, o index de correlação respiratória foi $28 \pm 2\%$ e $35,8 \pm 3,6\%$. Os valores calculados para esse index não foram significativamente diferentes entre os 3 tipos de resposta ($P=0,329$). Portanto o tempo de início de disparo de RSNA em todos os casos foi relacionado ao ciclo respiratório normal, independentemente se o disparo de RSNA era ou não associado com o disparo de PNA.

Disparos de PNA e RSNA em ratos com bloqueio neuromuscular, vagotomizados e artificialmente ventilados

Em 2 experimentos adicionais, os animais foram vagotomizados, paralisados e artificialmente ventilados. Sob essas condições, a microinjeção de bicuculina também produziu forte disparo sincronizado de RSNA/PNA (figura 13). Os sítios de microinjeção que produziram essas respostas estavam localizados na camada profunda do colículo superior e no núcleo externo do colículo inferior como observado nos experimentos anteriores, utilizando animais respirando espontaneamente. É possível observar que os disparos sincronizados RSNA/PNA ocorreram após o disparo respiratório normal (na fase pós inspiratória), consistente com os resultados obtidos com os animais respirando espontaneamente. Este experimento ainda mostrou que a amplitude do disparo de PNA sincronizado com o disparo de RSNA foi parecido com o disparo regular de PNA antecedente.

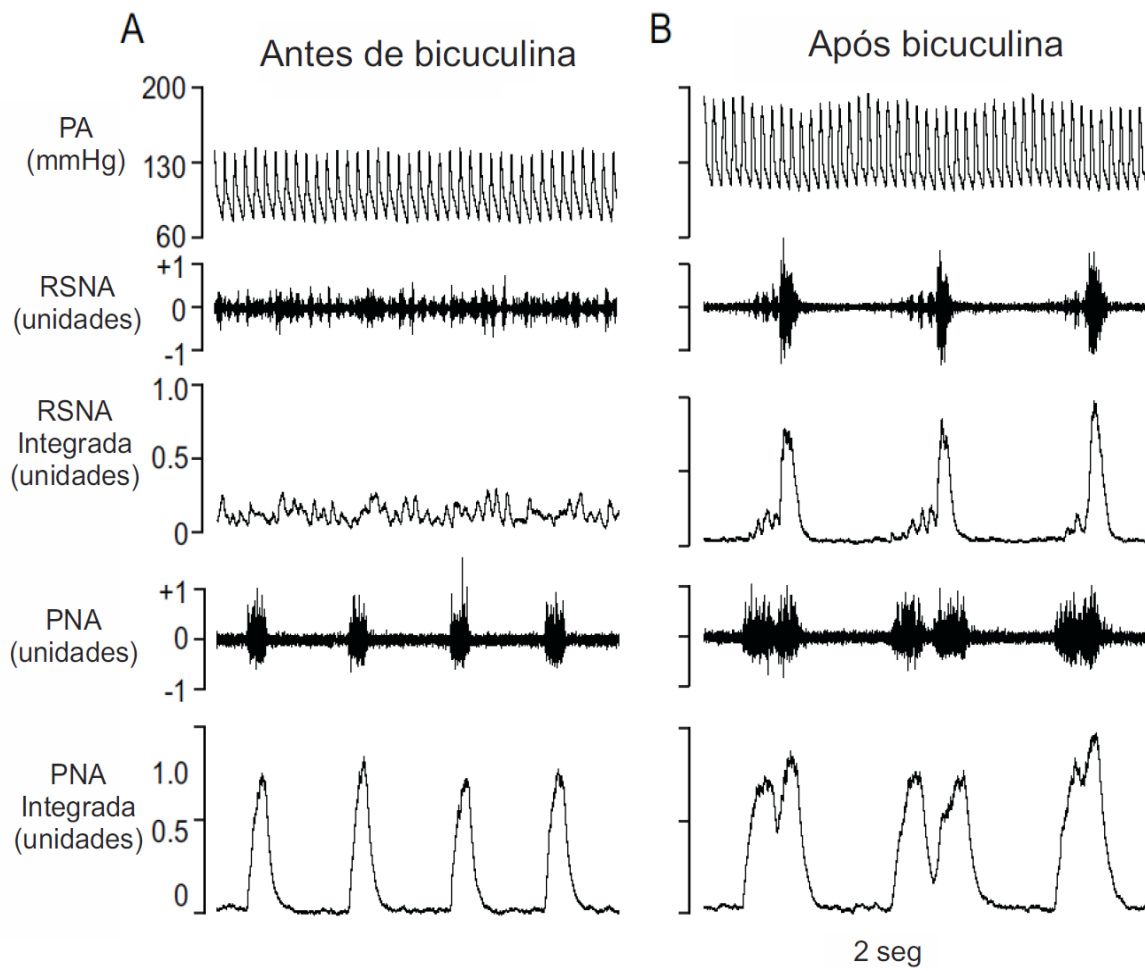


Figura 13: Exemplo do registro de PA, RSNA e PNA antes (A) e após (B) microinjeção de bicuculina no colículo inferior de um rato vagotomizado, paralisado e artificialmente ventilado.

Respostas cardiovascular, respiratória e somatomotora ao estímulo auditivo, visual e somatosensorial após microinjeção de picrotoxina no colículo

Em uma nova série de experimentos, foram feitas microinjeções de picrotoxina (50pmol/ 50nl) em 124 sítios do colículo superior e inferior de ratos anestesiados, vagotomizados, paralisados e artificialmente ventilados. Sob condições basais, antes da microinjeção de picrotoxina, nenhuma alteração na atividade simpática do nervo esplâncnico, nervo frênico e nervo ciático foram produzidas pelo estímulo auditivo (palma das mãos; ex: figura 14 A), visual (flash de luz) ou somatosensorial (aperto forte na pata traseira) em ratos anestesiados. No entanto, o estímulo auditivo, visual ou somatosensorial após a microinjeção de picrotoxina em 57 sítios do colículo superior e inferior, gerou uma ativação imediata e sincronizada na SpSNA e PNA, seguida por aumento na PA (figura 14 A, B). Na maioria desses sítios, (37 de 57), a microinjeção de picrotoxina não alterou os níveis basais de SpSNA, PNA e ScNA e nos 20 sítios de microinjeção remanescentes foram observados efeitos variáveis tais como uma resposta transiente ou uma resposta sustentada moderada. Em 7 sítios positivos, foram observados disparos espontâneos sincronizados na SpSNA e PNA em adição aos disparos produzidos pelos estímulos após a desinibição do colículo superior e inferior.

Após a microinjeção de picrotoxina, o estímulo auditivo produziu uma resposta em 96% dos sítios positivos, enquanto que o estímulo visual e somatosensorial produziram respostas em 46 e 40 % respectivamente (figura 15). Os 3 estímulos produziram respostas em 9 dos 35 sítios positivos nos quais todos os estímulos foram testados (figura 14 A). Em todos os 57 sítios de

microinjeção, aumentos na SpSNA e PNA foram sempre observados. As respostas simpática e respiratória ao estímulo de alerta ainda foram acompanhadas por uma resposta somatomotora (aumento na atividade do nervo ciático) em 30 dos 42 sítios de microinjeção nos quais a atividade do nervo ciático também foi registrada (figura 14 A, B).

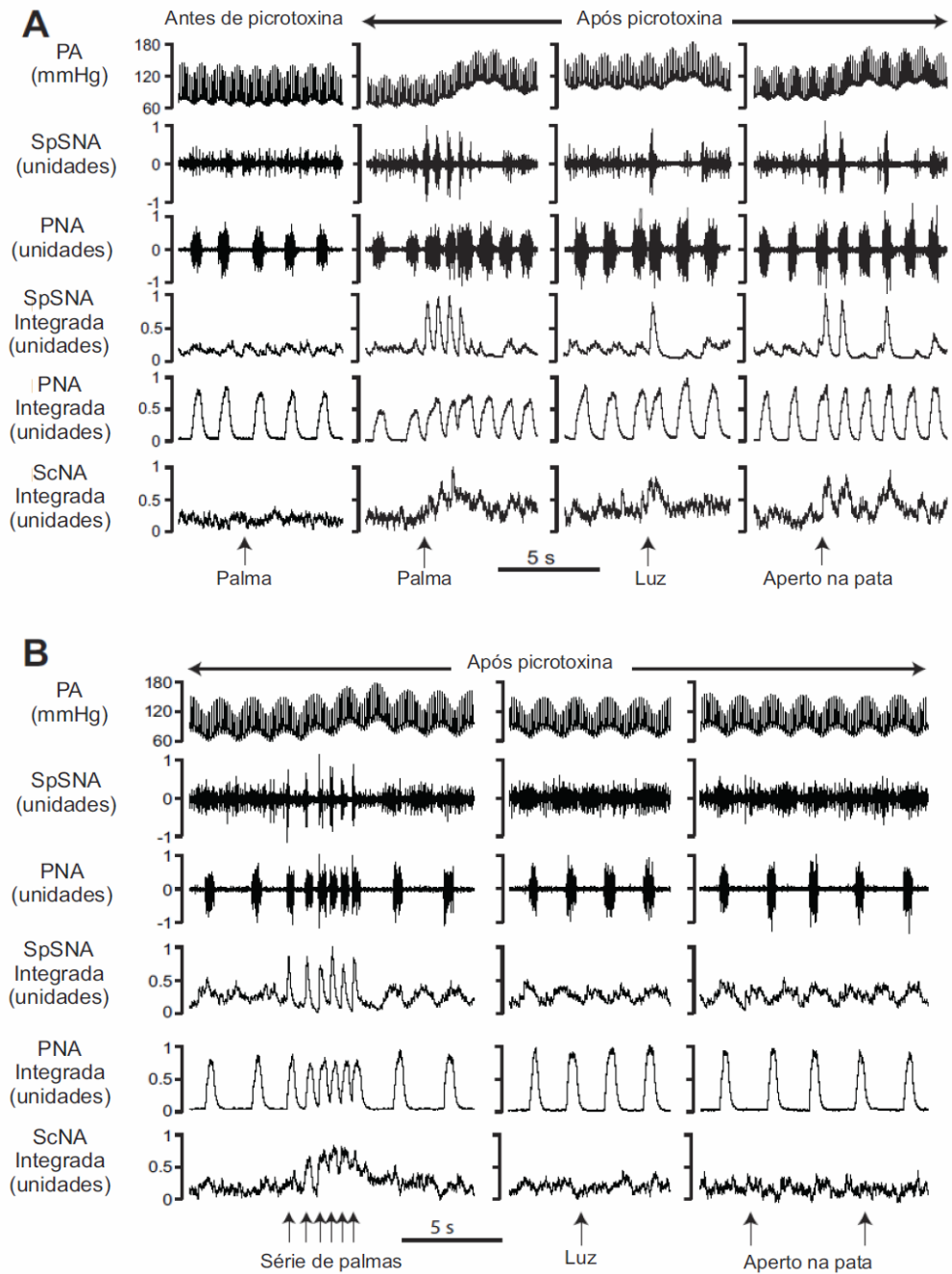


Figura 14: (A) Exemplo de registro mostrando os efeitos de um estímulo auditivo (palma) na PA, SpSNA, PNA e ScNA antes e após microinjeção de picrotoxina num sítio responsivo do colículo. Nenhuma resposta foi obtida antes da injeção de picrotoxina, mas após microinjeção de picrotoxina, o estímulo auditivo bem como o visual (luz) e somatosensorial (aperto na pata traseira) produziu alterações em todas as variáveis. **(B)** Exemplo de uma resposta obtida em outro experimento em que o estímulo auditivo promoveu alterações em todas as variáveis enquanto o estímulo visual e somatosensorial não tiveram efeito.

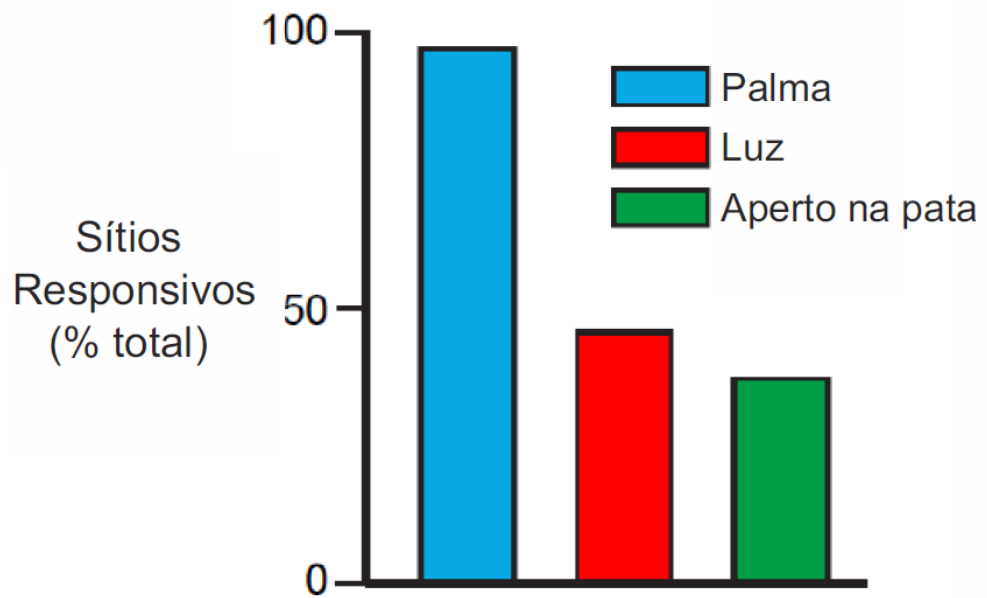


Figura 15: Proporção de todos os sítios testados para os 3 diferentes estímulos sensoriais (palma, luz e aperto na pata traseira) nos quais cada estímulo produziu uma resposta.

Em 5 animais foram comparadas as respostas pressora, simpática e respiratória produzidas pelo estímulo auditivo após microinjeção de picrotoxina nos lados direito e esquerdo do colículo superior e inferior. As respostas autonômicas e respiratória produzidas pelo estímulo auditivo foram similares após desinibição do lado direito e esquerdo do colículo (figura 16).

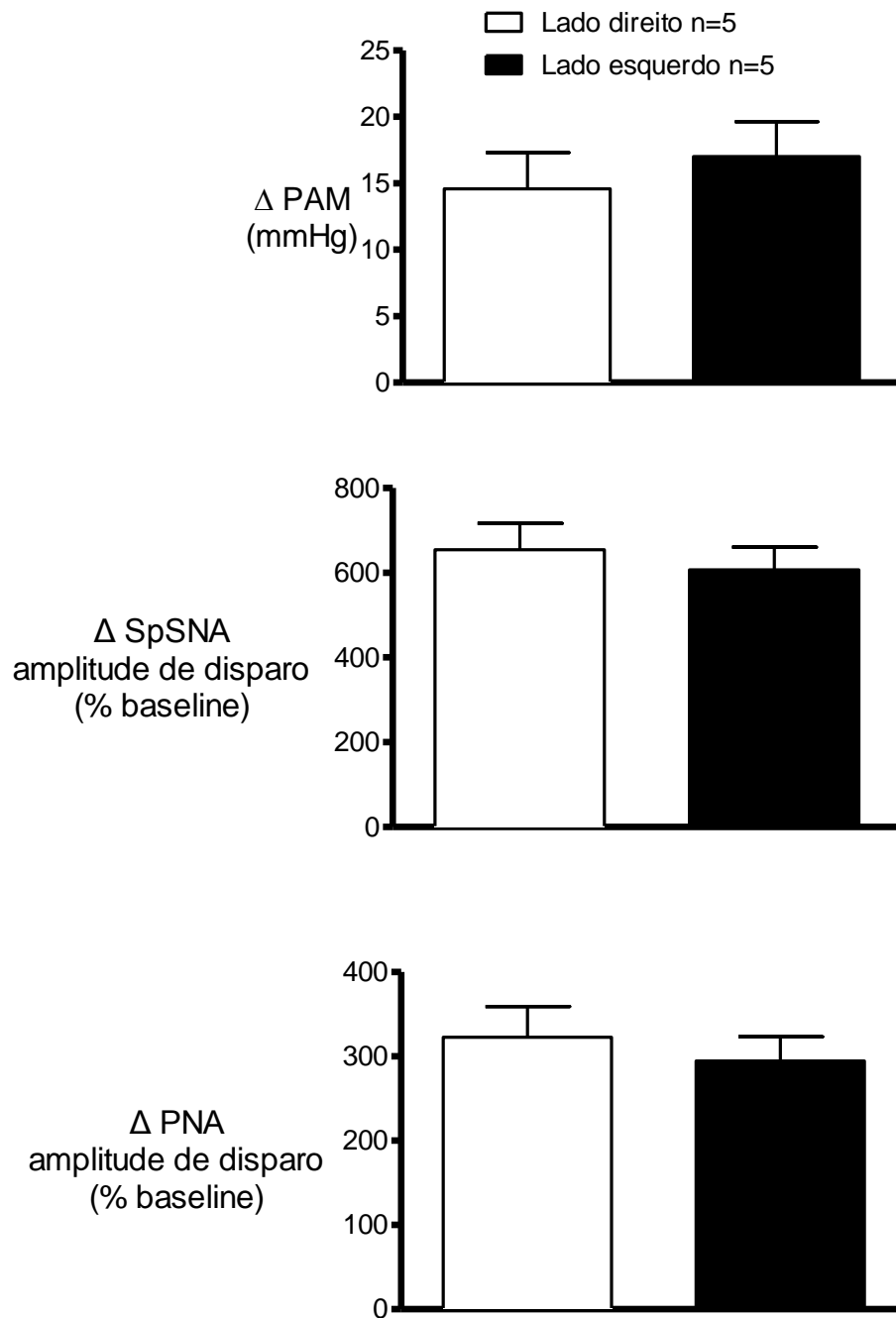


Figura 16: Alterações máximas na PAM, SpSNA e PNA provocadas pelo estímulo auditivo após microinjeção de picrotoxina nos lados direito e esquerdo do colículo superior.

Ao compararmos a magnitude das alterações na PAM, atividade simpática do nervo esplâncnico e atividade do nervo frênico produzidas pelos 3 diferentes estímulos de alerta, não observamos nenhuma diferença entre a magnitude dessas respostas (figura 17).

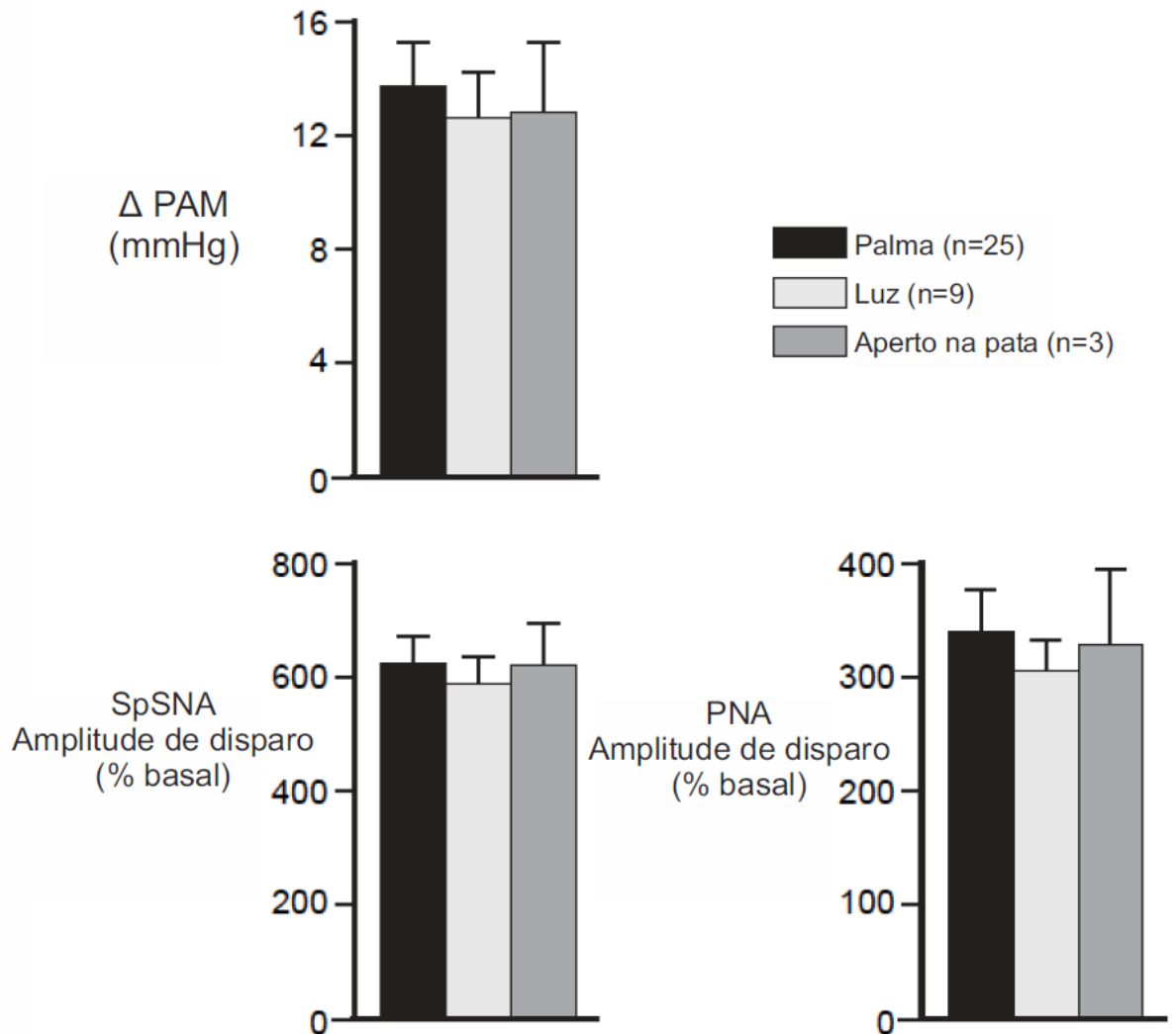


Figura 17: Alterações na PAM, SpSNA e PNA produzidas pelo estímulo auditivo, visual e somatosensorial após microinjeção unilateral de picrotoxina.

Relação do tempo entre as respostas produzidas pelos estímulos de alerta.

A característica marcante das respostas aos estímulos naturalísticos foi a estreita sincronia entre as respostas simpática, respiratória e somatomotora (figura 18). A média de disparos cíclicos foi feita para determinar a latência entre os picos dos disparos sincronizados de SpSNA, PNA e ScNA e as alterações associadas na PAM produzidas pelo estímulo auditivo (figura 18). O início das respostas de PNA e ScNA ao estímulo auditivo consistentemente precederam o início do disparo de SpSNA (figura 18 C) por $26,0 \pm 2,7$ e $41,7 \pm 2,7$ ms, respectivamente (figura 19 A). De maneira similar, início das respostas de PNA e ScNA ao estímulo visual precederam o início do disparo de SpSNA por $30,0 \pm 4,2$ e $48,3 \pm 4,4$ ms, respectivamente (figura 19 A). Essas diferenças no tempo de resposta em todos os casos foram significativamente diferente de zero, tanto para o estímulo auditivo quanto para o estímulo visual ($P < 0.001$). Além disso, a diferença entre o tempo do início das respostas de ScNA e SpSNA, foi maior que a diferença de tempo entre PNA e SpSNA quando o estímulo auditivo ou visual foram aplicados ($P < 0,01$ e $P < 0,05$; respectivamente, figura 19A). Deste modo, após o estímulo auditivo e visual, a resposta na ScNA ocorreu primeiro seguida pela resposta na PNA e então a resposta de SpSNA. No entanto, a latência das respostas na SpSNA relativas às respostas na PNA e ScNA não foram significativamente diferentes ao compararmos o estímulo auditivo e visual ($P > 0,3$; figura 18A). Além disso, a magnitude dos disparos de SpSNA e PNA produzidas pelo estímulo auditivo foram em ambos os casos similares à resposta produzida pelo estímulo visual (figura 19 B).

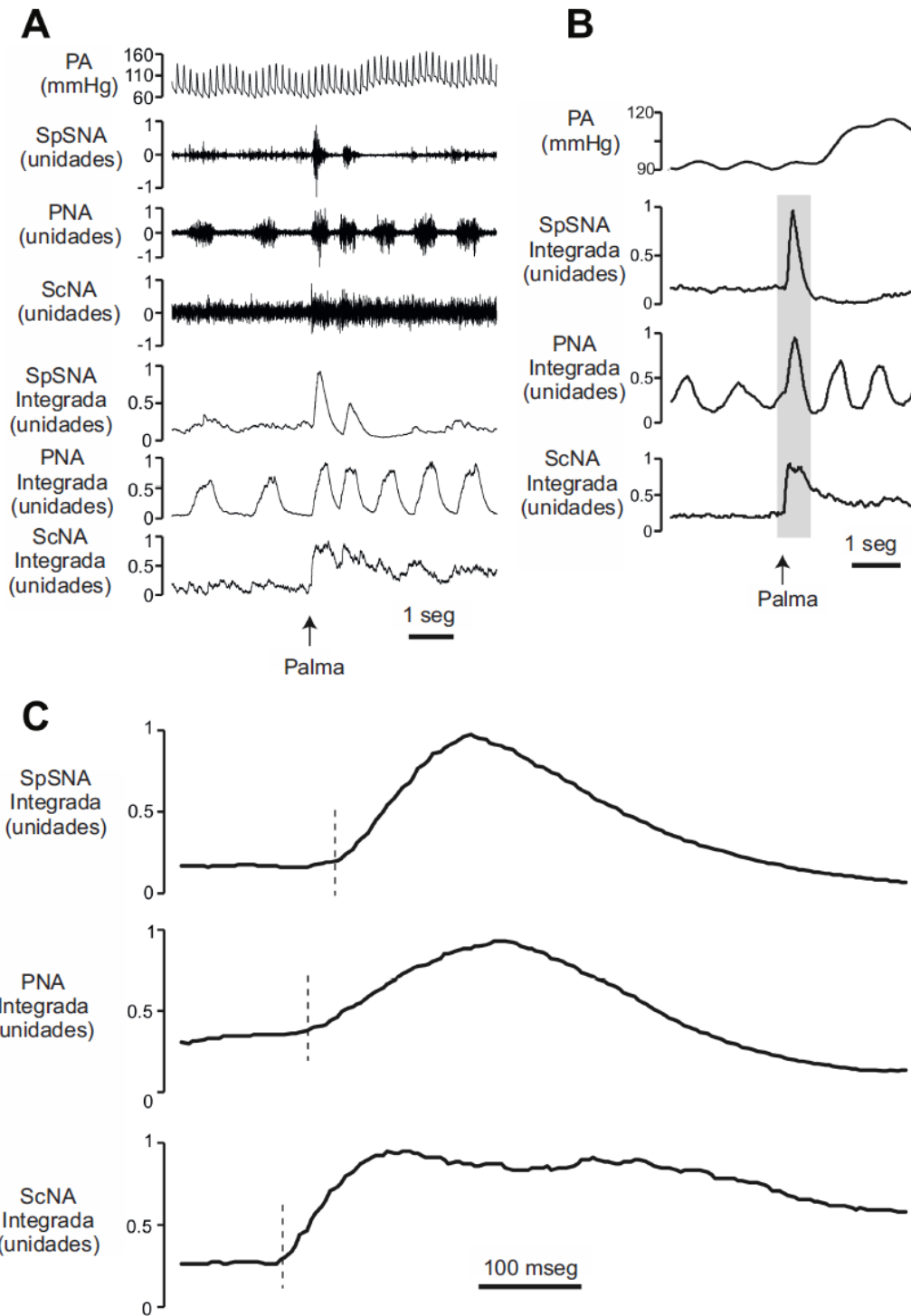


Figura 18: Média de disparos cíclicos das respostas produzidas pelo estímulo auditivo. A, exemplo da resposta produzida por um estímulo auditivo (palma) na PA, SpSNA, PNA e ScNA. B, média de disparos cíclicos para 10 respostas produzidas pelo estímulo auditivo após microinjeção de picrotoxina no colículo. C, proporção da média das respostas (indicada pelo sombreado em B), mostrando que o início dos disparos de PNA e ScSNA ocorreram antes do início do disparo de SpSNA. O ponto de início de cada variável está mostrado pela linha vertical pontilhada.

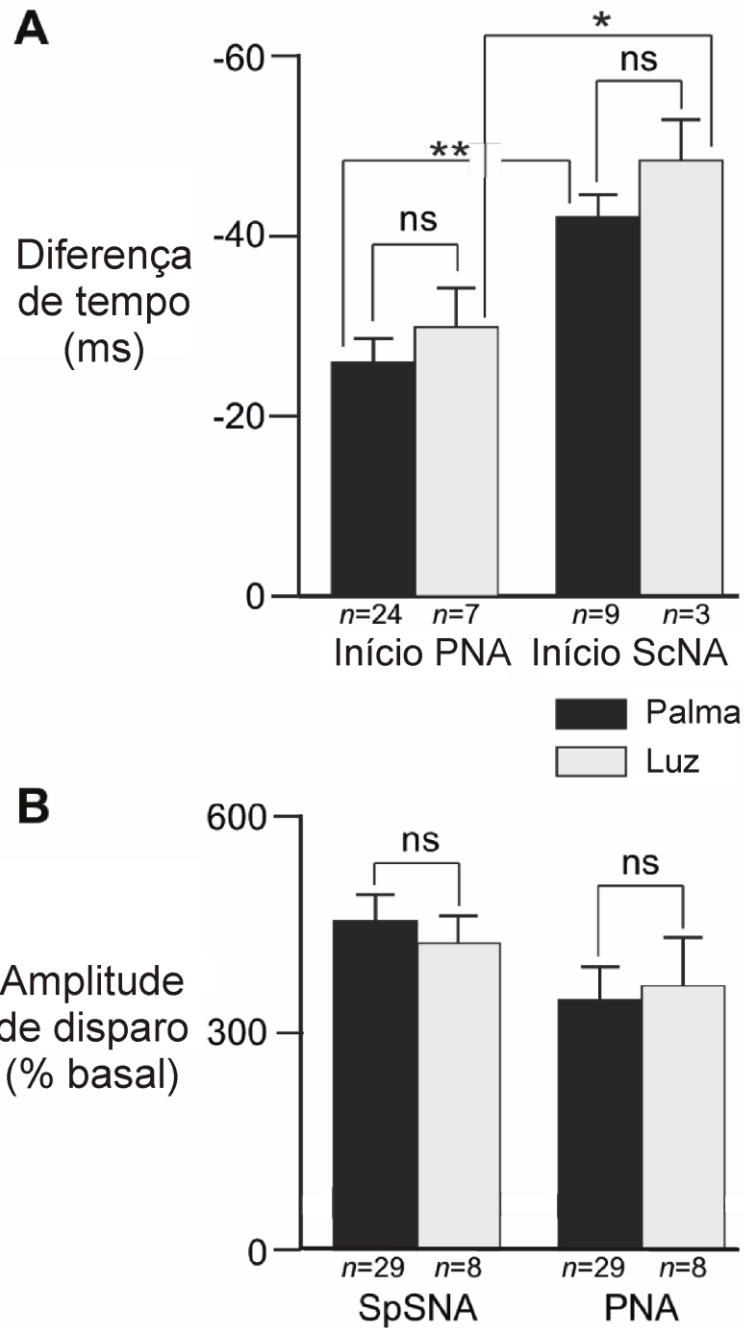


Figura 19: Diferença de tempo e amplitude nas respostas produzidas pelo estímulo. A, histograma mostrando a diferença de tempo (média \pm erro padrão da média) entre o início do disparo de SpSNA e início do disparo de PNA e ScNA. Os valores negativos indicam que os disparos de PNA e ScNA antecederam os disparos de SpSNA. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, ns, não significativo. B, histograma mostrando a magnitude das respostas produzidas pelo estímulo auditivo e visual na SpSNA e PNA através da média de disparos cíclicos.

Localização dos sítios de microinjeção positivos

Os sítios de microinjeção de picrotoxina foram representados na figura 15 em diferentes cores e símbolos de acordo com a modalidade do estímulo ao qual o sítio de microinjeção foi responsivo. A localização dos 57 sítios positivos para o estímulo naturalístico predominaram na camada profunda do colículo superior, núcleo central e externo do colículo inferior, com poucos sítios na região adjacente à porção lateral da PAG e núcleo pré-cuneiforme (figura 20 A). De maneira similar, os sítios de microinjeção de bicuculina capazes de gerar respostas simpática e respiratória sincronizadas também estavam localizados na mesma região.

Não foi observada uma região específica do colículo superior e inferior responsiva para cada tipo de estímulo (auditivo, visual ou somatossensorial) (figura 20 B).

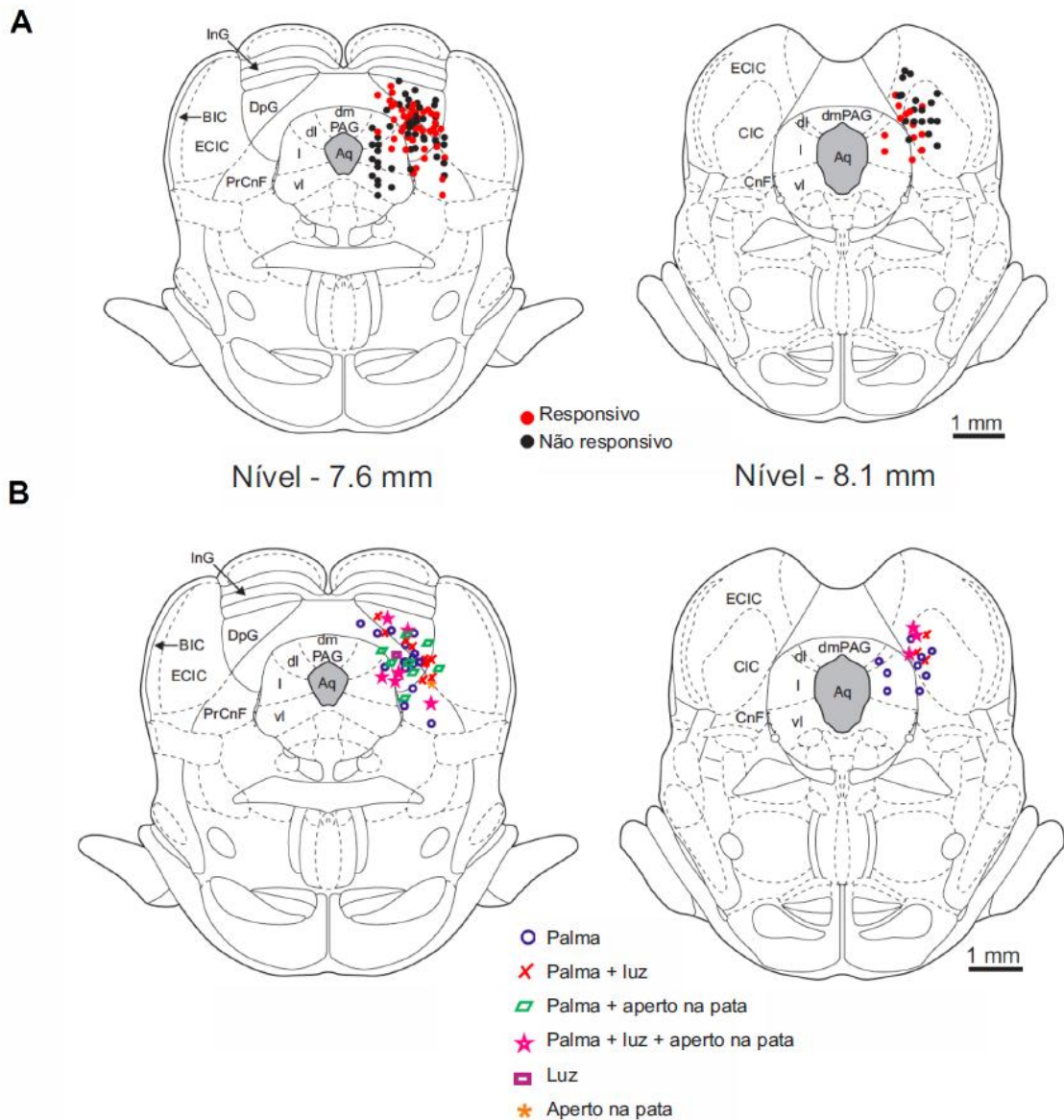
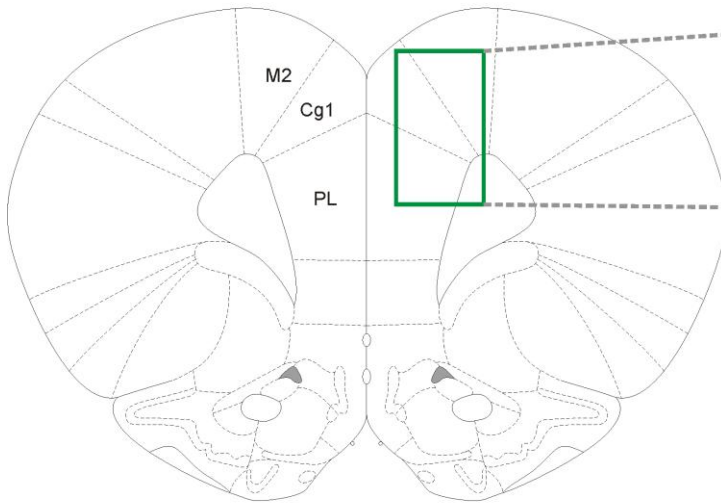


Figura 20: Diagrama esquemático das seções coronais do Atlas de Paxinos e Watson ilustrando os sítios de microinjeção de picrotoxina no colículo superior e inferior. A: distribuição dos sítios de microinjeção responsivos (círculos vermelhos) e não responsivos (círculos pretos) ao estímulo naturalístico. B: distribuição dos sítios de microinjeção responsivos a diferentes modalidades sensoriais. Os diferentes símbolos indicam a modalidade do estímulo naturalístico ao qual o sítio de microinjeção foi responsivo. InG, camada cinza intermediária do colículo superior; DpG, camada cinza profunda do colículo superior; DpWh, camada branca profunda do colículo superior; ECIC, cortex externo do colículo inferior; CnF, núcleo cuneiforme; PrCnF, núcleo pré-cuneiforme; dmPAG, porção dorsomedial da substância cinzenta periaquedutal; dl, porção dorsolateral da substância cinzenta periaquedutal; I, porção lateral da substância cinzenta periaquedutal; vl, porção ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal; Aq, aqueduto; CIC, comissura do colículo inferior.

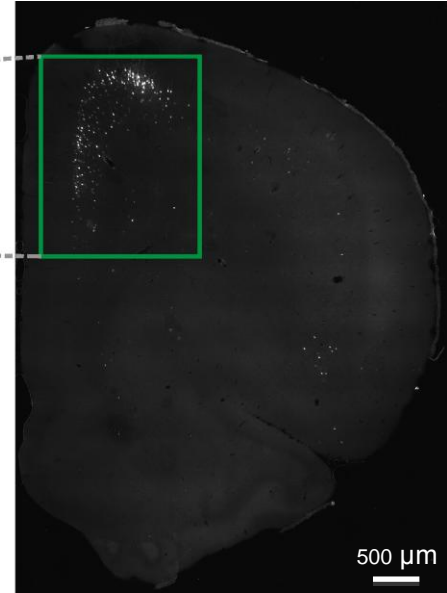
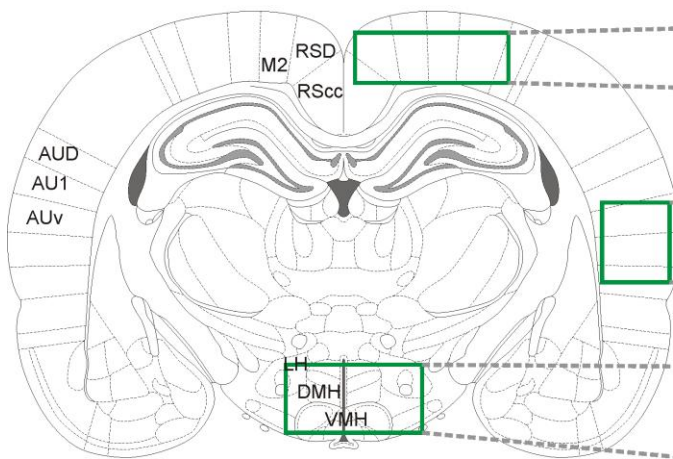
Projeções Aferentes para o colículo superior e inferior

A microinjeção unilateral do traçador CTB – Alexa 555 (0,5 – 1%, 50 nl) no colículo superior direito expressou densa marcação neuronal bilateral no córtex pré-frontal medial, mais especificamente na região pré-límbica (PL) e cingulado (Cg1) do córtex pré-frontal medial; e córtex motor secundário (M2). De maneira interessante também foi observada densa marcação bilateral de neurônios no hipotálamo ventromedial (VMH), córtex disgranular (RSD), córtex agranular (RSCc), córtex de associação parietal medial (MPtA), córtex de associação parietal lateral (LPtA), córtex somatosensorio primário (SITr), córtex auditivo secundário (AuD) e primário (Au1) (figura 21).

A inibição bilateral utilizando muscimol, um agonista de receptor GABA_A, do hipotálamo dorsomedial (DMH), substância cinzenta periaquedutal (PAG), núcleo cuneiforme (CnF) e núcleo parabraquial lateral (LPB) não bloqueou a resposta simpática, respiratória e somatomotora sincronizada produzida pelo estímulo naturalístico após microinjeção de picrotoxina no colículo (dados não mostrados).

A

Nível + 3.24 mm

**B**

Nível - 3.24 mm

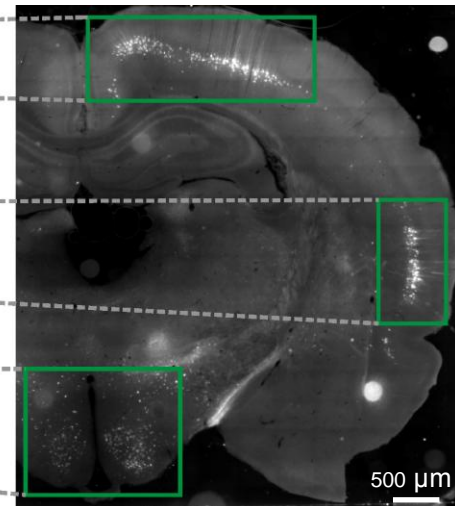


Figura 21: Diagrama esquemático e fotomicrografia de cortes coronais ao nível do córtex pré-frontal (A) e hipotálamo (B) mostrando marcação neuronal retrógrada após microinjeção de CTB no colículo superior. PL, região pré-límbica; Cg1, cíngulo; M2, córtex motor secundário; VMH, hipotálamo ventromedial; DMH, hipotálamo dorsomedial; LH, hipotálamo lateral; RSD, córtex disgranular; RScC, córtex agranular; MPtA, córtex de associação parietal medial; LPtA, córtex de associação parietal lateral; SITr, córtex somatossensório primário; AuD, córtex auditivo secundário e Au1, córtex auditivo primário.

Efeitos da descerebração

Em 4 experimentos adicionais foi feita a descerebração pré colicular após microinjeção de bicuculina metiodide para determinar se as regiões encefálicas e prosencefálicas eram essenciais para obter as respostas cardiovasculares, simpática e respiratória ao estímulo naturalístico. Em todos esses experimentos, o sítio de microinjeção responsivo ao estímulo auditivo após desinibição do colículo foi identificado antes de iniciar a descerebração. Após a remoção do prosencéfalo (figura 22 C), incluindo o córtex pré-frontal medial, amígdala, córtex auditivo, hipotálamo dosomedial, área perifornical e hipotálamo lateral, o estímulo auditivo foi capaz de gerar disparos altamente sincronizados de SpSNA e PNA somente após a desinibição da região colicular (figura 22 A e B). Similar aos experimentos com o cérebro intacto, a média de disparos cíclicos mostrou que o pico do disparo da PNA ocorreu milisegundos antes do pico da SpSNA, com uma diferença de -20 ± 4 ms entre o disparo de SpSNA e PNA. Como mostrado anteriormente, disparos espontâneos e sincronizados de atividade simpática e atividade respiratória foram obtidos após microinjeção de bicuculina em adição aos disparos sincronizados gerados pelo estímulo auditivo.

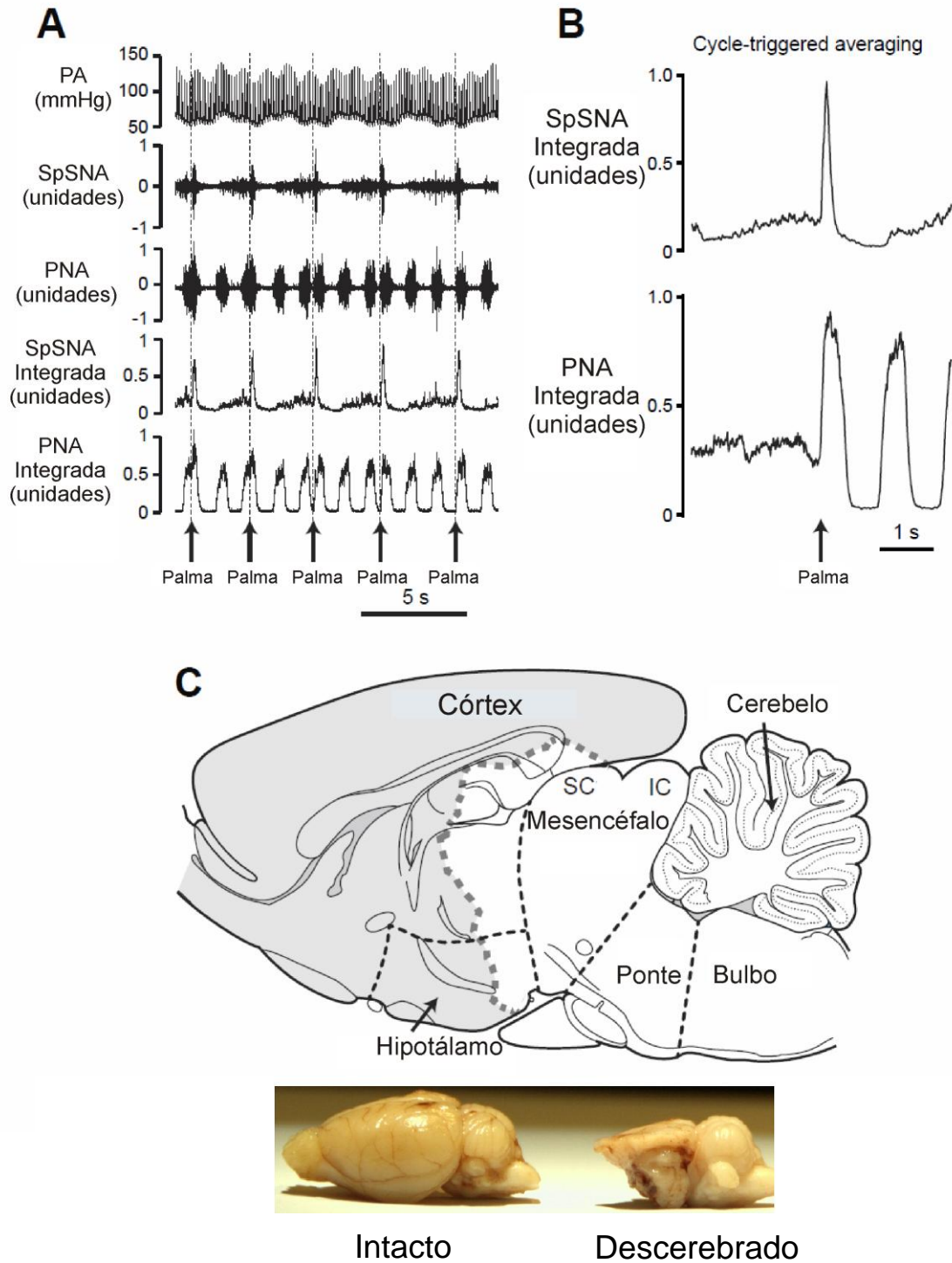


Figura 22: A, Exemplo da resposta produzida por uma série de palmas na PA, SpSNA e PNA após microinjeção de bicuculina no colículo em um rato após descerebração. B, média de disparos cíclicos para 3 respostas produzidas pelo estímulo auditivo. O trigger point foi o início do aumento na SpSNA indicado pela linha pontilhada. C, Diagrama indicando a extensão da descerebração e fotografia comparando um cérebro intacto e cérebro após descerebração.

Projeções Eferentes do colículo superior e inferior

Após a microinjeção unilateral do traçador CTB – Alexa 555 (0,5 – 1%, 50 nl) no colículo superior direito foi observada densa marcação de terminais axonais ipsilaterais ao sítio de microinjeção na PAG, mais especificamente nas porções dorsomedial (dm), dorsolateral (dl), lateral (l) e ventrolateral (vl) (figura 23 A). Também foi observado marcação unilateral de terminais axonais no núcleo paragigante celular lateral (LPGi), núcleo reticular gigantocelular ventral (GiV) e núcleo dorsal da oliva inferior (IOD), regiões estas que fazem parte do bulbo rostral ventromedial (RVMM), localizado no tronco encefálico (figura 23 B).

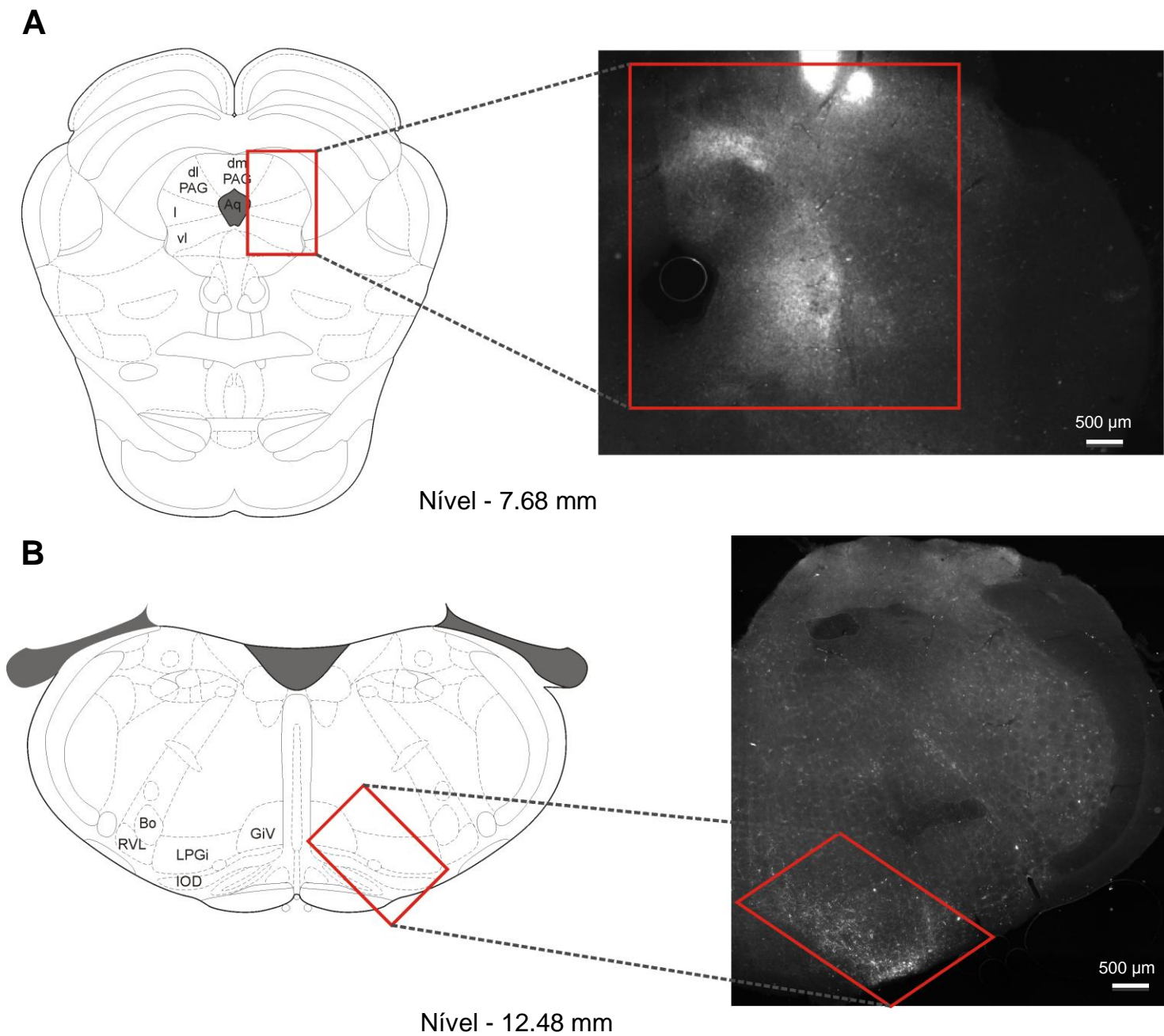


Figura 23: Diagrama esquemático e fotomicrografia de cortes coronais ao nível do mesencéfalo - substância cinzenta periaquedutal (A) e tronco encefálico - bulbo rostral ventromedial (B) mostrando marcação neuronal anterógrada após microinjeção de CTB no colículo superior. dm, porção dorsomedial; dl, dorsolateral; I, lateral; vl, ventrolateral da substância cinzenta periaquedutal; LPGi, paragigante celular lateral; GiV, núcleo reticular gigantocelular ventral e IOD, núcleo dorsal da oliva inferior.

5. DISCUSSÃO

Os principais resultados desse estudo mostram que o colículo superior e colículo inferior estão sob forte tônus inibitório gabaérgico. Após a remoção da inibição gabaérgica, neurônios localizados em sítios específicos do colículo superior e inferior, são responsáveis por iniciar simultaneamente aumentos na atividade somatomotora bem como autonômica e respiratória como parte de uma resposta coordenada a um estímulo naturalístico de ameaça. Além disso, a resposta sincronizada ao estímulo naturalístico manteve-se presente após remoção do prosencéfalo, indicando que o circuito essencial envolvido nesse reflexo encontra-se no tronco encefálico.

Estudos prévios mostraram que a ativação química ou desinibição de neurônios no colículo superior podem gerar aumentos na PA, FC e respiração (Keay et al., 1988, Keay et al., 1990, Brandao et al., 1999). Nossos resultados corroboram com esses achados e mostram que a desinibição de neurônios localizados nessa região resulta em uma resposta simpática, respiratória e somatomotora altamente sincronizada. Os sítios de microinjeção que produziram os disparos de RSNA/ PNA mais intensos e que responderam ao estímulo naturalístico estavam localizados nos núcleos externo e central do colículo inferior e nas camadas profundas do colículo superior. De acordo com nossos achados, foi demonstrado previamente em ratos acordados, que a microinjeção de bicuculina nessas regiões produz uma resposta comportamental de defesa, caracterizada por fuga ou “freezing”(Caicedo and Herbert, 1993, Brandao et al., 1999, Brandao et al., 2005).

Já está bem descrito que um estímulo ameaçador, gera além da resposta comportamental, uma resposta cardio-respiratória (Li et al., 1997, Kanbar et al.,

2007, Dampney et al., 2008, Kabir et al., 2010). O aumento na pressão arterial, aumenta a perfusão do tecido músculo-esquelético ativo, enquanto que o aumento na RSNA, juntamente com aumentos na atividade de nervos vasomotores simpáticos redistribuem o aumento da atividade cardíaca para o tecido músculo-esquelético ativo (Dampney et al., 2008). Ao mesmo tempo, o aumento na atividade respiratória, aumenta a captação de oxigênio nos pulmões. Portanto, nossos achados são consistentes com a proposta de que existem neurônios no colículo superior e inferior que são capazes de gerar respostas comportamentais altamente coordenadas, acompanhadas de alterações cardiovasculares e respiratórias apropriadas que permitem que o animal escape de um estímulo ameaçador tal como a aparição de um predador sinalizado por uma via auditiva ou visual (Dean et al., 1989, Brandao et al., 1999).

Padrão de resposta simpática e respiratória gerada após desinibição de receptores GABA

Foi demonstrado previamente que disparos de baixa frequência de atividade simpática similares aos observados no presente estudo, foram produzidos por microinjeções de bicuculina no núcleo paraventricular do hipotálamo (Kenney et al., 2001). Os mecanismos responsáveis por esse padrão de disparos são desconhecidos mas provavelmente devem ser consequentes do bloqueio completo da inibição GABA e resultante da hiperexcitabilidade dos neurônios (Heyer et al., 1981). Independente dos mecanismos precisos responsáveis pela geração dos disparos após microinjeção de bicuculina, foi observado um mecanismo na região colicular

capaz de gerar ativação altamente sincronizada de resposta simpática e respiratória.

Como mostrado nos resultados, disparos irregulares de PNA foram distintos pelo fato de serem super-impostos sobre os disparos rítmicos normais de PNA e sempre associados com um disparo sincronizado de RSNA. Além disso, a média de disparos cíclicos mostrou que os disparos de RSNA eram sempre acompanhados de um aumento transiente mas substancial na PAM de 10 -15 mmHg , sugerindo que a atividade simpática em outros leitos vasculares também estava aumentada.

Por outro lado, alterações na FC foram mais variáveis, mas na maioria das vezes, bifásica, com uma bradicardia transiente inicial seguida por uma taquicardia. Apesar de não termos testado as contribuições ds nervos simpático e cardíaco vagal à resposta da frequência cardíaca, uma possível explicação para essa variabilidade seria o aumento simultâneo tanto na atividade simpática quanto atividade vagal cardíaca. Tal co-ativação é comumente produzida pela estimulação de vários reflexos, incluindo o quimiorreflexo, reflexo nociceptivo e reflexo ocular. Tem sido sugerido que tal ativação é padrão mais que exceção (Paton et al., 2005, Paton et al., 2006). Além disso, é interessante notar que a co-ativação simpática e cardíaca vagal é frequentemente produzida quando um estímulo de alerta induz um reflexo de orientação (Abdeen et al., 1995, Baudrie et al., 1997), o que pelo menos quando sinalizado por um estímulo visual, é gerado por neurônios localizados no colículo superior (Dean et al., 1989, Stein, 1998).

Possível mecanismo responsável pela ativação simpática e respiratória sincronizada

Existem dois possíveis mecanismos capazes de gerar os disparos sincronizados de RSNA e PNA observados neste estudo. Primeiro, um aumento na atividade respiratória ativaria receptores no pulmão ou caixa torácica que de maneira reflexa aumentaria a RSNA. Essa explicação pode ser descartada pois os disparos sincronizados RSNA/PNA foram observados em ratos vagotomizados, paralisados e artificialmente ventilados em que o feedback aferente relacionado ao enchimento do pulmão foi removido. Dessa forma, a explicação mais plausível seria que esses disparos sincronizados de RSNA e PNA sejam mediados por um mecanismo central comum gerado pela ativação de neurônios no colículo. De acordo com essa hipótese, os disparos de RSNA não aconteceram precisamente simultâneos aos disparos de PNA. Foi observado um leve atraso entre os disparos de PNA e RSNA de 41 ± 8 ms. Esse atraso seria esperado se os disparos em ambas RSNA e PNA fossem geradas por uma população comum de neurônios no colículo, uma vez que fibras pós ganglionares simpáticas não são mielinizadas (Janig, 1988) e por isso possuem uma velocidade de condução menor que os axônios mielinizados dos neurônios motores do frênico (Pickering and Jones, 2007). Não parecem existir projeções diretas do colículo superior ou inferior para neurônios motores do frênico ou neurônios pré ganglionares simpático renal na medula espinhal (Sly et al., 1999, Lois et al., 2009) e então os efeitos nesses grupamentos eferentes devem ser mediados via outros neurônios centrais propostos com S ou R na figura 24.

Disparos na RSNA foram observados algumas vezes sem sincronismo com disparos na PNA, apesar do oposto não ter ocorrido. Uma possível explicação para isto, seria o fato de que neurônios simpáticos centrais que recebem aferências de neurônios comando no colículo, tem um limiar de disparo mais baixo que neurônios respiratórios que também recebem aferências de neurônios comando (figura 24).

Já está bem descrito que existem conexões entre o gerador de padrão respiratório, responsável pelo ritmo respiratório normal e neurônios centrais que comandam a atividade simpática (Adrian et al., 1932, Habler et al., 1994, Malpas, 1998). Poderia ser sugerido que os “neurônios comando” poderiam simplesmente enviar um projeção para o gerador de padrão respiratório e indiretamente, gerar um aumento na atividade simpática via o acoplamento normal entre o gerador de padrão respiratório e fluxo eferente simpático. No entanto, existem 3 observações que sugerem que o acoplamento entre o gerador de padrão respiratório e fluxo eferente simpático não é o principal mecanismo. Primeiro, os disparos irregulares de PNA associados aos disparos de RSNA ocorreram em tempos diferentes no ciclo respiratório normal, apesar de terem ocorrido com maior frequência imediatamente após o pico de um disparo regular de PNA. Deste modo, eles parecem ser gerados por mecanismos diferentes daquele que comanda o ciclo respiratório normal. Segundo, na maioria dos casos, a amplitude do disparo irregular de PNA foi moderado mas nunca associado com um aumento marcante na RSNA (figura 9 B). Terceiro, e mais importante, nos experimentos com animais paralisados e artificialmente ventilados (figura 13 B), os disparos irregulares de PNA foram claramente distintos do disparo regular normal de PNA que antecedeu o

disparo irregular. Em todos os casos, a amplitude do disparo irregular de PNA foi similar ao disparo regular, mas somente o disparo irregular foi associado ao disparo sincronizado de RSNA. Portanto, é possível sugerir que o sincronismo entre os disparos de RSNA e PNA são devido um mecanismo separado do acoplamento respiratório - simpático que acontece durante a respiração normal. Neste modelo, nós propomos que os neurônios respiratórios que comandam a PNA em resposta à projeção de neurônios comando locais, exercem sua ação independente do gerador de ritmo respiratório (figura 24).

Uma característica interessante dos disparos de RSNA quando acompanhados ou não por disparos sincronizados de PNA, foi o fato de cada disparo ter sido imediatamente seguido por um período de 1-2 s em que o nível de atividade simpática do nervo renal foi evidentemente reduzida quando comparada com nível de atividade basal. Tem sido mostrado que uma forte ativação de neurônios pré-ganglionares simpáticos tem um efeito depressor na sua própria excitabilidade, tanto que os neurônios podem se tornar inativos por um período de alguns segundos (Polosa, 1967). Este fenômeno explicaria a redução na atividade simpática do nervo renal após um disparo intenso. A importância funcional desse fenômeno de depressão pós excitação não está totalmente clara. Tem sido sugerido que neurônios pré-ganglionares simpáticos podem agir como um filtro passo-baixo, de maneira que as eferências desses neurônios correspondem com seus efetores (ex: musculatura vascular lisa) que são incapazes de responder à estimulação de alta frequência (Polosa, 1967).

Os disparos sincronizados tenderam a ocorrer mais frequentemente imediatamente após um disparo regular normal da PNA, durante o período pós inspiratório tanto em ratos respirando espontaneamente como ratos

artificialmente ventilados. Esse achado sugere que os neurônios comando responsáveis por gerar os disparos sincronizados de RSNA e PNA recebem uma aferência do gerador de padrão respiratório, tanto que a possibilidade de disparo é aumentada durante o período pós inspiratório. Portanto, como mostrado na figura 24, propomos que os neurônios comando localizados no colículo recebem pelo menos 3 inputs: 1) input tônico gabaérgico inibitório, 2) input tônico excitatório que produz uma potente ativação desses neurônios quando o input inibitório é bloqueado e 3) input modulatório do gerador de padrão respiratório. As possíveis projeções inibitórias e excitatórias do colículo superior são ainda desconhecidas. Existe pouca informação sobre a modulação local das aferências do gerador de ritmo respiratório para o colículo. Um estudo anatômico mostrou uma aferência de um grupo de células respiratórias rostro-ventrais no bulbo que poderiam exercer essa função (Gaytan and Pasaro, 1998).

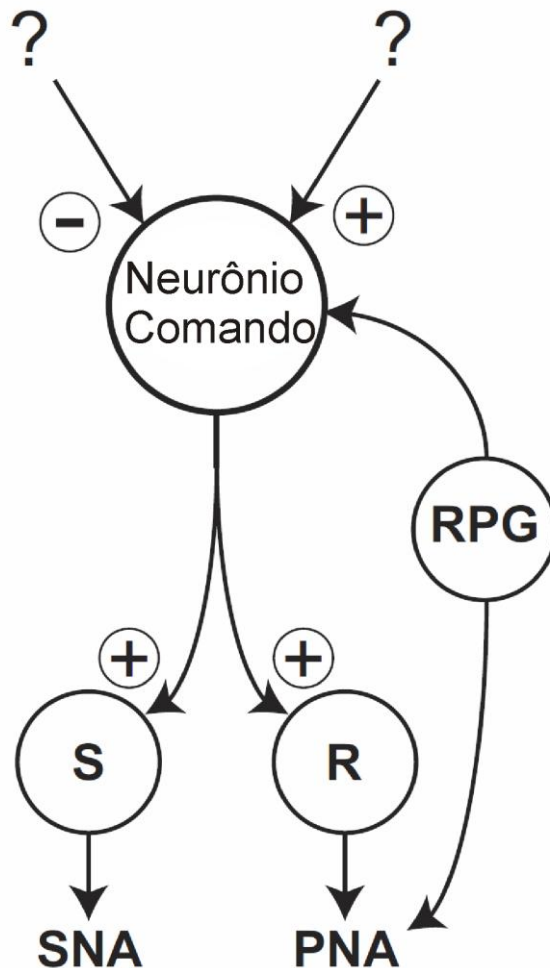


Figura 24: Diagrama esquemático mostrando as projeções propostas por gerar respostas sincronizadas de RSNA/PNA. As setas indicam as projeções propostas que podem ser diretas (monosinápticas) ou indiretas (polissinápticas). O neurônio identificado como S regula a resposta simpática enquanto o neurônio identificado como R regula a atividade do nervo frênico. É proposto que esses neurônios recebem aferências de uma população comum de neurônios identificadas como neurônios comando localizados no colículo superior e inferior. Também é proposto que esses neurônios recebem uma aferência inibitória tônica (indicada pelo símbolo -), bem como uma aferência excitatória (indicada pelo símbolo +) de neurônios que geram o ritmo respiratório normal (ex: gerador de padrões respiratórios, RPG), bem como outras aferências excitatórias de estruturas desconhecidas. A aferência do RPG poderia aumentar a probabilidade de disparos de neurônios comando durante a fase inspiratória e pós inspiratória e isto poderia gerar uma melhor frequência de disparos de RSNA/ PNA durante estas fases no ciclo respiratório normal. Por último, é proposto que os neurônios S tem um limiar de disparo mais baixo que neurônios R, visto que houveram disparos de RSNA sem disparo de PNA enquanto que o contrário não foi observado.

Padrão de resposta simpática e respiratória gerada pelo estímulo naturalístico após desinibição de receptores GABA

Já está bem descrito na literatura que um estímulo de alerta produz uma resposta cardiorespiratória caracterizada por aumentos na PA, FC, RSNA, atividade respiratória, bem como uma resposta comportamental de defesa (Li et al., 1997, Kanbar et al., 2007, Dampney et al., 2008, Kabir et al., 2010). O colículo superior tem uma função crítica na geração de respostas de orientação, de defesa ou de escape altamente coordenadas frente um estímulo visual, auditivo ou somatosensorial que requer uma ação imediata (Dean et al., 1989, Cohen and Castro-Alamancos, 2010, Gandhi and Katnani, 2011). De maneira similar, o colículo inferior que recebe sinais de vários núcleos auditivos, também tem uma função importante em mediar respostas apropriadas (chamadas padrões de ações fixas) a sinais auditivos, via projeções ao colículo superior (Casseday and Covey, 1996). No presente estudo observamos que o estímulo naturalístico (auditivo, visual e somatosensorial) após desinibição do colículo produziu uma resposta cardiorespiratória e motora altamente sincronizada em ratos anestesiados. O padrão dessa resposta foi similar a resposta observada em animais acordados mas no entanto, experimentos utilizando estímulo de alerta nunca foram feitos em animais anestesiados. Nossos achados são consistentes com estudos prévios mostrando que neurônios no colículo podem gerar respostas autonômicas, respiratórias e comportamentais apropriadas a um estímulo de alerta, tais como aparecimento de um predador sinalizado por um estímulo visual ou auditivo (Dean et al., 1989, Brandao et al., 1999).

Disparos sincronizados de SpSNA e PNA foram gerados por estímulos auditivo, visual ou somatosensorial após microinjeção de picrotoxina ou bicuculina (nos experimentos de descerebração). A microinjeção de picrotoxina em 7 sítios (de um total de 124) produziu disparos sincronizados de SpSNA e PNA espontaneamente (na ausência do estímulo auditivo). Em contraste, nos experimentos do protocolo 1, disparos sincronizados de atividade simpática e respiratória foram observados em 55 dos 129 sítios de microinjeção testados. O fato de que disparos sincronizados de SpSNA e PNA ocorreram com uma frequência maior após a microinjeção de bicuculina comparado com picrotoxina pode ser devido a diferença nas propriedades farmacológicas das duas drogas. Além de bloquear os receptores GABA, a bicuculina metiodide também bloqueia canais de potássio de pequena condutância ativados por cálcio (Kleiman-Weiner et al., 2009), que podem potenciar o disparo de neurônios dependentes de NMDA (Johnson and Seutin, 1997). Em contraste, a picrotoxina não apresenta esse efeito (Kleiman-Weiner et al., 2009). Portanto, sob condições basais, a bicuculina metiodide parece ser mais potente que a picrotoxina na ativação de neurônios coliculares que então geram disparos sincronizados de SpSNA e PNA. Consistente com nossos achados, disparos altamente sincronizados de atividade neuronal foram observados após aplicação de bicuculina metiodide em cortes cerebrais contendo o tálamo, enquanto que na presença de picrotoxina esses disparos de atividade neuronal foram menos frequentes (Kleiman-Weiner et al., 2009). De maneira similar, estudo prévios mostraram que a microinjeção de bicuculina em outras regiões tal como o núcleo paraventricular do hipotálamo ou medula espinhal produziu

disparos de atividade simpática (Kenney et al., 2001, Kenney et al., 2003, Goodchild et al., 2008).

Apesar da bicuculina metiodide e picrotoxina apresentarem algumas diferenças nas propriedades farmacológicas, uma propriedade em comum é que ambas bloqueiam receptores GABA_A (Kleiman-Weiner et al., 2009). Os resultados deste estudo mostram que em ratos anestesiados, o bloqueio de receptores GABA_A presentes no colículo superior e colículo inferior permite a geração de respostas simpática, respiratória e somatomotora sincronizadas produzidas pelo estímulo naturalístico que normalmente não são observadas em condições controle. No entanto, outros experimentos são necessários para determinar se os receptores GABA_A que suprimem essa resposta são sinápticos ou extra sinápticos, uma vez que tanto a picrotoxina quanto a bicuculina bloqueiam ambos os tipos de receptores.

Possível mecanismo responsável pela resposta simpática, respiratória e somatomotora sincronizada ao estímulo naturalístico

Duas evidências sugerem que as respostas produzidas pelo estímulo naturalístico são geradas pela ativação de uma população de neurônios comando localizados no colículo. Primeiro, em todos os 57 casos quando uma resposta foi gerada após o estímulo naturalístico, houveram aumentos simultâneos em ambas SpSNA e PNA. Segundo, os aumentos na SpSNA e PNA foram altamente sincronizados, de maneira que o início dos disparos de SpSNA induzidos pelo estímulo auditivo ou estímulo visual ocorreram com um pequeno atraso comparado com o início dos disparos da PNA (25 - 30 ms). É improvável que o atraso entre o disparo de PNA e SpSNA sejam explicados

pela diferença no número de sinapses nas vias descendentes, visto que o tempo de transmissão para sinapses no tronco encefálico é tipicamente < 1 ms (Pellet, 1990). No entanto, esse atraso seria esperado caso ambas respostas fossem geradas pela mesma população de neurônios uma vez que como mencionado anteriormente, axônios pós ganglionares simpáticos tem uma velocidade de condução menor que axônios dos neurônios motores do nervo frênico (Janig, 1988, Pickering and Jones, 2007). Ao mesmo tempo, não podemos excluir a possibilidade que as respostas simpática e respiratória podem ser geradas por populações separadas de neurônios coliculares que podem ser ativados simultaneamente por sinais auditivos, visuais ou somatosensoriais.

Em 42 sítios de microinjeção responsivos, além do registro de SpSNA e PNA, também foi feito o registro simultâneo de atividade do nervo ciático. Em 30 dos 42 sítios de microinjeção responsivos, os aumentos na SpSNA e PNA induzidos pelo estímulo naturalístico também foram acompanhados por aumentos na ScNA. O disparo de ScNA induzido pelo estímulo visual e auditivo também antecedeu o disparo de Sp SNA, o que pode ser explicado pelo fato dos nervos motores do nervo ciático possuírem uma velocidade de condução maior que as vias eferentes simpáticas (Thomas et al., 1981, Janig, 1988). A inabilidade de detectar respostas na ScNA em alguns experimentos podem ser resultado de dificuldades técnicas em detectar atividade motora no nervo ciático ou pela diferença na sensibilidade de vias motoras comparadas com a atividade do nervo frênico e atividade simpática sob condições de anestesia. Outra explicação seria o fato de alguns neurônios coliculares responsáveis por mediar respostas respiratórias e cardiovasculares não influenciarem a atividade

somatomotora ou terem um limiar de ativação maior e dessa forma respostas na Sc NA não foram detectadas durante o registro. Mesmo assim, os resultados deste estudo sustentam a hipótese de que existe uma população de neurônios comando no colículo responsáveis por gerar uma resposta autonômica, respiratória e somatomotora sincronizada à estímulos multimodais. Consistente com essa idéia, as camadas intermediárias e profundas do colículo superior contém neurônios multissensoriais que respondem à estímulos visuais, auditivo e somatosensoriais (King and Palmer, 1985, Meredith and Stein, 1986a, b, Huffman and Henson, 1990, May, 2006, Hirokawa et al., 2011). Em particular, Meredith e Stein demonstraram uma convergência de aferências visuais, auditivas e somatosensoriais em várias células individuais na camada profunda do colículo superior (Meredith and Stein, 1986b). Estudos futuros são necessários para determinar se neurônios multissensoriais no SC podem simultaneamente gerar respostas simpática, respiratória e somatomotora ou se essas respostas são geradas por populações separadas de neurônios coliculares.

Considerações metodológicas

O estímulo auditivo utilizado foi o som de uma palma feito aproximadamente à 30 cm do animal. O rato foi posicionado nas barras de ouvido de maneira que a membrana do tímpano não foi perfurada. A presença das barras de orelha poderiam ter reduzido a amplitude do sinal auditivo, mas como descrito nos métodos, a medida da intensidade e espectro do som da palma, indicam que a amplitude do som excedeu o limiar auditivo, mesmo este tendo sido atenuado pelas barras de ouvido. Além disso, o fato de que as

respostas foram produzidas pelo estímulo auditivo, demonstram que o sinal auditivo não foi eliminado pelas barras no ouvido. Não foi feita uma avaliação sistêmica da relação entre a magnitude do estímulo auditivo e a magnitude das respostas produzidas, apesar de em alguns experimentos termos utilizados palmas mais brandas e mais fortes. Nestes casos, não foram observados efeitos distintos na intensidade do estímulo auditivo e magnitude da resposta produzida, sugerindo que as respostas eram um fenômeno tudo ou nada. De maneira similar, o estímulo visual e somatosensorial também produziram uma resposta clara ou nenhuma resposta.

O nervo ciático contém fibras somatomotoras e fibras simpáticas pós ganglionares (43), mas dois fatores indicam que as respostas observadas na atividade deste nervo não representam um aumento na atividade simpática. Primeiro, o início da resposta na ScNA ao estímulo auditivo e visual, antecedeu o início das alterações na SpSNA por $4,7 \pm 2,7$ e $48,3 \pm 4,4$ ms, respectivamente (Figura 19), consistente com uma resposta mediada por fibras de condução rápida mielinizadas do que fibras simpáticas pós ganglionares não mielinizadas de condução lenta. Além disso, diferente da SpSNA, não foi detectado atividade basal na ScNA, o que seria esperado se a atividade simpática estivesse sendo registrada. Apesar de não podermos excluir a possibilidade de que aumentos na atividade simpática podem contribuir para a resposta na ScNA, nós acreditamos que esta resposta reflete predominantemente aumentos na atividade somatomotora do nervo.

Vias neurais do colículo não são lateralizadas

Em humanos, o hemisfério direito é descrito como dominante para geração de respostas fisiológicas ao estresse (Henry, 1997, Wittling, 1997), tendo uma função preferencial durante o processo emocional (Gainotti, 1983, Robinson et al., 1984). Xavier e colaboradores (2009) mostraram que as vias cardiovasculares descendentes do DMH, região importante para respostas cardiovasculares ao estresse, são predominantemente lateralizadas e que o DMH direito exerce um controle maior nas alterações de frequência cardíaca durante estresse emocional (Xavier et al., 2009). De maneira similar, injeções de bicuculina na porção dorsal da PAG produziu aumentos na acuidade visual e reatividade tátil contralateralmente ao sítio de microinjeção, indicando a ocorrência de assimetria sensorial nesta região durante a resposta de fuga (Blanchard et al., 1986). No presente estudo não observamos diferenças na magnitude e padrão de resposta produzido pelo estímulo naturalístico após desinibição dos lados direito e esquerdo do colículo. Em concordância com nossos resultados, Brandao e colaboradores (1988) também não observaram lateralização nas respostas sensoriais que acompanham as alterações comportamentais produzidas pela microinjeção de bicuculina no colículo inferior (Brandao et al., 1988). Portanto, a lateralidade nas respostas sensoriais e cardiovasculares que acompanham o comportamento de fuga é uma característica observada no DMH e PAG, mas não no colículo superior e inferior.

É interessante notar que o estímulo auditivo e visual foram aplicados bilateralmente, enquanto o estímulo somatosensorial foi realizado na pata traseira somente de um lado. Respostas para o estímulo somatosensorial foram

obtidas após a microinjeção de picrotoxina em regiões ipsilaterais e contralaterais do colículo, indicando que a desinibição unilateral de neurônios coliculares foi capaz de desmascarar respostas aos sinais somatosensoriais tanto do lado ipsilateral quanto contralateral. Consistente com esse achado, estudos mostraram que os sinais somatosensoriais projetam-se bilateralmente para o SC (Wiberg et al., 1987), e que também existem interconexões extensas entre o lado direito e esquerdo do colículo (Jen and Au, 1986, Jiang et al., 1997).

Vias centrais envolvidas na resposta sincronizada mediada pelo colículo

Projeções aferentes para colículo superior e inferior

As camadas profundas do SC recebem aferências de regiões corticais e subcorticais envolvidas nas funções motoras, sensoriais e cardiovasculares. Foram descritas projeções de importantes estruturas envolvidas na resposta cardiovascular ao estresse emocional como o córtex pré-frontal medial (mPFC), hipotálamo, núcleo cuneiforme e substância cinzenta periaquedutal para o colículo superior (Edwards, 1975, Grofova et al., 1978, Edwards et al., 1979, Fries, 1985). As maiores fontes de projeções somatosensoriais para o SC descritas são o núcleo espinhal trigeminal, corno dorsal da medula espinhal e córtex somatosensorial (Edwards et al., 1979, Huerta et al., 1981). Ainda foram mostradas aferências de regiões envolvidas no controle motor como a substância negra pars reticulada e córtex motor (Fries, 1985, Castellán-Baldan et al., 2006). O colículo inferior é uma região crítica no sistema auditivo e essencial para audição normal. Ele recebe projeções diretas do córtex auditivo bem como de núcleos pontinos auditivos e tálamo (Beyerl, 1978, Winer et al.,

1998). Estudos anatômicos ainda mostraram projeções do núcleo basal da amígdala, substância negra, núcleo prabraquial, núcleo geniculado medial e hipotálamo (Adams, 1980, Winer et al., 1996, Marsh et al., 2002). No presente estudo reavaliamos as projeções aferentes para o SC à nível cortical e hipotalâmico. Nossos resultados confirmam estudos prévios mostrando marcação neuronal em regiões corticais como o mPFC, córtex motor, somatosensorial e auditivo. Além disso foi observada densa marcação neuronal na região hipotalâmica, mais especificamente no hipotálamo ventromedial, hipotálamo lateral e DMH.

Resposta sincronizada ao estímulo naturalístico independe de estruturas prosencefálicas

Após remoção de todo prosencéfalo, incluindo o córtex pré-frontal, amígdala, córtex auditivo e hipotálamo, o estímulo auditivo ainda foi capaz de gerar disparos de SpSNA e PNA altamente sincronizados após, mas não antes da microinjeção de bicuculina na região responsiva do colículo. Esse resultado mostra que o circuito essencial facilitando as respostas simpática, respiratória e motora está localizado no tronco encefálico ou medula espinhal uma vez que a resposta sincronizada ao estímulo auditivo manteve-se presente após remoção de todo prosencéfalo. Evidências demonstram que o colículo é rico em células neuronais positivas para GABA mas pouco se sabe sobre as projeções modulatórias exercidas por estas células (Peruzzi and Dut, 2004). Seria possível especular que o córtex pré-frontal medial, região envolvida na resposta cardiovascular ao estresse agudo (Muller-Ribeiro et al., 2012) seria uma provável fonte de projeções excitatórias glutamatérgicas, enquanto o

hipotálamo seria uma possível região com projeções inibitórias para o colículo superior e inferior. No entanto, os experimentos de descerebração descartam a participação dessas estruturas na resposta simpática, respiratória e somatomotora sincronizada envolvendo a modulação gabaérgica no colículo superior e inferior. Nossos achados ainda corroboram e estendem achados prévios mostrando que as respostas iniciadas por um estímulo somatosensorial ou estímulo auditivo de ameaça, são dependentes de relés sinápticos localizados no SC e IC, mas não no tálamo, hipotálamo ou córtex. Esses neurônios provavelmente devem ser interneurônios locais (Mize, 1992) ou neurônios que projetam-se para o colículo superior e inferior a partir de outros núcleos tal como a substância negra. No presente estudo não analisamos a marcação neuronal ao nível da substância negra, mas estudos anatômicos mostraram uma projeção gabaérgica direta da substância negra pars reticulata (SNpr) para o colículo superior e inferior (Redgrave et al., 1992, Castellán-Baldan et al., 2006) e esta via poderia assim inibir tonicamente neurônios comando capazes de gerar respostas de defesa e autonômicas coordenadas ao estímulo naturalístico. Estudos funcionais mostraram que respostas de defesa produzidas por estimulação elétrica ou química do colículo superior ou inferior em ratos acordados são exacerbadas após o bloqueio de neurônios na SNpr, enquanto que a ativação de neurônios na SNpr exercem um efeito contrário, ou seja, reduzem a resposta de defesa (Coimbra and Brandao, 1993, Nobre et al., 2004, Castellán-Baldan et al., 2006).

Vias centrais envolvidas na resposta sincronizada mediada pelo colículo

Projeções eferentes do colículo superior e inferior

Os estudos anatômicos sobre as projeções do colículo superior foram feitos com relação ao controle das funções motoras relacionadas com respostas de orientação e fuga (Janig, 1988, May, 2006). Foram descritas projeções para os núcleos reticulares pontino e bulbar, mas estas projeções são mediais e parecem não incluir os núcleos conhecidos pelo controle na função simpática e respiratória, tais como o bulbo rostral ventro-lateral ou grupo respiratório dorsal e ventral (Redgrave et al., 1987). De maneira similar, estudos analisando as vias eferentes do IC, focaram no processamento auditivo e existe pouca informação a respeito das possíveis vias do IC envolvidas na regulação das funções simpática e respiratória. Foi demonstrado uma densa projeção do colículo inferior para o colículo superior, que poderia conectar-se com neurônios no colículo superior responsáveis por regular a atividade simpática e respiratória (Garcia Del Cano et al., 2006).

Estudos prévios analisando as projeções do colículo superior mostraram uma projeção direta para PAG, mais especificamente para a porção dorsolateral (Redgrave et al., 1987, Furigo et al., 2010) que regula atividade simpática e respiratória (Subramanian et al., 2008, ligaya et al., 2010) e para o hipotálamo lateral (Fallon and Moore, 1979). Nossos resultados de marcação anterógrada estão de acordo com estudos prévios que mostraram que as fibras eferentes do SC seguem uma via ipsilateral na PAG e RVMM (Redgrave et al., 1986, Furigo et al., 2010). Estudos anatômicos e funcionais sugerem que o colículo e dIPAG tem uma relação muito próxima e seria provável que a resposta sincronizada ao estímulo naturalístico fosse mediada pela PAG ou

hipotálamo dorsomedial (Dean et al., 1989, Gandhi and Katnani, 2011), visto que foi demonstrado que as respostas cardiovasculares e respiratórias produzidas pela dIPAG são dependentes de atividade neuronal do hipotálamo dorsomedial (de Menezes et al., 2009, Horiuchi et al., 2009), conhecido por ter uma função importante na resposta cardiovascular ao estresse (DiMicco et al., 2002, Fontes et al., 2011). No entanto, observamos neste estudo que essas projeções não estão envolvidas no controle da resposta simpática, respiratória e somatosensorial sincronizada ao estímulo naturalístico, visto que a resposta manteve-se presente após a inibição bilateral do DMH e PAG.

Outra possível região envolvida nesta resposta sincronizada seria o núcleo cuneiforme, visto que a ativação desta região produz aumento na atividade simpática, bem como resposta de "freezing" (Mitchell et al., 1988, Verberne, 1995). Estudos anatômicos mostraram uma projeção direta do colículo superior para o núcleo cuneiforme (Keay et al., 1988, Furigo et al., 2010) e deste para o colículo inferior (Boyle et al., 1980). No entanto, essa hipótese também foi descartada uma vez que a inibição bilateral do CnF não alterou a resposta autônoma, respiratória e somatomotora coordenada ao estímulo naturalístico após desinibição do colículo.

Visto que o estímulo naturalístico alterou o ritmo respiratório, encurtando o tempo expiratório, uma provável região envolvida na resposta respiratória ao estímulo naturalístico seria o núcleo parabraquial lateral (LPB). O LPB é uma região crítica no controle da duração das fases respiratórias (Chamberlin and Saper, 1992, 1994) e além do mais, um estudo anatômico mostrou uma projeção do LPB para o colículo inferior (Adams, 1980). Entretanto, a

microinjeção bilateral de muscimol no LPB não teve efeito sobre a resposta respiratória produzida pelo estímulo naturalístico.

Um achado interessante do presente estudo foi a marcação ipsilateral de terminais axonais na RVMM, que inclui parte da LPGi e GiV (figura 23). Esta região foi inicialmente identificada por Strack e colaboradores (1989) como uma das regiões no cérebro que contém neurônios que regulam o fluxo eferente simpático (Strack et al., 1989). Recentemente Furlong e colaboradores observaram a expressão de c-Fos, um marcador de atividade neuronal, na RVMM após o estresse por jato de ar, indicando uma importante função desta região na regulação de respostas cardiovasculares induzidas por estresse (Furlong et al., 2014). Adicionalmente, Carrive & Gorissen (2008) demonstraram que o medo condicionado resulta em expressão de neurônios positivos para Fos na RVMM (Florenzano et al., 2008). A RVMM é uma região que contém 30 - 50% de neurônios pré-motores que projetam-se para o gânglio estrelado, bem como neurônios pré motores simpáticos renais (Schramm et al., 1993, Jansen et al., 1995a). Portanto, é possível especular que neurônios pré-motores simpáticos localizados na RVMM possam mediar as respostas simpatoexcitatórias induzidas pelo estímulo naturalístico após desinibição colicular.

Baseado nos resultados desse estudo propomos que após a remoção do tônus gabaérgico de neurônios coliculares, um estímulo natural de alerta é capaz de gerar uma resposta simpática, respiratória e somatomotora sincronizada. Essa resposta independe de regiões localizadas no telencéfalo e diencéfalo. No entanto, as vias eferentes envolvidas na resposta sincronizada produzida pelo estímulo naturalístico continuam desconhecidas e futuros

estudos funcionais para identificar as vias do colículo superior e inferior responsáveis pela resposta cardiorespiratória e somatomotora sincronizadas produzidas pelo estímulo naturalístico serão necessários (figura 25).

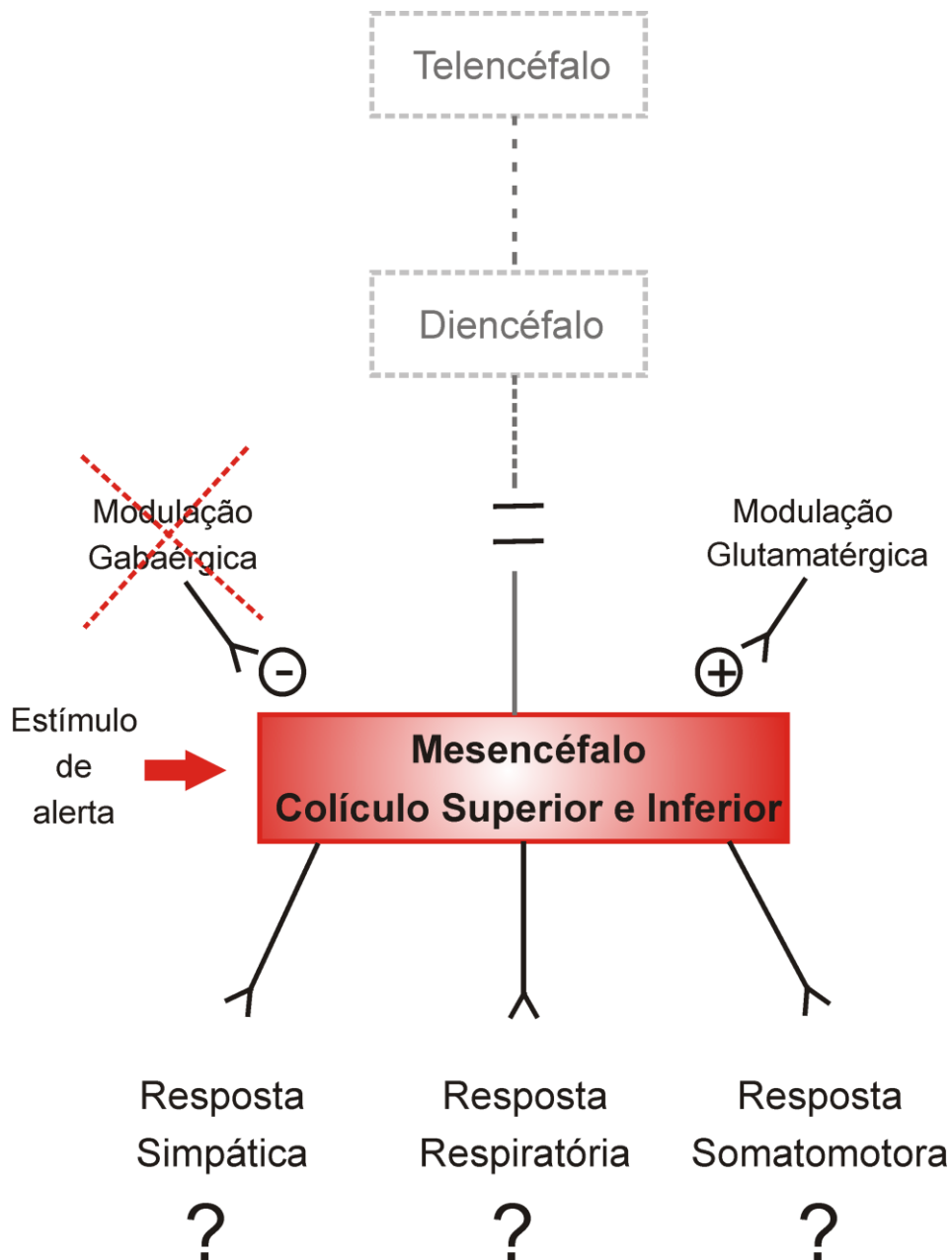


Figura 25: Diagrama esquemático mostrando as conexões de estruturas localizadas no telencéfalo e diencéfalo com o colículo superior e inferior. As setas indicam as projeções propostas que podem ser diretas (monosinápticas) ou indiretas (polissinápticas). É proposto que os neurônios comando presentes no colículo superior e inferior recebem uma aferência inibitória tônica (indicada pelo símbolo -), bem como uma aferência excitatória (indicada pelo símbolo +). Uma vez bloqueado o tônus inibitório gabaérgico, os neurônios comando geram uma resposta simpática, respiratória e somatomotora coordenada via projeções para o estruturas ainda desconhecidas.

6. CONCLUSÃO

Estudos prévios mostram que o colículo é uma estrutura chave envolvida nas respostas cardiovasculares, respiratória e comportamentais ao estímulo ameaçador. Os resultados do presente estudo sugerem que existe uma população de neurônios comando nesta região capaz de gerar simultaneamente respostas cardiovasculares, respiratória e somatomotora como parte de uma reação de defesa altamente coordenada e generalizada. Esta visão é compatível com a proposta de Redgrave e colegas (Redgrave et al., 1987, Keay et al., 1988, Dean et al., 1989, Keay et al., 1990) e de Casseday e Covey de que neurônios no colículo superior e inferior podem gerar tanto respostas de orientação imediatas como respostas de defesa que são essenciais para uma situação emergência (Casseday and Covey, 1996). O fato da resposta simpática e respiratória ser potentemente gerada pelo estímulo naturalístico após desinibição do colículo na preparação de descerebração reforça a idéia de que essa região exerce uma importante função como um relé primário na geração de respostas somatomotora, autonômica e respiratória a um estímulo de alerta (Casseday and Covey, 1996).

LeDoux (1994) sugeriu que uma via subcortical, incluindo um input direto do tálamo para a amígdala lateral, mediando uma rápida resposta subconsciente ao estímulo de ameaça (LeDoux, 1994). No presente estudo, a resposta sincronizada ao estímulo auditivo ainda manteve-se presente após remoção da amígdala. Dessa forma, é possível sugerir que o colículo possa mediar uma resposta ainda mais rápida e primitiva. O colículo superior e inferior são homólogos do teto óptico e torus semicircularis, respectivamente, ambos desenvolvidos primariamente em vertebrados (Stein and Gaither, 1981,

Belekhova et al., 2002). Muitos neurônios no teto óptico de répteis e peixes são multisensórios (Meredith and Stein, 1986a, b, Stein, 1998, May, 2006). Portanto, seria aceitável especular que as respostas sincronizadas geradas pelo colículo são parte de um sistema de defesa filogeneticamente antigo, capazes de gerar respostas cardiovasculares, respiratória e somatomotora como parte de uma reação imediata e coordenada ao estímulo de ameaça.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Abdeen OA, Taylor BK, Youngblood KL, Printz MP (Peripheral beta adrenergic blockade modifies airpuff startle-induced heart rate responses. *J Pharmacol Exp Ther* 272:282-289.1995).
- Abrahams VC, Hilton SM, Zbrozyna A (Active muscle vasodilatation produced by stimulation of the brain stem: its significance in the defence reaction. *J Physiol* 154:491-513.1960).
- Adams JC (Crossed and descending projections to the inferior colliculus. *Neurosci Lett* 19:1-5.1980).
- Adrian ED, Bronk DW, Phillips G (Discharges in mammalian sympathetic nerves. *J Physiol* 74:115-133.1932).
- An X, Bandler R, Ongur D, Price JL (Prefrontal cortical projections to longitudinal columns in the midbrain periaqueductal gray in macaque monkeys. *J Comp Neurol* 401:455-479.1998).
- Aparicio MA, Vinuela A, Saldana E (Projections from the inferior colliculus to the tectal longitudinal column in the rat. *Neuroscience* 166:653-664.2010).
- Baudrie V, Tulen JH, Blanc J, Elghozi JL (Autonomic components of the cardiovascular responses to an acoustic startle stimulus in rats. *J Auton Pharmacol* 17:303-309.1997).
- Belekhova MG, Kenigfest-Rio NB, Vesselkin NP, Rio JP, Reperant J, Ward R (Evolutionary significance of different neurochemical organisation of the internal and external regions of auditory centres in the reptilian brain: an immunocytochemical and reduced NADPH-diaphorase histochemical study in turtles. *Brain Res* 925:100-106.2002).
- Beyerl BD (Afferent projections to the central nucleus of the inferior colliculus in the rat. *Brain Res* 145:209-223.1978).
- Bittencourt AS, Nakamura-Palacios EM, Mauad H, Tufik S, Schenberg LC (Organization of electrically and chemically evoked defensive behaviors within the deeper collicular layers as compared to the

- periaqueductal gray matter of the rat. *Neuroscience* 133:873-892.2005).
- Blanchard DC, Blanchard RJ, Lee MC, Williams G (Taming in the wild Norway rat following lesions in the basal ganglia. *Physiol Behav* 27:995-1000.1981).
- Blanchard RJ, Flannelly KJ, Blanchard DC (Defensive behavior of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. *J Comp Psychol* 100:101-107.1986).
- Boehnke SE, Munoz DP (On the importance of the transient visual response in the superior colliculus. *Curr Opin Neurobiol* 18:544-551.2008).
- Boyle R, Thomas M, Adams JH (Diffuse involvement of the leptomeninges by tumour--a clinical and pathological study of 63 cases. *Postgrad Med J* 56:149-158.1980).
- Brandao ML, Anseloni VZ, Pandossio JE, De Araujo JE, Castilho VM (Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neurosci Biobehav Rev* 23:863-875.1999).
- Brandao ML, Borelli KG, Nobre MJ, Santos JM, Albrechet-Souza L, Oliveira AR, Martinez RC (Gabaergic regulation of the neural organization of fear in the midbrain tectum. *Neurosci Biobehav Rev* 29:1299-1311.2005).
- Brandao ML, Cardoso SH, Melo LL, Motta V, Coimbra NC (Neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. *Neurosci Biobehav Rev* 18:339-346.1994).
- Brandao ML, Coimbra NC, Osaki MY (Changes in the auditory-evoked potentials induced by fear-evoking stimulations. *Physiol Behav* 72:365-372.2001).
- Brandao ML, Melo LL, Cardoso SH (Mechanisms of defense in the inferior colliculus. *Behav Brain Res* 58:49-55.1993).
- Brandao ML, Tomaz C, Borges PC, Coimbra NC, Bagri A (Defense reaction induced by microinjections of bicuculline into the inferior colliculus. *Physiol Behav* 44:361-365.1988).
- Brandao ML, Troncoso AC, de Souza Silva MA, Huston JP (The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain

- tectum to anxiety and stress: empirical and conceptual considerations. *Eur J Pharmacol* 463:225-233.2003).
- Breese GR, Frye GD, McCown TJ, Mueller RA (Comparison of the CNS effects induced by TRH and bicuculline after microinjection into medial septum, substantia nigra and inferior colliculus: absence of support for a GABA antagonist action for TRH. *Pharmacol Biochem Behav* 21:145-149.1984).
- Caicedo A, Herbert H (Topography of descending projections from the inferior colliculus to auditory brainstem nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 328:377-392.1993).
- Calvo F, Coimbra NC (Interactions between opioid-peptides-containing pathways and GABA(A)-receptors-mediated systems modulate panic-like-induced behaviors elicited by electric and chemical stimulation of the inferior colliculus. *Brain Res* 1104:92-102.2006).
- Cardoso SH, Coimbra NC, Brandao ML (Defensive reactions evoked by activation of NMDA receptors in distinct sites of the inferior colliculus. *Behav Brain Res* 63:17-24.1994).
- Casseday HJ, Diamond IT, Harting JK (Auditory pathways to the cortex in *Tupaia glis*. *J Comp Neurol* 166:303-340.1976).
- Casseday JH, Covey E (A neuroethological theory of the operation of the inferior colliculus. *Brain Behav Evol* 47:311-336.1996).
- Castellan-Baldan L, da Costa Kawasaki M, Ribeiro SJ, Calvo F, Correa VM, Coimbra NC (Topographic and functional neuroanatomical study of GABAergic disinhibitory striatum-nigral inputs and inhibitory nigrocollicular pathways: neural hodology recruiting the substantia nigra, pars reticulata, for the modulation of the neural activity in the inferior colliculus involved with panic-like emotions. *J Chem Neuroanat* 32:1-27.2006).
- Castilho VM, Brandao ML (Conditioned antinociception and freezing using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray or inferior colliculus as unconditioned stimulus are differentially regulated by 5-HT_{2A} receptors in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 155:154-162.2001).

- Chamberlin NL, Saper CB (Topographic organization of cardiovascular responses to electrical and glutamate microstimulation of the parabrachial nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 326:245-262.1992).
- Chamberlin NL, Saper CB (Topographic organization of respiratory responses to glutamate microstimulation of the parabrachial nucleus in the rat. *J Neurosci* 14:6500-6510.1994).
- Cohen JD, Castro-Alamancos MA (Neural correlates of active avoidance behavior in superior colliculus. *J Neurosci* 30:8502-8511.2010).
- Coimbra NC, Brandao ML (GABAergic nigro-collicular pathways modulate the defensive behaviour elicited by midbrain tectum stimulation. *Behav Brain Res* 59:131-139.1993).
- Dampney RA, Horiuchi J, McDowall LM (Hypothalamic mechanisms coordinating cardiorespiratory function during exercise and defensive behaviour. *Auton Neurosci* 142:3-10.2008).
- de Menezes RC, Zaretsky DV, Fontes MA, DiMicco JA (Cardiovascular and thermal responses evoked from the periaqueductal grey require neuronal activity in the hypothalamus. *J Physiol* 587:1201-1215.2009).
- Dean P, Redgrave P, Westby GW (Event or emergency? Two response systems in the mammalian superior colliculus. *Trends Neurosci* 12:137-147.1989).
- DiMicco JA, Samuels BC, Zaretskaia MV, Zaretsky DV (The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. *Pharmacol Biochem Behav* 71:469-480.2002).
- Edgar PP, Schwartz RD (Localization and characterization of 35S-t-butylbicyclophosphorothionate binding in rat brain: an autoradiographic study. *J Neurosci* 10:603-612.1990).
- Edwards SB (Autoradiographic studies of the projections of the midbrain reticular formation: descending projections of nucleus cuneiformis. *J Comp Neurol* 161:341-358.1975).

- Edwards SB, Ginsburgh CL, Henkel CK, Stein BE (Sources of subcortical projections to the superior colliculus in the cat. *J Comp Neurol* 184:309-329.1979).
- Eliasson S, Folkow B, Lindgren P, Uvnas B (Activation of sympathetic vasodilator nerves to the skeletal muscles in the cat by hypothalamic stimulation. *Acta Physiol Scand* 23:333-351.1951).
- Fallon JH, Moore RY (Superior colliculus efferents to the hypothalamus. *Neurosci Lett* 14:265-270.1979).
- Feigl E, Johansson B, Loeffving B (Renal Vasoconstriction and the 'Defense Reaction'. *Acta Physiol Scand* 62:429-435.1964).
- Felsen G, Mainen ZF (Neural substrates of sensory-guided locomotor decisions in the rat superior colliculus. *Neuron* 60:137-148.2008).
- Ferreira-Netto C, Borelli KG, Brandao ML (Distinct Fos expression in the brain following freezing behavior elicited by stimulation with NMDA of the ventral or dorsal inferior colliculus. *Exp Neurol* 204:693-704.2007).
- Florenzano F, Carrive P, Viscomi MT, Ferrari F, Latini L, Conversi D, Cabib S, Bagni C, Molinari M (Cortical and subcortical distribution of ionotropic purinergic receptor subunit type 1 (P2X(1)R) immunoreactive neurons in the rat forebrain. *Neuroscience* 151:791-801.2008).
- Floyd NS, Price JL, Ferry AT, Keay KA, Bandler R (Orbitomedial prefrontal cortical projections to hypothalamus in the rat. *J Comp Neurol* 432:307-328.2001).
- Fontes MA, Xavier CH, de Menezes RC, Dimicco JA (The dorsomedial hypothalamus and the central pathways involved in the cardiovascular response to emotional stress. *Neuroscience* 184:64-74.2011).
- Fries W (Inputs from motor and premotor cortex to the superior colliculus of the macaque monkey. *Behav Brain Res* 18:95-105.1985).
- Frye GD, McCown TJ, Breese GR (Characterization of susceptibility to audiogenic seizures in ethanol-dependent rats after microinjection of gamma-aminobutyric acid (GABA) agonists into

- the inferior colliculus, substantia nigra or medial septum. *J Pharmacol Exp Ther* 227:663-670.1983).
- Fubara BM, Casseday JH, Covey E, Schwartz-Bloom RD (Distribution of GABAA, GABAB, and glycine receptors in the central auditory system of the big brown bat, *Eptesicus fuscus*. *J Comp Neurol* 369:83-92.1996).
- Furigo IC, de Oliveira WF, de Oliveira AR, Comoli E, Baldo MV, Mota-Ortiz SR, Canteras NS (The role of the superior colliculus in predatory hunting. *Neuroscience* 165:1-15.2010).
- Furlong TM, McDowall LM, Horiuchi J, Polson JW, Dampney RA (The effect of air puff stress on c-Fos expression in rat hypothalamus and brainstem: central circuitry mediating sympathoexcitation and baroreflex resetting. *Eur J Neurosci* 39:1429-1438.2014).
- Gainotti G ([Emotions and hemispheric lateralization. Review of the literature]. *Encephale* 9:345-364.1983).
- Gandhi NJ, Katnani HA (Motor functions of the superior colliculus. *Annu Rev Neurosci* 34:205-231.2011).
- Garcia Del Cano G, Gerrikagoitia I, Alonso-Cabria A, Martinez-Millan L (Organization and origin of the connection from the inferior to the superior colliculi in the rat. *J Comp Neurol* 499:716-731.2006).
- Gaytan SP, Pasaro R (Connections of the rostral ventral respiratory neuronal cell group: an anterograde and retrograde tracing study in the rat. *Brain Res Bull* 47:625-642.1998).
- Goodale MA, Milner AD, Rose JE (Susceptibility to startle during ongoing behaviour following collicular lesions in the rat. *Neurosci Lett* 1:333-337.1975).
- Goodchild AK, van Deurzen BT, Hildreth CM, Pilowsky PM (Control of sympathetic, respiratory and somatomotor outflow by an intraspinal pattern generator. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35:447-453.2008).
- Grillon C (Models and mechanisms of anxiety: evidence from startle studies. *Psychopharmacology (Berl)* 199:421-437.2008).
- Grillon C, Morgan CA, 3rd, Davis M, Southwick SM (Effects of experimental context and explicit threat cues on acoustic startle

- in Vietnam veterans with posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 44:1027-1036.1998).
- Grobstein P (Between the retinotectal projection and directed movement: topography of a sensorimotor interface. *Brain Behav Evol* 31:34-48.1988).
- Grofova I, Ottersen OP, Rinvik E (Mesencephalic and diencephalic afferents to the superior colliculus and periaqueductal gray substance demonstrated by retrograde axonal transport of horseradish peroxidase in the cat. *Brain Res* 146:205-220.1978).
- Habler HJ, Janig W, Michaelis M (Respiratory modulation in the activity of sympathetic neurones. *Prog Neurobiol* 43:567-606.1994).
- Hagbarth KE, Hallin RG, Hongell A, Torebjork HE, Wallin BG (General characteristics of sympathetic activity in human skin nerves. *Acta Physiol Scand* 84:164-176.1972).
- Heffner HE, Heffner RS, Contos C, Ott T (Audiogram of the hooded Norway rat. *Hear Res* 73:244-247.1994).
- Henry JP (Psychological and physiological responses to stress: the right hemisphere and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis, an inquiry into problems of human bonding. *Acta Physiol Scand Suppl* 640:10-25.1997).
- Heyer EJ, Nowak LM, Macdonald RL (Bicuculline: a convulsant with synaptic and nonsynaptic actions. *Neurology* 31:1381-1390.1981).
- Hilton SM (The defence-arousal system and its relevance for circulatory and respiratory control. *J Exp Biol* 100:159-174.1982).
- Hirokawa J, Sadakane O, Sakata S, Bosch M, Sakurai Y, Yamamori T (Multisensory information facilitates reaction speed by enlarging activity difference between superior colliculus hemispheres in rats. *PLoS One* 6:e25283.2011).
- Horiuchi J, McDowall LM, Dampney RA (Vasomotor and respiratory responses evoked from the dorsolateral periaqueductal grey are mediated by the dorsomedial hypothalamus. *J Physiol* 587:5149-5162.2009).

- Huerta MF, Frankfurter AJ, Harting JK (The trigeminocollicular projection in the cat: patch-like endings within the intermediate gray. *Brain Res* 211:1-13.1981).
- Huffman RF, Henson OW, Jr. (The descending auditory pathway and acousticomotor systems: connections with the inferior colliculus. *Brain Res Brain Res Rev* 15:295-323.1990).
- Iigaya K, Horiuchi J, McDowall LM, Dampney RA (Topographical specificity of regulation of respiratory and renal sympathetic activity by the midbrain dorsolateral periaqueductal gray. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299:R853-861.2010).
- Iigaya K, Muller-Ribeiro FC, Horiuchi J, McDowall LM, Nalivaiko E, Fontes MA, Dampney RA (Synchronized activation of sympathetic vasomotor, cardiac, and respiratory outputs by neurons in the midbrain colliculi. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 303:R599-610.2012).
- Janig W (Pre- and postganglionic vasoconstrictor neurons: differentiation, types, and discharge properties. *Annu Rev Physiol* 50:525-539.1988).
- Jansen A, Vermeulen A, van Toorenenbergen AW, Dieges PH (Occupational asthma in horticulture caused by *Lathyrus odoratus*. *Allergy Proc* 16:135-139.1995a).
- Jansen AS, Nguyen XV, Karpitskiy V, Mettenleiter TC, Loewy AD (Central command neurons of the sympathetic nervous system: basis of the fight-or-flight response. *Science* 270:644-646.1995b).
- Jen LS, Au C (Intercollicular fibers terminating in the superficial layers of the superior colliculus: a WGA-HRP study in the rat. *Brain Res* 379:385-389.1986).
- Jiang ZD, Moore DR, King AJ (Sources of subcortical projections to the superior colliculus in the ferret. *Brain Res* 755:279-292.1997).
- Johnson SW, Seutin V (Bicuculline methiodide potentiates NMDA-dependent burst firing in rat dopamine neurons by blocking apamin-sensitive Ca^{2+} -activated K^{+} currents. *Neurosci Lett* 231:13-16.1997).

- Julius S (Corcoran Lecture. Sympathetic hyperactivity and coronary risk in hypertension. *Hypertension* 21:886-893.1993).
- Kabir MM, Beig MI, Baumert M, Trombini M, Mastorci F, Sgoifo A, Walker FR, Day TA, Nalivaiko E (Respiratory pattern in awake rats: effects of motor activity and of alerting stimuli. *Physiol Behav* 101:22-31.2010).
- Kanbar R, Orea V, Barres C, Julien C (Baroreflex control of renal sympathetic nerve activity during air-jet stress in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292:R362-367.2007).
- Keay KA, Dean P, Redgrave P (N-methyl D-aspartate (NMDA) evoked changes in blood pressure and heart rate from the rat superior colliculus. *Exp Brain Res* 80:148-156.1990).
- Keay KA, Redgrave P, Dean P (Cardiovascular and respiratory changes elicited by stimulation of rat superior colliculus. *Brain Res Bull* 20:13-26.1988).
- Kenney MJ, Weiss ML, Mendes T, Wang Y, Fels RJ (Role of paraventricular nucleus in regulation of sympathetic nerve frequency components. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284:H1710-1720.2003).
- Kenney MJ, Weiss ML, Patel KP, Wang Y, Fels RJ (Paraventricular nucleus bicuculline alters frequency components of sympathetic nerve discharge bursts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281:H1233-1241.2001).
- King AJ (The superior colliculus. *Curr Biol* 14:R335-338.2004).
- King AJ, Palmer AR (Integration of visual and auditory information in bimodal neurones in the guinea-pig superior colliculus. *Exp Brain Res* 60:492-500.1985).
- Kleiman-Weiner M, Beenhakker MP, Segal WA, Huguenard JR (Synergistic roles of GABAA receptors and SK channels in regulating thalamocortical oscillations. *J Neurophysiol* 102:203-213.2009).
- Klein BD, Fu YH, Ptacek LJ, White HS (c-Fos immunohistochemical mapping of the audiogenic seizure network and tonotopic

- neuronal hyperexcitability in the inferior colliculus of the Frings mouse. *Epilepsy Res* 62:13-25.2004).
- Lamprea MR, Cardenas FP, Vianna DM, Castilho VM, Cruz-Morales SE, Brandao ML (The distribution of fos immunoreactivity in rat brain following freezing and escape responses elicited by electrical stimulation of the inferior colliculus. *Brain Res* 950:186-194.2002).
- LeDoux JE (Emotion, memory and the brain. *Sci Am* 270:50-57.1994).
- Leitner DS, Cohen ME (Role of the inferior colliculus in the inhibition of acoustic startle in the rat. *Physiol Behav* 34:65-70.1985).
- Li L, Korngut LM, Frost BJ, Beninger RJ (Prepulse inhibition following lesions of the inferior colliculus: prepulse intensity functions. *Physiol Behav* 65:133-139.1998).
- Li SG, Lawler JE, Randall DC, Brown DR (Sympathetic nervous activity and arterial pressure responses during rest and acute behavioral stress in SHR versus WKY rats. *J Auton Nerv Syst* 62:147-154.1997).
- Liebsch G, Montkowski A, Holsboer F, Landgraf R (Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour. *Behav Brain Res* 94:301-310.1998).
- Lois JH, Rice CD, Yates BJ (Neural circuits controlling diaphragm function in the cat revealed by transneuronal tracing. *J Appl Physiol* 106:138-152.2009).
- Malpas SC (The rhythmicity of sympathetic nerve activity. *Prog Neurobiol* 56:65-96.1998).
- Marsh RA, Fuzessery ZM, Grose CD, Wenstrup JJ (Projection to the inferior colliculus from the basal nucleus of the amygdala. *J Neurosci* 22:10449-10460.2002).
- May PJ (The mammalian superior colliculus: laminar structure and connections. *Prog Brain Res* 151:321-378.2006).
- McDowall LM, Horiuchi J, Dampney RA (Effects of disinhibition of neurons in the dorsomedial hypothalamus on central respiratory drive. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293:R1728-1735.2007).

- Meinck HM (Startle and its disorders. *Neurophysiol Clin* 36:357-364.2006).
- Meloni EG, Davis M (GABA in the deep layers of the superior Colliculus/Mesencephalic reticular formation mediates the enhancement of startle by the dopamine D1 receptor agonist SKF 82958 in rats. *J Neurosci* 20:5374-5381.2000).
- Meredith MA, Stein BE (Interactions among converging sensory inputs in the superior colliculus. *Science* 221:389-391.1983).
- Meredith MA, Stein BE (Descending efferents from the superior colliculus relay integrated multisensory information. *Science* 227:657-659.1985).
- Meredith MA, Stein BE (Spatial factors determine the activity of multisensory neurons in cat superior colliculus. *Brain Res* 365:350-354.1986a).
- Meredith MA, Stein BE (Visual, auditory, and somatosensory convergence on cells in superior colliculus results in multisensory integration. *J Neurophysiol* 56:640-662.1986b).
- Mitchell IJ, Dean P, Redgrave P (The projection from superior colliculus to cuneiform area in the rat. II. Defence-like responses to stimulation with glutamate in cuneiform nucleus and surrounding structures. *Exp Brain Res* 72:626-639.1988).
- Mize RR (The organization of GABAergic neurons in the mammalian superior colliculus. *Prog Brain Res* 90:219-248.1992).
- Moriizumi T, Hattori T (Pallidotectal projection to the inferior colliculus of the rat. *Exp Brain Res* 87:223-226.1991).
- Muller-Ribeiro FC, Dampney RA, McMullan S, Fontes MA, Goodchild AK (Disinhibition of the midbrain colliculi unmasks coordinated autonomic, respiratory and somatomotor responses to auditory and visual stimuli. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*.2014).
- Muller-Ribeiro FC, Zaretsky DV, Zaretskaia MV, Santos RA, DiMicco JA, Fontes MA (Contribution of infralimbic cortex in the cardiovascular response to acute stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 303:R639-650.2012).

- Nashold BS, Jr., Wilson WP, Slaughter DG (Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *J Neurosurg* 30:14-24.1969).
- Nobre MJ, Lopes MG, Brandao ML (Defense reaction mediated by NMDA mechanisms in the inferior colliculus is modulated by GABAergic nigro-collicular pathways. *Brain Res* 999:124-131.2004).
- Okada Y (Distribution of gamma-aminobutyric acid (GABA) in the layers of the superior colliculus of the rabbit. *Brain Res* 75:362-366.1974).
- Olazabal UE, Moore JK (Nigrotectal projection to the inferior colliculus: horseradish peroxidase transport and tyrosine hydroxylase immunohistochemical studies in rats, cats, and bats. *J Comp Neurol* 282:98-118.1989).
- Paton JF, Boscan P, Pickering AE, Nalivaiko E (The yin and yang of cardiac autonomic control: vago-sympathetic interactions revisited. *Brain Res Brain Res Rev* 49:555-565.2005).
- Paton JF, Nalivaiko E, Boscan P, Pickering AE (Reflexly evoked coactivation of cardiac vagal and sympathetic motor outflows: observations and functional implications. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33:1245-1250.2006).
- Paxinos G, Watson C (2004) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Elsevier: Oxford, UK:.
- Pellet J (Neural organization in the brainstem circuit mediating the primary acoustic head startle: an electrophysiological study in the rat. *Physiol Behav* 48:727-739.1990).
- Peruzzi D, Dut A (GABA, serotonin and serotonin receptors in the rat inferior colliculus. *Brain Res* 998:247-250.2004).
- Pickering M, Jones JF (Comparison of the motor discharge to the crural and costal diaphragm in the rat. *Respir Physiol Neurobiol* 159:21-27.2007).
- Polosa C (The silent period of sympathetic preganglionic neurons. *Can J Physiol Pharmacol* 45:1033-1045.1967).

- Redgrave P, Dean P, Mitchell IJ, Odekunle A, Clark A (The projection from superior colliculus to cuneiform area in the rat. I. Anatomical studies. *Exp Brain Res* 72:611-625.1988).
- Redgrave P, Dean P, Souki W, Lewis G (Gnawing and changes in reactivity produced by microinjections of picrotoxin into the superior colliculus of rats. *Psychopharmacology (Berl)* 75:198-203.1981).
- Redgrave P, Marrow L, Dean P (Topographical organization of the nigrotectal projection in rat: evidence for segregated channels. *Neuroscience* 50:571-595.1992).
- Redgrave P, Mitchell IJ, Dean P (Descending projections from the superior colliculus in rat: a study using orthograde transport of wheatgerm-agglutinin conjugated horseradish peroxidase. *Exp Brain Res* 68:147-167.1987).
- Redgrave P, Odekunle A, Dean P (Tectal cells of origin of predorsal bundle in rat: location and segregation from ipsilateral descending pathway. *Exp Brain Res* 63:279-293.1986).
- Robinson RG, Kubos KL, Starr LB, Rao K, Price TR (Mood disorders in stroke patients. Importance of location of lesion. *Brain* 107 (Pt 1):81-93.1984).
- Rosen A (Augmented cardiac contraction, heart acceleration and skeletal muscle vasodilatation produced by hypothalamic stimulation in cats. *Acta Physiol Scand* 52:291-308.1961).
- Schmitt P, Karli P (Escape induced by combined stimulation in medial hypothalamus and central gray. *Physiol Behav* 24:111-121.1980).
- Schramm LP, Strack AM, Platt KB, Loewy AD (Peripheral and central pathways regulating the kidney: a study using pseudorabies virus. *Brain Res* 616:251-262.1993).
- Sherk H (Connections and visual-field mapping in cat's tectoparabigeminal circuit. *J Neurophysiol* 42:1656-1668.1979).
- Simler S, Hirsch E, Danober L, Motte J, Vergnes M, Marescaux C (C-fos expression after single and kindled audiogenic seizures in Wistar rats. *Neurosci Lett* 175:58-62.1994).

- Sly JD, Colvill L, McKinley JM, Oldfield JB (Identification of neural projections from the forebrain to the kidney, using the virus pseudorabies. *J Auton Nerv Syst* 77:73-82.1999).
- Sparks DL (Neural cartography: sensory and motor maps in the superior colliculus. *Brain Behav Evol* 31:49-56.1988).
- Stein BE (Neural mechanisms for synthesizing sensory information and producing adaptive behaviors. *Exp Brain Res* 123:124-135.1998).
- Stein BE, Gaither NS (Sensory representation in reptilian optic tectum: some comparisons with mammals. *J Comp Neurol* 202:69-87.1981).
- Strack AM, Sawyer WB, Hughes JH, Platt KB, Loewy AD (A general pattern of CNS innervation of the sympathetic outflow demonstrated by transneuronal pseudorabies viral infections. *Brain Res* 491:156-162.1989).
- Subramanian HH, Balnave RJ, Holstege G (The midbrain periaqueductal gray control of respiration. *J Neurosci* 28:12274-12283.2008).
- Thomas PK, Jefferys JG, Sharma AK, Bajada S (Nerve conduction velocity in experimental diabetes in the rat and rabbit. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 44:233-238.1981).
- Troncoso AC, Osaki MY, Mason S, Borelli KG, Brandao ML (Apomorphine enhances conditioned responses induced by aversive stimulation of the inferior colliculus. *Neuropsychopharmacology* 28:284-291.2003).
- Vargas LC, Marques TA, Schenberg LC (Micturition and defensive behaviors are controlled by distinct neural networks within the dorsal periaqueductal gray and deep gray layer of the superior colliculus of the rat. *Neurosci Lett* 280:45-48.2000).
- Verberne AJ (Cuneiform nucleus stimulation produces activation of medullary sympathoexcitatory neurons in rats. *Am J Physiol* 268:R752-758.1995).

- Wiberg M, Westman J, Blomqvist A (Somatosensory projection to the mesencephalon: an anatomical study in the monkey. *J Comp Neurol* 264:92-117.1987).
- Winer JA, Larue DT, Diehl JJ, Hefti BJ (Auditory cortical projections to the cat inferior colliculus. *J Comp Neurol* 400:147-174.1998).
- Winer JA, Saint Marie RL, Larue DT, Oliver DL (GABAergic feedforward projections from the inferior colliculus to the medial geniculate body. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8005-8010.1996).
- Winslow JT, Parr LA, Davis M (Acoustic startle, prepulse inhibition, and fear-potentiated startle measured in rhesus monkeys. *Biol Psychiatry* 51:859-866.2002).
- Wittling W (The right hemisphere and the human stress response. *Acta Physiol Scand Suppl* 640:55-59.1997).
- Xavier CH, Nalivaiko E, Beig MI, Menezes GB, Cara DC, Campagnole-Santos MJ, Fontes MA (Functional asymmetry in the descending cardiovascular pathways from dorsomedial hypothalamic nucleus. *Neuroscience* 164:1360-1368.2009).

ANEXO

Synchronized activation of sympathetic vasomotor, cardiac, and respiratory outputs by neurons in the midbrain colliculi

Kamon Iigaya, Flávia Camargos de Figueirêdo Müller-Ribeiro, Jouji Horiuchi, Lachlan M. McDowall, Eugene Nalivaiko, Marco A. P. Fontes and Roger A. L. Dampney
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 303:R599-R610, 2012. First published 18 July 2012;
doi: 10.1152/ajpregu.00205.2012

You might find this additional info useful...

This article cites 57 articles, 16 of which you can access for free at:
<http://ajpregu.physiology.org/content/303/6/R599.full#ref-list-1>

Updated information and services including high resolution figures, can be found at:
<http://ajpregu.physiology.org/content/303/6/R599.full>

Additional material and information about *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* can be found at:
<http://www.the-aps.org/publications/ajpregu>

This information is current as of March 18, 2013.

American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology publishes original investigations that illuminate normal or abnormal regulation and integration of physiological mechanisms at all levels of biological organization, ranging from molecules to humans, including clinical investigations. It is published 24 times a year (twice monthly) by the American Physiological Society, 9650 Rockville Pike, Bethesda MD 20814-3991. Copyright © 2012 the American Physiological Society. ISSN: 1522-1490. Visit our website at <http://www.the-aps.org/>.

Synchronized activation of sympathetic vasomotor, cardiac, and respiratory outputs by neurons in the midbrain colliculi

Kamon Iigaya,^{1*} Flávia Camargos de Figueirêdo Müller-Ribeiro,^{1,2*} Jouji Horiuchi,^{1,3}
Lachlan M. McDowall,¹ Eugene Nalivaiko,⁴ Marco A. P. Fontes,² and Roger A. L. Dampney¹

¹School of Medical Sciences (Physiology) and Bosch Institute for Biomedical Research, University of Sydney, Australia;

²Laboratório de Hipertensão, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil; ³Department of Biomedical Engineering, Toyo University, Saitama, Japan; and ⁴School of Biomedical Sciences and Pharmacy, University of Newcastle, Callaghan, Australia

Submitted 8 May 2012; accepted in final form 12 July 2012

Iigaya K, Müller-Ribeiro FC, Horiuchi J, McDowall LM, Nalivaiko E, Fontes MA, Dampney RA. Synchronized activation of sympathetic vasomotor, cardiac, and respiratory outputs by neurons in the midbrain colliculi. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 303: R599–R610, 2012. First published July 18, 2012; doi:10.1152/ajpregu.00205.2012.—The superior and inferior colliculi are believed to generate immediate and highly coordinated defensive behavioral responses to threatening visual and auditory stimuli. Activation of neurons in the superior and inferior colliculi have been shown to evoke increases in cardiovascular and respiratory activity, which may be components of more generalized stereotyped behavioral responses. In this study, we examined the possibility that there are “command neurons” within the colliculi that can simultaneously drive sympathetic and respiratory outputs. In anesthetized rats, microinjections of bicuculline (a GABA_A receptor antagonist) into sites within a circumscribed region in the deep layers of the superior colliculus and in the central and external nuclei of the inferior colliculus evoked a response characterized by intense and highly synchronized bursts of renal sympathetic nerve activity (RSNA) and phrenic nerve activity (PNA). Each burst of RSNA had a duration of ~300–400 ms and occurred slightly later (peak to peak latency of 41 ± 8 ms) than the corresponding burst of PNA. The bursts of RSNA and PNA were also accompanied by transient increases in arterial pressure and, in most cases, heart rate. Synchronized bursts of RSNA and PNA were also evoked after neuromuscular blockade, artificial ventilation, and vagotomy and so were not dependent on afferent feedback from the lungs. We propose that the synchronized sympathetic-respiratory responses are driven by a common population of neurons, which may normally be activated by an acute threatening stimulus.

command neuron; defensive behavior; heart rate; arterial pressure

THE MAMMALIAN SUPERIOR COLLICULUS is a key brain region that receives visual and other signals arising from a stimulus in the external environment and processes these signals to produce an appropriate somatomotor response (e.g., an orienting response, in which the head and eyes are moved to allow focusing on a novel stimulus) (19, 26). In addition, however, there is considerable evidence that the superior colliculus also generates defensive responses, such as avoidance or escape, evoked by a threatening stimulus such as the presence of a predator (5, 7, 9, 16, 19). Furthermore, stimulation of neurons in the superior colliculus can also evoke increases in blood pressure, heart rate (HR), and

respiratory activity (39, 40), and it has been proposed that such effects are part of a coordinated response to stimuli that trigger orienting or avoidance/defensive behaviors (19).

The inferior colliculus receives auditory signals from several nuclei in the lower brain stem and has an essential role in the processing of auditory signals (15, 50). Similar to the superior colliculus, activation of neurons in the inferior colliculus can evoke a behavioral response similar to defensive behavior (8, 12), as well as increases in blood pressure and HR (8). It has been proposed that the inferior colliculus is part of a more generalized system in the dorsal midbrain, which also includes the superior colliculus and periaqueductal gray (PAG), which integrates the somatomotor and autonomic responses to threatening stimuli signaled by visual, auditory, and somatosensory inputs (7, 57).

Distinct populations of neurons in the superior colliculus can generate different patterns of coordinated responses that are rapid in onset and that are appropriate for particular stimuli (19, 26). Similarly, evidence from anatomical, neurophysiological, and behavioral studies of the inferior colliculus have led to the proposal that there are neurons in the inferior colliculus that respond to particular auditory stimuli, such as particular sounds made by prey or predators, and which then trigger immediate responses termed fixed action patterns, which are appropriate for each stimulus (14).

These observations thus raise the possibility that there are neurons within the superior and inferior colliculi that are capable of generating, in addition to somatomotor responses, a coordinated cardiovascular and respiratory response that is appropriate for a defensive behavioral response (e.g., escape), which is triggered by a threatening stimulus. Disinhibition (by microinjection of bicuculline, a GABA_A receptor antagonist) of sites within the superior and inferior colliculi is a highly effective means of evoking defensive behavioral responses, indicating that the neurons generating such responses receive a tonic GABAergic inhibition (5, 6, 8, 19). The aim of this study, therefore, was to determine the effects of disinhibition of neurons (by microinjection of bicuculline) within the superior and inferior colliculi on cardiovascular function [arterial pressure, HR, and renal sympathetic nerve activity (RSNA)] and respiratory function [phrenic nerve activity (PNA)]. The RSNA was measured because although renal sympathetic nerves regulate tubules and the juxtaglomerular granular cells as well as blood vessels in the kidney (21), RSNA is closely correlated with arterial pressure and is believed to be a reliable indicator of overall sympathetic vasomotor activity (10). Furthermore, RSNA is increased in response to threatening stimuli

* Kamon Iigaya and Flávia Müller-Ribeiro contributed equally to this work.

Address for reprint requests and other correspondence: R. A. L. Dampney, School of Medical Sciences (Physiology) and Bosch Institute for Biomedical Research, F13, The Univ. of Sydney, NSW 2006, Australia (e-mail: roger.dampney@sydney.edu.au).

in the conscious rat (37, 42). The results showed that disinhibition of sites within a circumscribed region in the midbrain colliculi evoked a distinctive response characterized by highly synchronized bursts of sympathetic and respiratory (phrenic nerve) activity. These synchronized responses were not dependent on afferent feedback from the lungs, and an analysis of the temporal relationships between the sympathetic and phrenic nerve bursts indicated that they were driven by a common population of neurons within the colliculi.

MATERIALS AND METHODS

General procedures. Experiments were performed on a total of 25 male adult Sprague-Dawley rats supplied by the University of Sydney Laboratory Animal Services. All experimental procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the University of Sydney and were carried out in accordance with the Guidelines for Animal Experimentation of the National Health and Medical Research Council of Australia. Anesthesia was initially induced by inhalation of isoflurane (2.0–2.5% in oxygen-enriched air). The trachea was then intubated and body temperature was maintained in the range of 37–38°C with a heating pad. A catheter was placed in a femoral artery for the recording of pulsatile arterial pressure. After the surgery, the isoflurane anesthesia was gradually withdrawn while being replaced by urethane (1.3 g/kg iv with supplementary doses of 0.1 g/kg iv, if required). The adequacy of anesthesia was verified by the absence of the corneal reflex and a withdrawal response to nociceptive stimulation of a hind paw. A tracheotomy was performed to maintain an unobstructed airway, and all animals were allowed to breathe freely, except in two experiments in which the rats were paralyzed (*d*-tubocurarine, 0.6 mg/kg iv initial dose, followed by continuous iv infusion at 0.1 mg·kg⁻¹·h⁻¹) and artificially ventilated with room air plus additional O₂ at a rate that maintained end-tidal CO₂ levels within the range 3.5–4.5% and O₂ close to 40%. The vagi were also cut in these two experiments.

In spontaneously breathing rats, the resting respiratory rate remained stable throughout the experiment (121 ± 3 breaths/min just before the first microinjection of bicuculline, and 115 ± 4 breaths/min during the recovery period after the final injection when all cardiorespiratory variables had stabilized). These respiratory rates are very similar to those measured in awake Sprague-Dawley rats under resting conditions (36). In addition, in nine experiments the CO₂ in the tracheal tube was sampled continuously throughout the experiment using a CO₂ meter (Datex, Engstrom). The response time of the CO₂ meter was not rapid enough to measure end-tidal CO₂ when the rats were breathing spontaneously, so that the peak CO₂ value for each breath would tend to underestimate the end-tidal CO₂. Changes in the measured peak CO₂, however, would indicate changes in end-tidal CO₂. The average resting peak CO₂ was stable during the experiments (2.59 ± 0.22% at the start and 2.57 ± 0.28% at the end). This, together with the fact that there was little change in respiratory rate, indicates that the rats were adequately ventilated throughout the experiments.

The mean arterial pressure (MAP) and HR signals were derived from the pulsatile arterial pressure signal via a low-pass filter and a rate meter, respectively, and recorded on a computer using a PowerLab system (AD Instruments).

Nerve recordings. The rat was then mounted in a stereotaxic apparatus with the incisor bar fixed 3.5 mm below the interaural line, and the renal and phrenic nerves were exposed and prepared for recording as described previously (45). Briefly, the renal nerve was exposed from a retroperitoneal approach. It was carefully separated from surrounding tissue and placed on bipolar recording electrodes and immersed in mineral oil. The left phrenic nerve was exposed and isolated from a dorsal approach, just ventral to the brachial plexus. The phrenic nerve was then cut distally, and the proximal end of the

nerve was then placed on a bipolar recording electrode. The signals from the recording electrodes were amplified and filtered (bandwidth 100–2,000 Hz for the renal nerve, and 10–2,000 Hz for the phrenic nerve). These signals were then digitized (1,000 samples/s) and recorded using the PowerLab system. Chart software was used to rectify and integrate the RSNA and PNA signals and to compute the rate of the bursts of PNA.

Microinjections. A small portion of the dorsal surface of the brain was exposed to allow insertion of micropipettes into the colliculi. Microinjections of bicuculline methochloride (Tocris), a GABA_A receptor antagonist, were made into sites in the midbrain using a glass micropipette held vertically in a micromanipulator. The dose of bicuculline injected was 50 pmol (in 50 nl). The vehicle solution was artificial cerebrospinal fluid adjusted to pH 7.4. In all cases the injectate also contained green or red fluorescent latex microspheres (0.5%, Lumafuor) to facilitate the later histological verification of microinjection sites. Microinjections were made by pressure using a previously described method (24). At the end of each experiment, the rat was euthanized with an overdose of pentobarbital sodium. The brain was removed, and after fixation in 4% paraformaldehyde solution, coronal sections (50 μm) were cut on a freezing microtome and mounted onto glass slides. Injection sites were determined using a fluorescence microscope and mapped onto standard sections of the atlas of Paxinos and Watson (48).

Experimental procedures. For bicuculline microinjections aimed at sites within the colliculi or in the region more ventral, the tip of the micropipette was positioned stereotaxically at rostrocaudal levels ranging from 7.1 to 8.4 mm caudal to bregma in tracks located 1.0–2.8 mm lateral to the midline and at depths varying from 4.0 to 7.5 mm ventral to bregma, according to the atlas of Paxinos and Watson (48). For microinjections aimed at sites within the dorsolateral PAG, microinjections were made into tracks located more medially (0.3–0.7 mm lateral to the midline) at levels 7.4–7.6 mm caudal to bregma. In each experiment microinjections were made into sites that were 0.5–1.0 mm apart in the dorsoventral, mediolateral, or rostrocaudal directions. If a microinjection evoked a response, there was a waiting period of at least 30 min before the next microinjection was made, by which time all cardiovascular and respiratory variable had returned to levels close to their previous baseline values. In seven cases a microinjection of bicuculline was made into the same site as the previous microinjection. In all these cases both responses were similar in magnitude, indicating that the first microinjection did not significantly affect the responsiveness of neurons to the second repeated microinjection.

Cycle-triggered averaging. As described in the RESULTS, bicuculline microinjections at many sites within the colliculi evoked synchronized bursts of RSNA and PNA. Cycle-triggered averaging was used to determine the time relationships between the bursts of RSNA and PNA and also associated changes in MAP and HR. For this purpose, the raw RSNA and PNA signals were first rectified and then integrated (time constant of 0.1 s). For each RSNA burst, the peak of the burst was first identified, and then samples of the digitized signals for all four simultaneously recorded variables (integrated RSNA, integrated PNA, MAP, and HR) were taken over the period from 1.5 s before to 2.5 s after this trigger point (200 samples/s). This process was performed for 10 RSNA bursts, and the average of these 10 sweeps was calculated for all four variables.

As shown in the RESULTS, cycle-triggered averaging revealed that the averaged PNA in the period immediately preceding a burst of RSNA and the associated burst of PNA was not flat, but in most experiments was cyclic, with the same frequency as the ongoing regular respiratory frequency. As described in the RESULTS, this was due to the fact that the bursts of RSNA did not occur at random times during the regular respiratory cycle but instead occurred most frequently at a time corresponding to the immediate postinspiratory phase. Cycle-triggered averaging was then used to quantify the degree to which the time of occurrence of the RSNA burst was correlated to the

ongoing normal respiratory rhythm. This was measured by calculating the ratio of the amplitude of the oscillation (i.e., maximum – minimum) of the averaged PNA calculated using cycle-triggered averaging over the period from 1.5 s before to 0.75 s before the trigger point (peak of RSNA burst), to the average value of the amplitudes of the oscillations of PNA over the same time period for each of the 10 individual recordings that were used in determining the cycle-triggered averaging. A ratio of 100% would imply that the RSNA burst had occurred at exactly the same time point in the normal respiratory cycle for each of the 10 individual recordings, whereas a value close to zero would imply that the timing of the RSNA burst had no consistent relation to the normal respiratory cycle. This ratio will be referred to in this paper as the “respiratory cycle correlation index.”

Statistical analysis. As described in the RESULTS, responses were classified into three groups according to the degree of synchronization between bursts of RSNA and of PNA (i.e., strong, moderate, and little or no RSNA/PNA burst synchrony). The amplitudes of RSNA and PNA bursts in the groups with strong and moderate RSNA/PNA burst synchrony were compared using the *t*-test. The peak changes in MAP, HR, integrated RSNA and integrated PNA were compared for all three groups using one-way ANOVA. If this revealed a statistically significant difference ($P < 0.05$), a subsequent pair-wise comparison was performed using the *t*-test with application of the Helm step-down procedure for multiple comparisons (55). All values are presented as means \pm SE. A chi-squared analysis was also used to test whether the differences in regional distribution of sites evoking different types of responses were statistically significant.

RESULTS

General description of cardiovascular and respiratory responses evoked by bicuculline microinjection into the colliculi and surrounding regions. Microinjections of bicuculline (50 pmol) were made into 119 sites in 23 experiments in spontaneously breathing rats. The centers of the injection sites extended rostrocaudally from 7.1 to 8.6 mm caudal to bregma [atlas of Paxinos and Watson, (48)] and were mapped on to three levels at 7.20, 7.80, and 8.3 mm caudal to bregma. The sites were located within the intermediate and deep layers of the superior colliculus, the external and central nuclei of the inferior colliculus, PAG, and in the region ventral to the superior and inferior colliculi, including the precuneiform and cuneiform nuclei (Fig. 1).

Our subsequent analysis allowed us to classify the responses evoked from these sites into different types, depending on the pattern of the evoked changes in PNA and their relationship with evoked changes in RSNA. In the first type ($n = 8$), there were large increases in both integrated RSNA and integrated PNA of at least 50% above baseline that were accompanied by an increase in MAP and (in 7 of 8 cases) by an increase in HR (see Fig. 2 for an example of such a response). In most cases (5 of 8) bicuculline microinjections also evoked a change in the

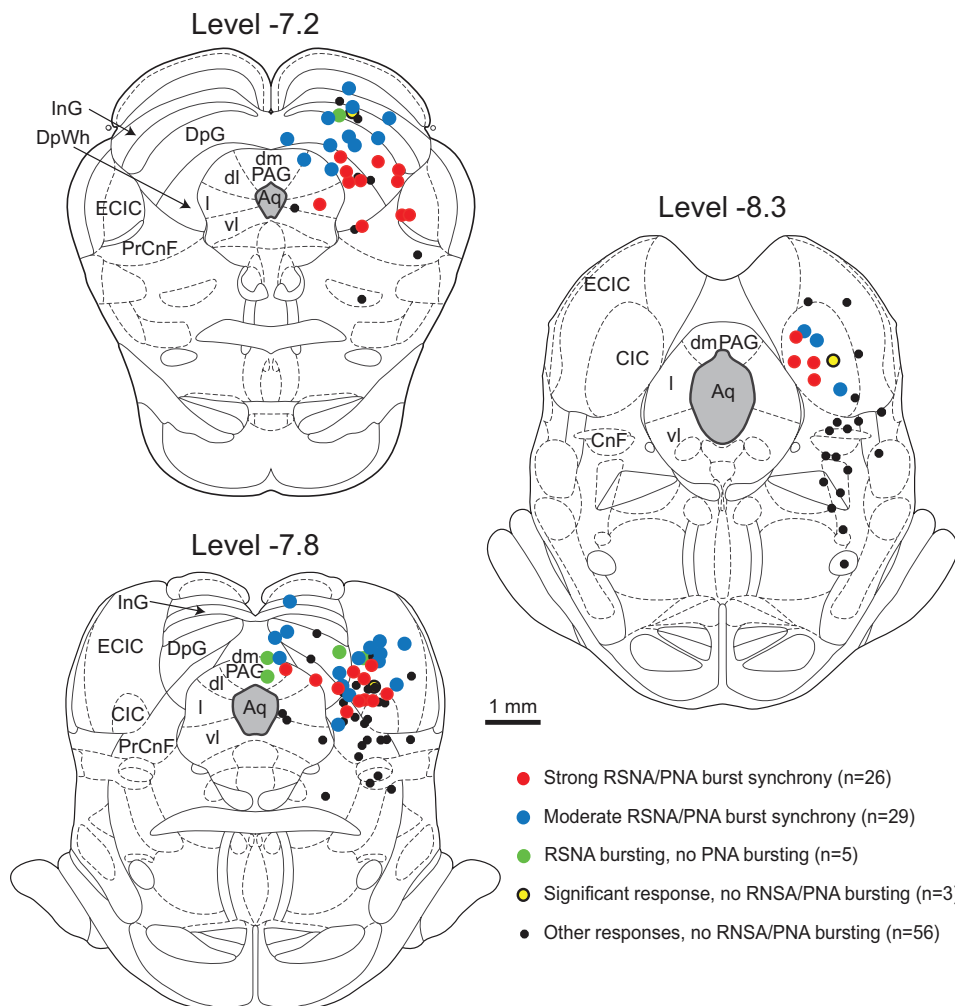


Fig. 1. Coronal sections of the rat brain from the atlas of Paxinos and Watson (with permission, 48), showing the centers of injection sites of bicuculline (50 pmol) in the superior and inferior colliculi and surrounding regions in 23 experiments in spontaneously breathing rats. The heading above each section indicates the distance of that section in millimeters from bregma. The different colored filled circles indicate the pattern of response evoked from each site, as shown in the key. Aq, aqueduct; CIC, central nucleus of the inferior colliculus; CnF, cuneiform nucleus; dm, dorsomedial; dl, dorso-lateral; DpG, deep gray layer of the superior colliculus; DpWh, deep white layer of the superior colliculus; ECIC, external nucleus of the inferior colliculus; InG, intermediate gray layer of the superior colliculus; I, lateral; PAG, periaqueductal gray; PrCnF, precuneiform nucleus; vl, ventrolateral.

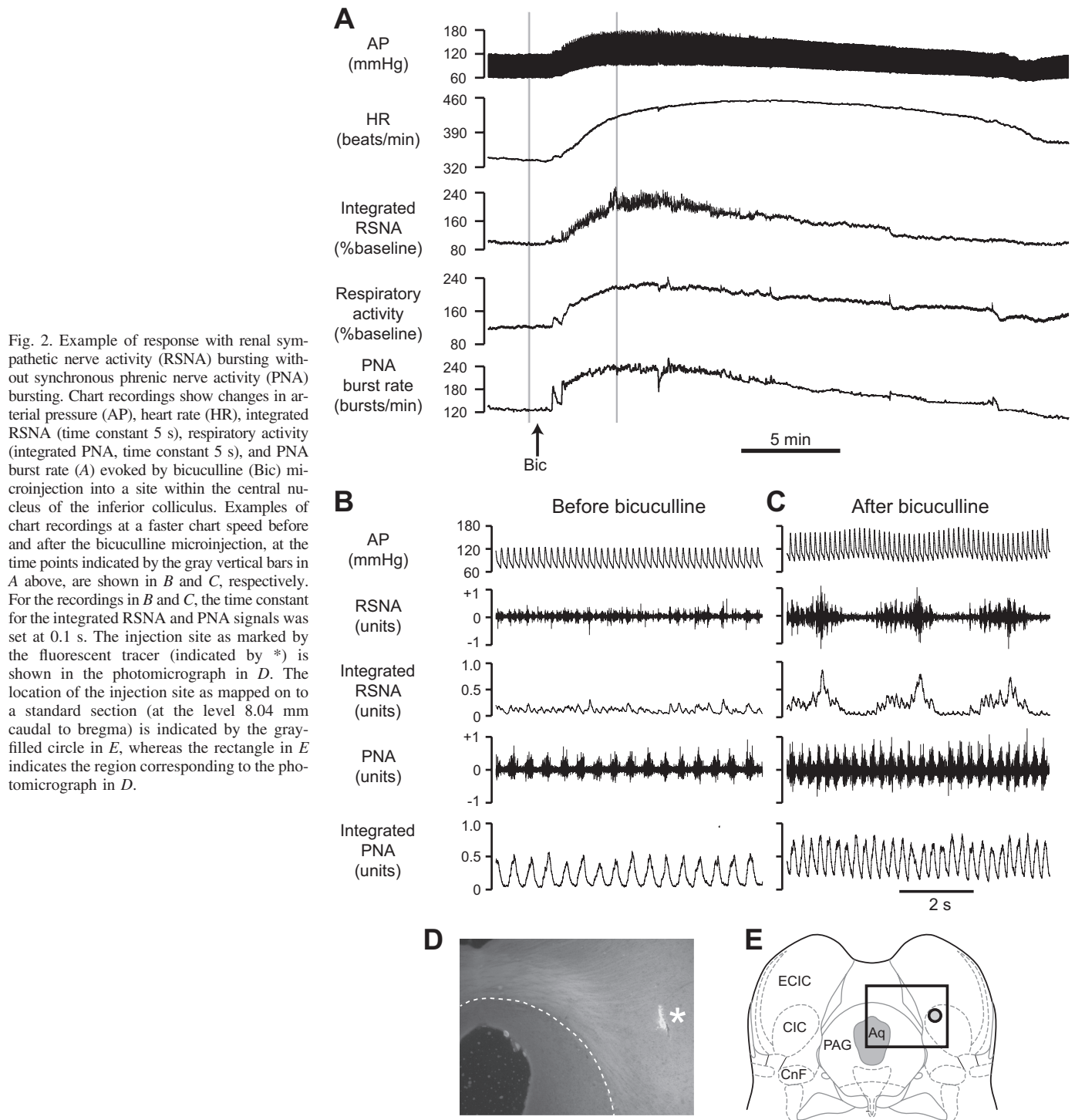


Fig. 2. Example of response with renal sympathetic nerve activity (RSNA) bursting without synchronous phrenic nerve activity (PNA) bursting. Chart recordings show changes in arterial pressure (AP), heart rate (HR), integrated RSNA (time constant 5 s), respiratory activity (integrated PNA, time constant 5 s), and PNA burst rate (A) evoked by bicuculline (Bic) microinjection into a site within the central nucleus of the inferior colliculus. Examples of chart recordings at a faster chart speed before and after the bicuculline microinjection, at the time points indicated by the gray vertical bars in A above, are shown in B and C, respectively. For the recordings in B and C, the time constant for the integrated RSNA and PNA signals was set at 0.1 s. The injection site as marked by the fluorescent tracer (indicated by *) is shown in the photomicrograph in D. The location of the injection site as mapped on to a standard section (at the level 8.04 mm caudal to bregma) is indicated by the gray-filled circle in E, whereas the rectangle in E indicates the region corresponding to the photomicrograph in D.

pattern of RSNA, such that intense bursts occurred at intervals of 2–5 s (e.g., Fig. 2C). These bursts of RSNA had a duration of ~300–400 ms. In all these five cases, however, the PNA maintained a consistent regular rhythm during the periods when bursts of RSNA were evoked by bicuculline microinjections (e.g., Fig. 2C).

In contrast, bicuculline microinjections at other sites evoked a different type of response that was characterized by synchronous bursts of both RSNA and PNA, as shown

for example in Fig. 3. The onset of these synchronous bursts of RSNA and PNA mostly occurred just after the preceding peak of a regular PNA burst, as shown for example in Fig. 3C. Each synchronous burst of RSNA and PNA was accompanied by an increase in arterial pressure, the onset of which also coincided with the RSNA and PNA bursts. As illustrated in Fig. 3D, the intense PNA bursts evoked from such sites were consistently associated with synchronous RSNA bursts.

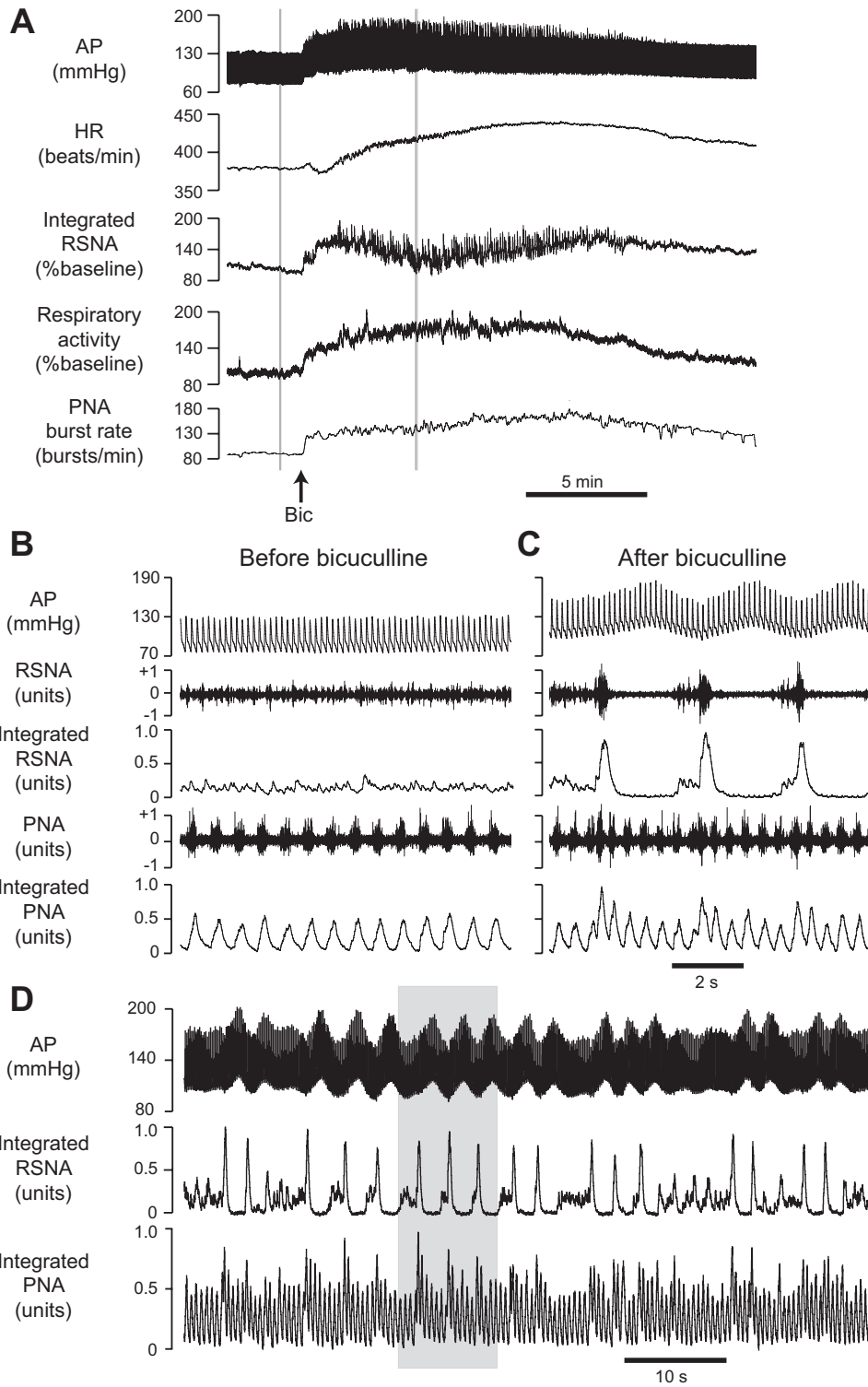


Fig. 3. Example of response with strong RSNA/PNA burst synchrony. *A*: chart recordings of a bicuculline-evoked response in which bursts of RSNA occurred, each of which was accompanied by a burst of PNA. *B* and *C*: chart recordings before and after the bicuculline microinjection, at the time points indicated by the gray vertical bars in *A* above, whereas *D* is a longer section of the chart recording that includes the section (indicated by the gray shading) shown in *C*. For the slower chart speed recordings in *A* the time constant for the integrated RSNA and PNA signals was set at 5 s, and for the faster speed recordings in *B*, *C*, and *D* it was set at 0.1 s.

Cycle-triggered averaging was used to quantify the magnitudes of the synchronous RSNA and PNA bursts and the associated changes in MAP and HR (Fig. 4). Responses with strong RSNA/PNA burst synchrony were defined as responses in which the peak amplitude of the averaged synchronous PNA burst was at least 100% greater than the baseline averaged PNA (e.g., Fig. 4A). Such responses were evoked from 26 sites. Responses with moderate RSNA/PNA burst synchrony were defined

as responses in which the peak amplitude of the averaged synchronous PNA burst was 30–99% greater than the baseline averaged PNA (e.g., Fig. 4B). Such responses were evoked from 29 other sites. Cycle-triggered averaging was also performed for the five responses of the first type, in which the PNA maintained a regular rhythm during the periods when bursts of RSNA were evoked by bicuculline microinjections. This analysis confirmed that in all five cases the averaged RSNA burst was not

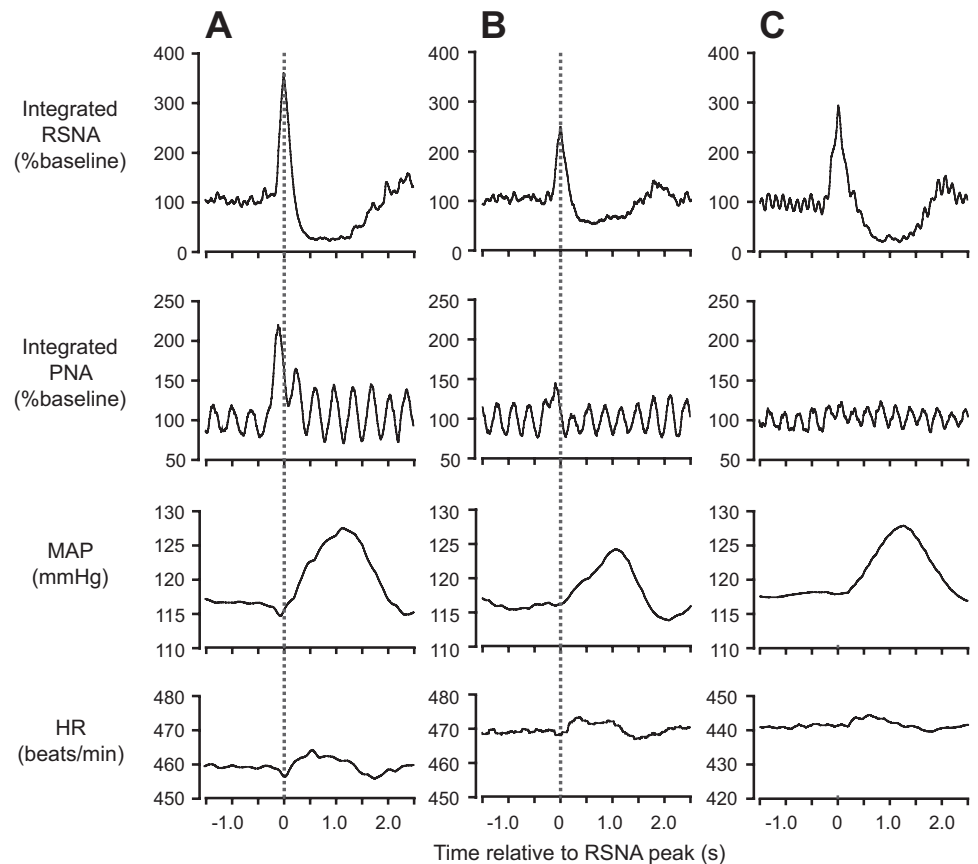


Fig. 4. Examples of cycle-triggered averaging, showing averages of 10 sweeps of integrated RSNA, integrated PNA, MAP, and HR for a response with strong RSNA/PNA synchrony (A), moderate RSNA/PNA synchrony (B), and no significant RSNA/PNA synchrony (C). In each case the peak of the integrated RSNA signal was taken as the trigger point (indicated by the vertical dashed line), and the signals were averaged over the period from 1.5 s before to 2.5 s after the trigger point. The time constant for the integrated RSNA and PNA signals was set at 0.1 s.

associated with a significant increase in the averaged PNA (e.g., Fig. 4C).

Immediately after each burst of RSNA, there was a period of 1–2 s during which the level of RSNA was greatly reduced compared with the baseline level that immediately preceded the onset of the RSNA burst. This postburst depression of RSNA was consistently observed whether or not the RSNA burst was associated with a synchronous PNA burst (Figs. 2C, 3C, and 4).

At the remaining 56 sites (Fig. 1), bicuculline microinjections evoked responses that did not fit into any of the categories described above. In most cases there was no response or else a

very small response, although in a few cases there was a significant change in just one variable (RSNA, PNA, or HR) that was accompanied by little or no change in other variables.

Because responses with strong and moderate RSNA/PNA synchrony were defined according to the magnitudes of the PNA bursts as described above, there were clear differences in the amplitudes of the PNA bursts when the two groups were compared (Fig. 5).

At the same time, there were also clear and significant differences between the two groups with respect to the magnitudes of the associated RSNA bursts and increases in MAP and HR (Fig. 5). The changes in HR associated with responses

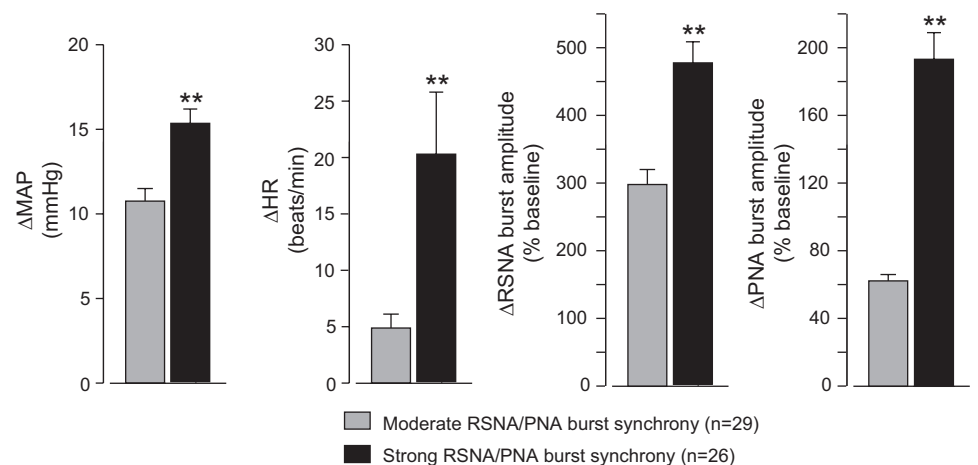


Fig. 5. Grouped data (means \pm SE) showing the relative magnitudes of the averaged RSNA and PNA bursts and associated changes in MAP and HR for bicuculline-evoked responses with strong and moderate RSNA/PNA burst synchrony, as determined using cycle-triggered averaging. ** $P < 0.001$, vs. moderate RSNA/PNA burst synchrony.

with moderate RSNA/PNA synchrony were small (average increase of 5 ± 1 beats/min, Fig. 5), whereas in the case of responses with strong RSNA/PNA synchrony the changes in HR were highly variable, ranging from an increase of 105 beats/min to a decrease of 10 beats/min, with an overall average increase of 20 ± 5 beats/min (Fig. 5). At most (17 of the 26) of the sites at which responses with strong RSNA/PNA synchrony were evoked, however, there was an initial transient bradycardia, followed by a tachycardia, as shown for example in Fig. 6, A and B.

Location of sites evoking different types of response. As shown in Fig. 1, responses with strong or moderate RSNA/PNA burst synchrony were all evoked from sites centered within the superior or inferior colliculi or dorsomedial, dorso-lateral, and lateral PAG, with the exception of two sites located in the dorsal part of the precuneiform nucleus, close to its border with the external nucleus of the inferior colliculus. In particular, responses with strong RSNA/PNA burst synchrony were evoked from sites that were largely concentrated in the deep layers of the superior colliculus and central and external nuclei of the inferior colliculus, in the region lateral to the dorsal PAG. In contrast, responses with moderate RSNA/PNA burst synchrony were evoked from sites that were mainly located in surrounding sites, particularly more dorsally in the external nucleus of the inferior colliculus and deep and intermediate layers of the superior colliculus (Fig. 1). Bicuculline microinjections into sites ventral to the superior and inferior colliculi evoked either no response or responses with no

RSNA/PNA burst synchrony, with the exception of the two sites located in the dorsal part of the precuneiform nucleus referred to above (Fig. 1).

A chi-squared test was performed to determine whether the observed difference in distribution of sites evoking different types of responses was statistically significant. For this purpose, three different regions were defined, as shown in Fig. 7. These three regions were 1) the dorsal colliculi, consisting of the region in the superior and inferior colliculi dorsal to the dorsal edge of the PAG at the levels 7.2, 7.8, and 8.3 mm caudal to bregma; 2) the ventral colliculi consisting of those parts of the colliculi ventral to the dorsal colliculi; and 3) noncollicular region consisting of those areas outside the PAG and ventral to the superior and inferior colliculi, as shown in Fig. 7. For the purpose of this analysis, all responses in which there was little or no RSNA/PNA burst synchrony (i.e., all responses apart from those with strong or moderate RSNA/PNA burst synchrony) were grouped together into a single category. As shown in Fig. 7, there were clear differences in the distribution of sites evoking different types of responses. The large majority (92%) of responses with strong RSNA/PNA burst synchrony were evoked from the ventral colliculi, whereas the majority of responses with moderate RSNA/PNA burst synchrony (67%) and of those with little or no RSNA/PNA burst synchrony (55%) were evoked from the dorsal colliculi or the noncollicular region ventral to the colliculi, respectively. Chi-squared analysis revealed that these differences in distribution were highly statistically significant ($P < 0.001$).

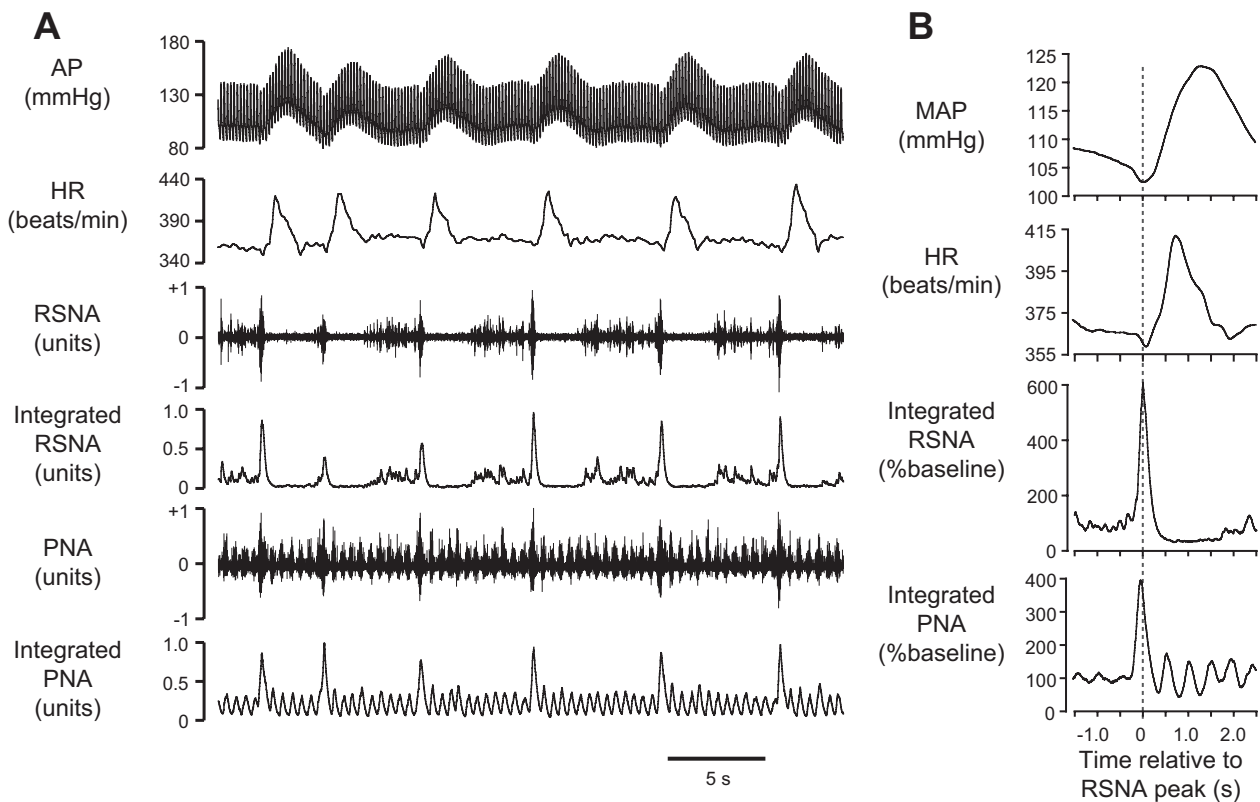


Fig. 6. A: chart recording showing an example of a bicuculline-evoked response in which bursts of RSNA occurred, each of which was accompanied by a burst of PNA and associated changes in MAP and HR. B: results of cycle-triggered averaging for this response where the peak of the integrated RSNA signal was taken as the trigger point (indicated by the vertical dashed line). Note that the HR response was biphasic, with an initial transient small bradycardia followed by a tachycardia.

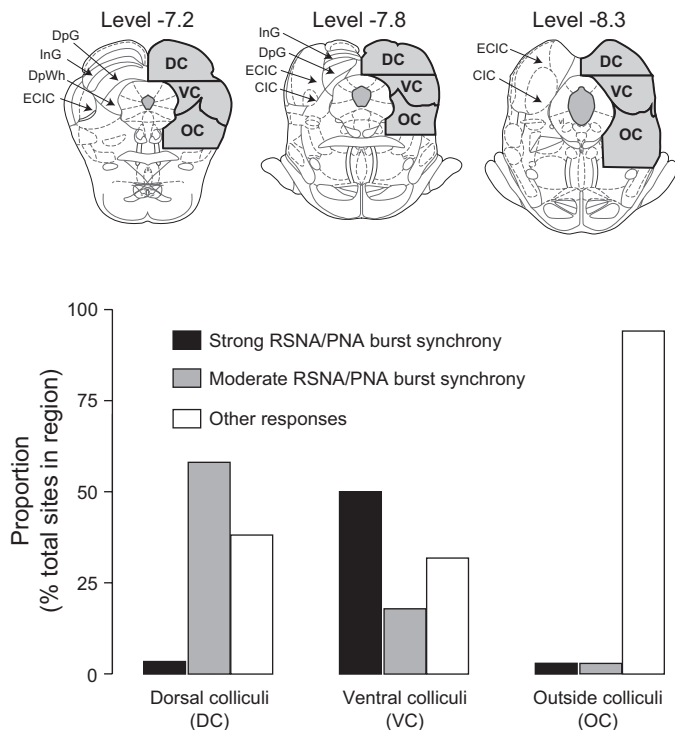


Fig. 7. Relative proportions of responses with strong, moderate, or little or no RSNA/PNA burst synchrony evoked from sites centered in the dorsal colliculi (DC), ventral colliculi (VC), or in the region outside and ventral to the colliculi (OC). The locations of these three regions are shown at the *top*.

Time relationships between PNA and RSNA bursts. Cycle-triggered averaging was used to determine the latency between the peaks of the PNA and RSNA bursts, where the trigger point was the peak of the RSNA burst. As shown in Fig. 4, this showed that the peak of the PNA burst occurred just before the peak of the associated RSNA burst. In the case of responses with strong RSNA/PNA burst synchrony, the time difference between the peaks was 41 ± 8 ms.

As noted above, the onset of PNA bursts mostly occurred just after the preceding peak of a regular PNA burst, as shown for example in Fig. 3C. The fact that these nonregular PNA bursts did not occur randomly throughout the normal respiratory cycle is also reflected in the results of the cycle-triggered averaging analysis, which showed that the averaged PNA preceding the RSNA/PNA bursts was not flat but rather showed a clear cyclic pattern at the same frequency as the regular respiratory rhythm (e.g., Figs. 4 and 6B). The degree to which, for each response, the time of occurrence of the RSNA burst was correlated to the ongoing normal respiratory rhythm was measured by calculating the “respiratory cycle correlation index.” This index is fully explained and defined in the MATERIALS AND METHODS, but in brief a value of 100% would imply that the RSNA burst had occurred at exactly the same time point in the normal respiratory cycle for each RSNA burst evoked from a particular site, whereas a value close to zero would imply that the timing of the RSNA burst had no consistent relation to the normal respiratory cycle. The results showed that the respiratory cycle correlation index was $30.6 \pm 2.6\%$ for the 26 responses in which there was strong RSNA/PNA burst correlation, implying that the synchronous RSNA and PNA bursts did not occur at random points in the normal

respiratory cycle. As already noted, the onset of the PNA burst occurred most frequently just after the preceding peak of a regular PNA burst (e.g., Fig. 3C).

For the 29 responses in which there was moderate RSNA/PNA burst correlation and the 5 responses in which RSNA bursts occurred but without any significant change in the PNA pattern, the respiratory cycle correlation index was calculated to be $28.0 \pm 2.0\%$ and $35.8 \pm 3.6\%$, respectively. The calculated values of this index were not significantly different for all three categories of response ($P = 0.329$). Thus the timing of the onset of the RSNA burst in all cases was related to the normal respiratory cycle, regardless of whether or not the RSNA burst was also associated with a PNA burst.

PNA and RSNA bursts in rats with neuromuscular blockade, vagotomy, and artificial ventilation. In two experiments, neuromuscular blockade was induced, the vagi were cut, and the rats were artificially ventilated. Under these conditions, the PNA burst rate was much less than in intact spontaneously breathing rats (e.g., Fig. 8), but bicuculline microinjections still evoked strong RSNA/PNA burst synchrony (e.g., Fig. 8B). The sites from which such responses were evoked were located within the deep layer of the superior colliculus and in the external nucleus of the inferior colliculus, as in the spontaneously breathing rats.

It is also clear from the results of the experiment shown in Fig. 8B that the synchronized RSNA/PNA bursts occurred just after the normal respiratory burst, i.e., within the postinspiratory period, consistent with the results obtained in spontaneously breathing rats. This experiment also showed that the amplitude of the PNA burst synchronized with the RSNA burst was very similar to that of the preceding regular PNA burst.

DISCUSSION

Previous studies have found that chemical stimulation or disinhibition of neurons within the superior colliculus can increase blood pressure, HR, and respiration (5, 39, 40). Our study confirmed this observation, but the main new finding was that disinhibition of neurons within both the superior and inferior colliculi can result in a highly synchronized activation of sympathetic and respiratory outputs. The sites at which the most intense synchronized sympathetic/respiratory bursts of activity were evoked were located primarily in the central and external nuclei of the inferior colliculus, particularly the more ventral parts of those nuclei, and the deep layers of the superior colliculus. It has previously been shown that microinjection of bicuculline into these regions in conscious rats evokes a behavioral defense response characterized by freezing or escape (5, 6, 8). The central and external nuclei of the inferior colliculus receive mainly auditory inputs (15, 50) and the deep layers of the superior colliculus receive afferent inputs from a wide variety of brain nuclei, conveying auditory and somatosensory inputs in addition to visual inputs (19, 26).

It is well established that a threatening stimulus evokes, in addition to a behavioral defense response, a cardiorespiratory response that includes increases in arterial pressure, cardiac output, RSNA, and respiratory activity (18, 36, 37, 42). The increase in arterial pressure increases the perfusion of active skeletal muscles, while the increase in RSNA together with increases in the activity of sympathetic vasomotor nerves innervating other viscera redistributes the increased cardiac

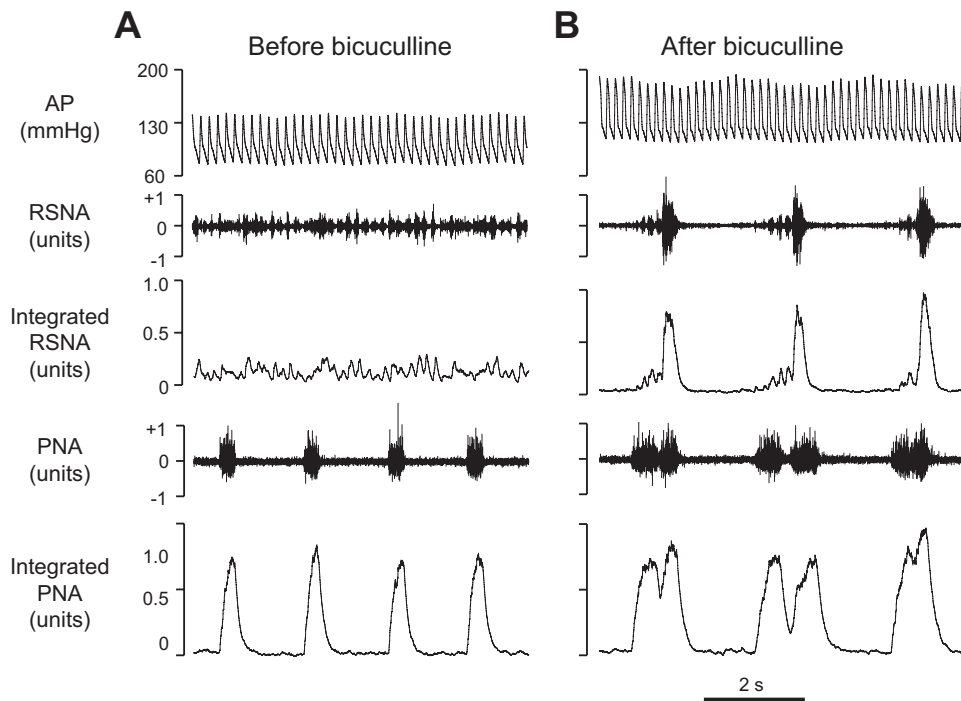


Fig. 8. Chart recording in one experiment of AP, RSNA, and PNA before (A) and after (B) bicuculline microinjection into the inferior colliculus of a rat with neuromuscular blockade, vagotomy, and artificial ventilation. The time constant for the integrated RSNA and PNA signals was set at 0.1 s.

output to the active skeletal muscles (18). At the same time, the increase in respiratory activity increases oxygen uptake in the lungs. Thus our findings are consistent with the view that there are neurons within the superior and inferior colliculi that can generate highly coordinated behavioral responses, accompanied by appropriate cardiovascular and respiratory changes, that allow an animal to escape from a sudden threat such as the appearance of a predator, signaled by visual or auditory inputs (5, 19).

Pattern of the evoked response. It has been previously observed that low-frequency bursts of sympathetic activity, similar to those observed in the present study, can be evoked by microinjection of bicuculline into the paraventricular nucleus of the hypothalamus (41). The mechanisms responsible for this bursting pattern are not clear but may be a consequence of the complete blockade of GABA-mediated inhibition and resultant hyperexcitability of neurons, which can lead to a paroxysmal effect (31). Regardless of the precise mechanisms that are responsible for the bicuculline-evoked bursting activity, however, it had the effect of revealing a mechanism within the colliculi that can generate highly synchronized activation of sympathetic and respiratory outputs.

As pointed out in the RESULTS, irregular bursts of PNA could be distinguished by the fact that they were superimposed upon the normal rhythmic bursts of PNA and were always associated with a synchronized burst of RSNA. In addition, cycle-triggered averaging revealed that the bursts of RSNA were also accompanied by transient but substantial increases in MAP of 10–15 mmHg, suggesting that sympathetic activity in nonrenal vascular beds was also increased.

On the other hand, changes in HR were more variable, but in most cases were biphasic, with an initial transient bradycardia followed by a tachycardia. Although we did not test the relative contributions of cardiac vagal and sympathetic nerves to the HR response, a possible explanation for the variability in this

response was that there were simultaneous increases in both cardiac vagal and sympathetic activity. Such coactivation is commonly evoked by stimulation of various reflexes, including chemoreceptor, nociceptor, and ocular reflexes, and it has been suggested that such coactivation is the norm rather than the exception (46, 47). In addition, it is interesting to note that cardiac vagal and sympathetic coactivation is also often evoked when an alerting stimulus evokes an orienting reflex (1, 4), which, at least when evoked by a visual stimuli, is generated by neurons within the superior colliculus (19, 57).

Possible mechanisms producing synchronized sympathetic and respiratory activation. There are two general possible mechanisms that could produce the observed synchrony between bursts of RSNA and PNA. First, an increase in respiratory activity could activate receptors in the lungs or chest wall that then reflexly increases RSNA. This explanation can be ruled out, however, because synchronized bursts of RSNA and PNA still occurred in paralyzed, artificially ventilated, and vagotomized rats, in which afferent feedback related to lung inflation was eliminated. Thus a much more likely explanation is that the synchronized bursts of RSNA and PNA were driven by a common central mechanism generated by activation of neurons within the colliculi.

Consistent with this hypothesis, the bursts of RSNA did not occur precisely simultaneously with the PNA bursts, but lagged slightly, such that the latency between the peaks of the PNA and RSNA bursts was 41 ± 8 ms. Such a lag would be expected if both the PNA and RSNA bursts were generated by disinhibition of a common population of neurons within the colliculi, because postganglionic sympathetic nerve fibers are unmyelinated (35) and have a slower conduction velocity than myelinated axons of phrenic motoneurons (49). There do not appear to be any direct projections to the renal sympathetic preganglionic or phrenic motoneurons in the spinal cord from the superior or inferior colliculi (43, 56), and so effects on

these outputs must be mediated via other central neurons, labeled S and R respectively, in Fig. 9.

Bursts of RSNA sometimes occurred without bursts of PNA, although the reverse was never observed. A possible explanation for this is that the central sympathetic neurons that receive inputs from the command neurons in the colliculi have a lower threshold for firing than the respiratory neurons that also receive inputs from the command neurons, as depicted in Fig. 9.

It is well known that there are links between the respiratory pattern generator that is responsible for the regular ongoing respiratory rhythm and central neurons driving sympathetic activity (2, 29, 30, 44). It could therefore be suggested that the proposed “command neurons” may simply provide an input to the respiratory pattern generator, and thus indirectly generate an increase in sympathetic activity via the normal coupling between the respiratory pattern generator and sympathetic outflow. There are three observations that suggest, however, that this is unlikely to be the underlying mechanism. First, the irregular bursts of PNA that were associated with bursts of RSNA occurred at different times in the normal respiratory

cycle, even though they occurred most frequently just after the preceding peak of a regular PNA burst. Thus they appear to be generated by a different mechanism to that which drives the normal respiratory cycle. Second, in many cases the amplitude of the irregular bursts of PNA was moderate but was nevertheless associated with a marked increase in RSNA (e.g., Fig. 4B). Third, and most importantly, in the experiments in which the rats were paralyzed and artificially ventilated (e.g., Fig. 8B), the irregular bursts of PNA were clearly distinct from the preceding normal regular PNA burst. In these cases, the amplitude of the irregular bursts was similar to those of the regular bursts, but it was only the irregular bursts that were associated with synchronized bursts of RSNA. We therefore conclude that the synchrony between PNA and RSNA bursts is due to a mechanism that is separate to the respiratory-sympathetic coupling that occurs during normal breathing. In our model, therefore, we propose that the respiratory neurons that drive PNA in response to inputs from the putative command neurons do so independently of the respiratory pattern generator (Fig. 9).

An interesting feature of the bursts of RSNA, whether or not they were accompanied by synchronous bursts of PNA, is that each burst was immediately followed by a period of 1–2 s during which the level of RSNA was greatly reduced compared with the baseline level that immediately preceded the onset of the burst. It has been shown that strong activation of sympathetic preganglionic neurons has a depressant effect on their excitability, such that the neurons may become inactive for a period of some seconds (51). This phenomenon would therefore explain our observation that RSNA was markedly depressed following each intense burst of activity. The functional significance of this phenomenon of postexcitatory depression is unclear, although it has been suggested that sympathetic preganglionic neurons may act as a low-pass filter, such that the output of these neurons matches the properties of the effectors (e.g., vascular smooth muscle) that are unable to respond to high-frequency stimulation (51).

As is also described above, the synchronized bursts of RSNA and PNA tended to occur most frequently immediately after a normal regular PNA burst, during the normal postinspiratory period. This occurred both in spontaneously breathing rats and in artificially ventilated vagotomized rats, in which afferent feedback from the lungs was eliminated. This suggests that the command neurons driving the synchronized bursts of RSNA and PNA receive an input from the respiratory pattern generator, such that the probability of their firing is increased during the normal postinspiratory period. Therefore, as depicted in Fig. 9, we propose that these command neurons receive at least three inputs: 1) a tonic GABAergic inhibitory input, 2) a tonic excitatory input that evokes powerful activation of these neurons when the tonic inhibitory input is blocked, and 3) a modulatory input arising from the respiratory pattern generator, as described above. The sources of the proposed tonic inhibitory and excitatory inputs to the colliculi are unknown. There is also little information available in regard to putative modulatory inputs to the colliculi from the respiratory pattern generator, although there is an afferent input to the deep and intermediate layers of the superior colliculus from the rostral ventral respiratory cell group in the medulla (28), which could conceivably serve this function.

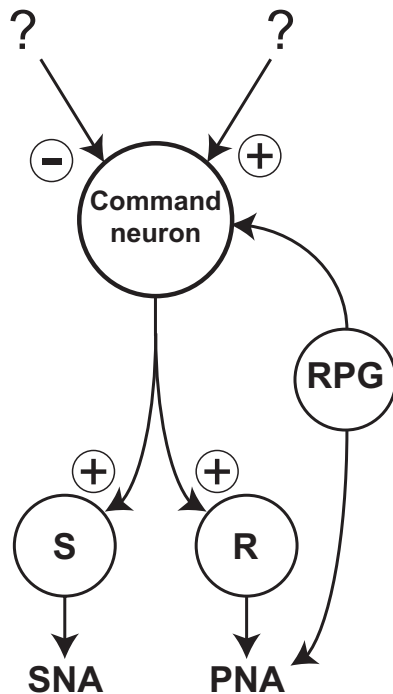


Fig. 9. Schematic diagram showing proposed connections generating synchronized RSNA/PNA responses. The lines with arrows indicate proposed connections that could be either direct (monosynaptic) or indirect (polysynaptic). The neuron labeled S regulates the sympathetic outflow, whereas the neuron labeled R regulates phrenic nerve activity. It is proposed that these neurons receive inputs from a common population of neurons, labeled command neurons, located within the superior and inferior colliculi. It is also proposed that the command neurons in turn receive a tonic inhibitory input (indicated by the $-$ sign), as well as excitatory inputs (indicated by $+$ signs) from neurons that generate the normal respiratory rhythm (i.e., the respiratory pattern generator, RPG) as well as other excitatory inputs from an unknown source(s). The input from the RPG could increase the probability of firing of command neurons during the inspiratory or postinspiratory phase and thus account for the greater frequency of RSNA and PNA bursts during that phase of the normal respiratory cycle. Finally, it is proposed that the S neurons have a lower threshold of firing than the R neurons, which would account for the fact that RSNA bursts can occur without synchronous bursts of PNA bursts, whereas the reverse was not observed.

Central pathways subserving sympathetic/respiratory responses from the midbrain colliculi. The projections of the superior colliculus have been studied primarily with respect to their control of motor functions related to orienting and escape behavior (19, 26). These projections appear to be organized into separate output channels, each with their specific targets and afferent inputs (19). There are descending projections to the pontomedullary reticular nuclei, but these are largely medial and do not appear to include nuclei known to control sympathetic or respiratory function, such as the rostral ventrolateral medulla or the dorsal and ventral respiratory groups (53). On the other hand, it is interesting to note that there is a projection to the midbrain PAG (25, 53), including a significant projection to its dorsolateral portion that regulates sympathetic and respiratory activity (34, 59). In addition, there is a projection to the lateral hypothalamus (23) that may also regulate sympathetic and respiratory outputs. Previous studies have indicated that cardiovascular and respiratory responses evoked from the dorsolateral PAG are mediated by ascending projections to the dorsomedial hypothalamus (20, 33). In the present study, as well as previous studies (8, 39, 40) in which cardiovascular and/or respiratory responses to stimulation of the colliculi have been measured, decerebration was not performed, and so the possibility remains that cardiovascular and respiratory responses evoked from the superior and inferior colliculi are mediated by ascending projections to the hypothalamus, either directly or via neurons in the dorsolateral PAG.

Similarly, most studies of the outputs from the inferior colliculus have focused on its role in auditory processing (e.g., Refs. 3, 11), and there is little information available concerning possible pathways by which neurons in the inferior colliculus could regulate sympathetic or respiratory function. There is a strong projection from the inferior to the superior colliculus, however (27), and it is conceivable that this projection is linked to the neurons within the superior colliculus that regulate the sympathetic and respiratory outputs. Clearly, however, further detailed studies are required to identify the output pathways from both the superior and inferior colliculi that are responsible for synchronized activation of sympathetic and respiratory activity.

Perspectives and Significance

Studies in conscious rats have shown that disinhibition of sites within the central and external nuclei of the inferior colliculus and the deep layers of the superior colliculus evokes a defensive behavioral response (5, 6, 8, 19). Our finding that neurons within this region can evoke a highly synchronized sympathetic and respiratory response therefore raises the possibility that there may be a common population of command neurons within these regions that are capable of simultaneously driving somatomotor, cardiovascular, and respiratory responses as part of a generalized and highly coordinated defense reaction. Such a view is entirely compatible with the proposal by Redgrave and colleagues (19, 39, 40, 52–54) that neurons in the superior colliculus can generate both immediate orienting responses as well as defensive responses (including changes in cardiovascular and respiratory function) that are appropriate for an emergency, as well as the more recent proposal by Casseday and Covey (14) that neurons in the inferior colliculus trigger “fixed action patterns” appropriate for escape or pursuit.

The anatomical organization and functional properties of the mammalian superior colliculus are very similar to its homologue, the optic tectum, in reptiles (58), indicating that this system developed at an early stage in evolution. In a study in toads, Cordeiro de Sousa and Hoffmann (17) found that electrical stimulation of the optic tectum evoked an immediate increase in arterial pressure, HR, and respiratory activity, a response that was similar to that which occurs during naturally evoked avoidance behavior. Thus the mechanisms within the superior and inferior colliculi of the rat that can evoke synchronized sympathetic and respiratory activity may represent the mammalian homologue of a phylogenetically ancient defense system. Further studies will be required to determine the functional relationship between this system and the well-known defense systems in the hypothalamus and midbrain PAG (13, 22, 32, 38).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Assoc. Prof. Kevin Keay for very helpful discussions and comments on the manuscript.

GRANTS

This work was supported by grants from the National Health and Medical Research Council of Australia (to R. A. L. Dampney and J. Horiuchi), CAPES of Brazil (to F. C. F. M. -Ribeiro) and Fapemig and CNPq of Brazil (to M. A. P. Fontes).

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: K.I., F.C.d.F.M.-R., and J.H. performed experiments; K.I., F.C.d.F.M.-R., J.H., L.M.M., and R.A.L.D. analyzed data; K.I., F.C.d.F.M.-R., J.H., L.M.M., and R.A.L.D. interpreted results of experiments; K.I., F.C.d.F.M.-R., J.H., L.M.M., E.N., M.A.P.F., and R.A.L.D. edited and revised manuscript; K.I., F.C.d.F.M.-R., J.H., L.M.M., E.N., M.A.P.F., and R.A.L.D. approved final version of manuscript; J.H., E.N., M.A.P.F., and R.A.L.D. conception and design of research; R.A.L.D. prepared figures; R.A.L.D. drafted manuscript.

REFERENCES

1. **Abdeen OA, Taylor BK, Youngblood KL, Printz MP.** Peripheral beta adrenergic blockade modifies airpuff startle-induced heart rate responses. *J Pharmacol Exp Ther* 272: 282–289, 1995.
2. **Adrian ED, Bronk DW, Phillips G.** Discharges in mammalian sympathetic nerves. *J Physiol* 74: 115–133, 1932.
3. **Aparicio MA, Vinuela A, Saldana E.** Projections from the inferior colliculus to the tectal longitudinal column in the rat. *Neuroscience* 166: 653–664, 2010.
4. **Baudrie V, Tulen JH, Blanc J, Elghozi JL.** Autonomic components of the cardiovascular responses to an acoustic startle stimulus in rats. *J Auton Pharmacol* 17: 303–309, 1997.
5. **Brandão ML, Anseloni VZ, Pandossio JE, De Araujo JE, Castilho VM.** Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. *Neurosci Biobehav Rev* 23: 863–875, 1999.
6. **Brandão ML, Borelli KG, Nobre MJ, Santos JM, Albrechet-Souza L, Oliveira AR, Martinez RC.** GABAergic regulation of the neural organization of fear in the midbrain tectum. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 1299–1311, 2005.
7. **Brandão ML, Cardoso SH, Melo LL, Motta V, Coimbra NC.** Neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. *Neurosci Biobehav Rev* 18: 339–346, 1994.
8. **Brandão ML, Tomaz C, Borges PC, Coimbra NC, Bagri A.** Defense reaction induced by microinjections of bicuculline into the inferior colliculus. *Physiol Behav* 44: 361–365, 1988.
9. **Brandão ML, Troncoso AC, de Souza Silva MA, Huston JP.** The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to

- anxiety and stress: empirical and conceptual considerations. *Eur J Pharmacol* 463: 225–233, 2003.
10. Burgess DE, Hundley JC, Li SG, Randall DC, Brown DR. Multifiber renal SNA recordings predict mean arterial blood pressure in unanesthetized rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 273: R851–R857, 1997.
 11. Caicedo A, Herbert H. Topography of descending projections from the inferior colliculus to auditory brainstem nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 328: 377–392, 1993.
 12. Cardoso SH, Coimbra NC, Brandão ML. Defensive reactions evoked by activation of NMDA receptors in distinct sites of the inferior colliculus. *Behav Brain Res* 63: 17–24, 1994.
 13. Carrive P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behav Brain Res* 58: 27–47, 1993.
 14. Casseday JH, Covey E. A neuroethological theory of the operation of the inferior colliculus. *Brain Behav Evol* 47: 311–336, 1996.
 15. Casseday JH, Fremouw T, Covey E. The inferior colliculus: a hub for the central auditory system. In: *Integrative Functions in the Mammalian Auditory Pathway*, edited by Oertel D, Popper AN, Fay RR. New York: Springer-Verlag, 2002, vol. 15, p. 238–318.
 16. Cohen JD, Castro-Alamancos MA. Neural correlates of active avoidance behavior in superior colliculus. *J Neurosci* 30: 8502–8511, 2010.
 17. Cordeiro de Sousa MB, Hoffmann A. Autonomic adjustments during avoidance and orienting responses induced by electrical stimulation of the central nervous system in toads (*Bufo paracnemis*). *J Comp Physiol B* 155: 381–386, 1985.
 18. Dampney RAL, Horiuchi J, McDowall LM. Hypothalamic mechanisms coordinating cardiorespiratory function during exercise and defensive behaviour. *Auton Neurosci* 142: 3–10, 2008.
 19. Dean P, Redgrave P, Westby GW. Event or emergency? Two response systems in the mammalian superior colliculus. *Trends Neurosci* 12: 137–147, 1989.
 20. de Menezes RC, Zaretsky DV, Fontes MAP, DiMicco JA. Cardiovascular and thermal responses evoked from the periaqueductal grey require neuronal activity in the hypothalamus. *J Physiol* 587: 1201–1215, 2009.
 21. DiBona GF. Neural control of the kidney: functionally specific renal sympathetic nerve fibers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: R1517–R1524, 2000.
 22. DiMicco JA, Samuels BC, Zaretskaia MV, Zaretsky DV. The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. *Pharmacol Biochem Behav* 71: 469–480, 2002.
 23. Fallon JH, Moore RY. Superior colliculus efferents to the hypothalamus. *Neurosci Lett* 14: 265–270, 1979.
 24. Fontes MA, Tagawa T, Polson JW, Cavanagh SJ, Dampney RAL. Descending pathways mediating cardiovascular response from dorsomedial hypothalamic nucleus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H2891–H2901, 2001.
 25. Furigo IC, de Oliveira WF, de Oliveira AR, Comoli E, Baldo MV, Mota-Ortiz SR, Canteras NS. The role of the superior colliculus in predatory hunting. *Neuroscience* 165: 1–15, 2010.
 26. Gandhi NJ, Katnani HA. Motor functions of the superior colliculus. *Ann Rev Neurosci* 34: 205–231, 2011.
 27. Garcia Del Cano G., Gerrikagoitia I., Alonso-Cabria A., Martinez-Millan L. Organization and origin of the connection from the inferior to the superior colliculi in the rat. *J Comp Neurol* 499: 716–731, 2006.
 28. Gaytan SP, Pasaro R. Connections of the rostral ventral respiratory neuronal cell group: an anterograde and retrograde tracing study in the rat. *Brain Res Bull* 47: 625–642, 1998.
 29. Guyenet P. Cardiorespiratory integration. In: *Central Regulation of Autonomic Functions* (2nd ed), edited by Llewellyn-Smith I, Verberne A. New York: Oxford, 2011, p. 180–201.
 30. Häbler H-J, Jänig W, Michaelis M. Respiratory modulation in the activity of sympathetic neurones. *Prog Neurobiol* 43: 567–606, 1994.
 31. Heyer EJ, Nowak LM, Macdonald RL. Bicuculline: a convulsant with synaptic and nonsynaptic actions. *Neurology* 31: 1381–1390, 1981.
 32. Hilton SM. The defence-arousal system and its relevance for circulatory and respiratory control. *J Exp Biol* 100: 159–174, 1982.
 33. Horiuchi J, McDowall LM, Dampney RAL. Vasomotor and respiratory responses evoked from the dorsolateral periaqueductal grey are mediated by the dorsomedial hypothalamus. *J Physiol* 587: 5149–5162, 2009.
 34. Iigaya K, Horiuchi J, McDowall LM, Dampney RAL. Topographical specificity of regulation of respiratory and renal sympathetic activity by the midbrain dorsolateral periaqueductal gray. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299: R853–R861, 2010.
 35. Jänig W. Pre- and postganglionic vasoconstrictor neurons: differentiation, types, and discharge properties. *Ann Rev Physiol* 50: 525–539, 1988.
 36. Kabir MM, Beig MI, Baumert M, Trombini M, Mastorci F, Sgoifo A, Walker FR, Day TA, Nalivaiko E. Respiratory pattern in awake rats: effects of motor activity and of alerting stimuli. *Physiol Behav* 101: 22–31, 2010.
 37. Kanbar R, Orea V, Barres C, Julien C. Baroreflex control of renal sympathetic nerve activity during air-jet stress in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R362–R367, 2007.
 38. Keay KA, Bandler R. Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. *Neurosci Biobehav Rev* 25: 669–678, 2001.
 39. Keay KA, Dean P, Redgrave P. N-methyl D-aspartate (NMDA) evoked changes in blood pressure and heart rate from the rat superior colliculus. *Exp Brain Res* 80: 148–156, 1990.
 40. Keay KA, Redgrave P, Dean P. Cardiovascular and respiratory changes elicited by stimulation of rat superior colliculus. *Brain Res Bull* 20: 13–26, 1988.
 41. Kenney MJ, Weiss ML, Patel KP, Wang Y, Fels RJ. Paraventricular nucleus bicuculline alters frequency components of sympathetic nerve discharge bursts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H1233–H1241, 2001.
 42. Li SG, Lawler JE, Randall DC, Brown DR. Sympathetic nervous activity and arterial pressure responses during rest and acute behavioral stress in SHR versus WKY rats. *J Auton Nerv Syst* 62: 147–154, 1997.
 43. Lois JH, Rice CD, Yates BJ. Neural circuits controlling diaphragm function in the cat revealed by transneuronal tracing. *J Appl Physiol* 106: 138–152, 2009.
 44. Malpas GS. The rhythmicity of sympathetic nerve activity. *Prog Neurobiol* 56: 65–96, 1998.
 45. McDowall LM, Horiuchi J, Dampney RAL. Effects of disinhibition of neurons in the dorsomedial hypothalamus on central respiratory drive. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R1728–R1735, 2007.
 46. Paton JF, Boscan P, Pickering AE, Nalivaiko E. The yin and yang of cardiac autonomic control: vago-sympathetic interactions revisited. *Brain Res Rev* 49: 555–565, 2005.
 47. Paton JF, Nalivaiko E, Boscan P, Pickering AE. Reflexly evoked coactivation of cardiac vagal and sympathetic motor outflows: observations and functional implications. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33: 1245–1250, 2006.
 48. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Oxford, UK: Elsevier, 2004.
 49. Pickering M, Jones JF. Comparison of the motor discharge to the crural and costal diaphragm in the rat. *Respir Physiol Neurobiol* 159: 21–27, 2007.
 50. Pollack GD, Xie R, Gittelman JX, Andoni S, Li N. The dominance of inhibition in the inferior colliculus. *Hearing Res* 274: 27–39, 2011.
 51. Polosa C. The silent period of sympathetic preganglionic neurons. *Can J Physiol Pharmacol* 45: 1033–1045, 1967.
 52. Redgrave P, Dean P, Mitchell IJ, Odekunle A, Clark A. The projection from superior colliculus to cuneiform area in the rat. I. Anatomical studies. *Exp Brain Res* 72: 611–625, 1988.
 53. Redgrave P, Mitchell IJ, Dean P. Descending projections from the superior colliculus in rat: a study using orthograde transport of wheatgerm-agglutinin conjugated horseradish peroxidase. *Exp Brain Res* 68: 47–167, 1987.
 54. Redgrave P, Mitchell IJ, Dean P. Further evidence for segregated output channels from superior colliculus in rat: ipsilateral tecto-pontine and tecto-cuneiform projections have different cells of origin. *Brain Res* 413: 170–174, 1987.
 55. Shaffer JP. Modified sequentially rejective multiple test procedures. *J Am Stat Assoc* 81: 826–831, 1986.
 56. Sly JD, Colvill L, McKinley MJ, Oldfield JB. Identification of neural projections from the forebrain to the kidney, using the virus pseudorabies. *J Auton Nerv Syst* 77: 73–82, 1999.
 57. Stein BE. Neural mechanisms for synthesizing sensory information and producing adaptive behaviors. *Exp Brain Res* 123: 124–135, 1998.
 58. Stein BE, Gaither NS. Sensory representation in reptilian optic tectum: some comparisons with mammals. *J Comp Neurol* 202: 69–87, 1981.
 59. Subramanian HH, Balnave RJ, Holstege G. The midbrain periaqueductal gray control of respiration. *J Neurosci* 28: 12274–12283, 2008.

Disinhibition of the midbrain colliculi unmasks coordinated autonomic, respiratory, and somatomotor responses to auditory and visual stimuli

Flávia C. F. Müller-Ribeiro,^{1,2} Roger A. L. Dampney,³ Simon McMullan,¹ Marco A. P. Fontes,² and Ann K. Goodchild¹

¹Australian School of Advanced Medicine, Macquarie University, New South Wales, Australia; and ²Laboratório de Hipertensão, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil; and ³School of Medical Sciences (Physiology) and Bosch Institute, University of Sydney, New South Wales, Australia

Submitted 24 April 2014; accepted in final form 4 August 2014

Müller-Ribeiro FC, Dampney RA, McMullan S, Fontes MA, Goodchild AK. Disinhibition of the midbrain colliculi unmasks coordinated autonomic, respiratory, and somatomotor responses to auditory and visual stimuli. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 307: R1025–R1035, 2014. First published August 6, 2014; doi:10.1152/ajpregu.00165.2014.—The midbrain superior and inferior colliculi have critical roles in generating coordinated orienting or defensive behavioral responses to environmental stimuli, and it has been proposed that neurons within the colliculi can also generate appropriate cardiovascular and respiratory responses to support such behavioral responses. We have previously shown that activation of neurons within a circumscribed region in the deep layers of the superior colliculus and in the central and external nuclei of the inferior colliculus can evoke a response characterized by intense and highly synchronized bursts of renal sympathetic nerve activity and phrenic nerve activity. In this study, we tested the hypothesis that, under conditions in which collicular neurons are disinhibited, coordinated cardiovascular, somatomotor, and respiratory responses can be evoked by natural environmental stimuli. In response to natural auditory, visual, or somatosensory stimuli, powerful synchronized increases in sympathetic, respiratory, and somatomotor activity were generated following blockade of GABA_A receptors in a specific region in the midbrain colliculi of anesthetized rats, but not under control conditions. Such responses still occurred after removal of most of the forebrain, including the amygdala and hypothalamus, indicating that the essential pathways mediating these coordinated responses were located within the brain stem. The temporal relationships between the different outputs suggest that they are driven by a common population of “command neurons” within the colliculi.

command neuron; defensive behavior; arterial pressure; sympathetic activity; phrenic nerve activity

DETECTION OF DANGER GENERATES rapid and integrated behavioral and physiological responses that facilitate an animal’s survival. The superior colliculus (SC) has a critical role in generating highly coordinated orienting, defensive, or escape behavioral responses to visual, auditory, and/or somatosensory stimuli that require immediate action (6, 8, 10). Similarly, the inferior colliculus (IC), which receives convergent signals from auditory nuclei in the brain stem, also has a critical role in mediating appropriate behavioral responses to auditory signals, via projections to the SC (3). Microinjection of the GABA_A receptor antagonist picrotoxin into the colliculi of conscious animals can evoke defensive or escape responses to otherwise

innocuous stimuli (2, 4, 8), indicating that tonic GABAergic input to the region normally inhibits such responses.

It would be expected that immediate escape or defensive behaviors are supported by appropriate cardiovascular and respiratory responses. Stimulation of neurons in the SC can evoke increases in blood pressure, heart rate, and respiratory activity (23, 24), and recently, we reported that activation of neurons within a specific region within the colliculi evokes highly synchronized increases in renal sympathetic nerve activity, blood pressure, and respiratory activity in anesthetized rats (17). This observation raises the possibility that such synchronized autonomic and respiratory effects are part of a more generalized response that includes increases in somatomotor activity, such as might occur during escape or defensive reactions generated by activation of neurons within this collicular region. If so, it would be predicted that natural alerting stimuli (i.e., visual, auditory, and/or somatosensory stimuli) could trigger a coordinated somatomotor, autonomic, and respiratory response under conditions in which the tonic GABAergic inhibition of collicular neurons that generate such responses is removed. In this study, we tested the hypothesis that blockade of GABAergic input to the collicular region, as identified in our previous study (17), would permit natural alerting stimuli to activate command neurons that simultaneously drive cardiorespiratory and somatomotor outputs in anesthetized rats.

MATERIALS AND METHODS

General procedures. Experiments were performed on a total of 29 adult male Sprague-Dawley rats (330–600 g) supplied by the Animal Resources Centre (Perth, Australia). All experimental procedures were approved by the Animal Ethics Committee of Macquarie University and carried out in accordance with the Australian code of practice for the care and use of animals for scientific purposes. Anesthesia was induced by intraperitoneal injection of 10% urethane (1.3 g/kg body wt) and maintained at surgical depth throughout the experiments, with supplemental urethane added when required. An adequate level of anesthesia before neuromuscular blockade was assessed by the absence of a corneal reflex and changes in breathing and blood pressure in response to strong hind paw pinch, and after neuromuscular blockade by the absence of heart rate and blood pressure responses to paw pinch. The right femoral artery and vein were cannulated for arterial pressure measurement and drug administration, respectively. A tracheostomy was performed to ensure clear airways and to permit artificial ventilation. All rats were bilaterally vagotomized, paralyzed (pancuronium bromide, 2 mg/ml, induction: 0.4 ml iv; maintenance: 0.2 ml/h iv; Astra Pharmaceuticals, Sydney, Australia), and artificially ventilated with room air plus additional O₂

Address for reprint requests and other correspondence: R. A. L. Dampney, School of Medical Sciences (Physiology) and Bosch Institute, Univ. of Sydney, NSW 2006, Australia (e-mail: roger.dampney@sydney.edu.au).

at a rate that maintained end-tidal CO₂ levels within the range of 3.5–4.5%. Arterial blood gases were measured once the preparation was complete and once or twice during the experiment to ensure appropriate ventilation. Core temperature was measured with a rectal probe and maintained at 37°C with a homoeothermic blanket. The left greater splanchnic nerve was exposed using a retroperitoneal incision, and the left phrenic nerve was exposed via a dorsolateral approach, as previously described (32, 37). The sciatic nerve was exposed at mid thigh from a dorsolateral approach, the biceps femoris muscle was separated from the vastus lateralis muscle, and the nerve was then dissected. All nerves were carefully isolated from surrounding tissues, cut distally, placed on bipolar electrodes, and immersed in mineral oil. Signals from splanchnic, phrenic, and sciatic nerves were amplified, filtered (0.1–3-kHz bandpass), and sampled (2 kHz) with a Power 1401plus and Spike 2 software (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK). The mean arterial pressure (MAP) and heart rate signals were derived from the pulsatile arterial pressure signal and recorded on a computer using Spike 2 software. The head was placed in a stereotaxic frame with the incisor bar fixed 3.3 mm below the interaural line. Blunt ear bars were used, and care was taken to ensure that the tympanic membrane was not punctured. A small area of the dorsal surface of the brain was exposed to allow insertion of micropipettes into the SC and IC.

Decerebrate preparation. A precollicular decerebration was performed in four rats anesthetized with urethane. Briefly, two round holes were drilled in the skull on both sides to allow access to the brain. The dura was then incised, and a transection above the colliculi was made using a fine forceps. A suction system was then used to remove the brain tissue above the level of the transection. The internal carotid arteries were not ligated. During suction of the tissue, arterial pressure was lowered by pentobarbital sodium infusion (13 mg/kg, 5 ml iv at a rate of 1 ml/min) to reduce bleeding.

Drug microinjection. Microinjections of the GABA_A receptor antagonist picrotoxin (50 pmol in 50 nl; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) or bicuculline methiodide (50 pmol in 50 nl; Tocris) were made into sites in the SC and IC using a glass micropipette held vertically in a micromanipulator. We have previously shown that a 50-pmol dose of bicuculline was effective in evoking cardiorespiratory responses from restricted sites within the colliculi (17). The same dose (50 pmol) of picrotoxin was selected on the basis of previous studies showing that equal or similar doses of bicuculline or picrotoxin evoked responses of similar magnitude when injected into the brain or spinal cord (12, 45). In all cases, the injectate was 10 mM PBS adjusted to pH 7.4 and also contained rhodamine beads (0.5% FluoSpheres) for later histological verification of microinjection sites. At the end of each experiment, the rat was euthanized with an overdose of potassium chloride (KCl, 3 M, 1 ml iv). The brain was removed, and after fixation in 4% paraformaldehyde solution, coronal brain sections (100 μm) were cut on a vibrating microtome and mounted onto gelatinized glass slides. Injection sites were determined using a fluorescence microscope and mapped using the atlas of Paxinos and Watson (38) as a reference. In experiments in which decerebration was performed, horizontal or sagittal brain sections (100 μm) were cut and stained using cresyl violet to determine the level of decerebration.

Experimental procedures. Natural stimuli were tested in all experiments before and after microinjection of picrotoxin or bicuculline into sites in the SC or IC. Three different stimulus modalities were used: auditory, visual, and somatosensory. The auditory stimulus consisted of a hand clap made ~30 cm from the animal. In a separate test, a wide-band microphone (B&K 4138 1/8 inch microphone 20 Hz to 160 kHz) and measuring amplifier (B&K 2610) were used to record the sound generated by typical claps as used in the experiment, made at the same distance (30 cm) from the microphone. The output of the recorded signal was digitized at 96 kHz (Edirol UA25EX), and spectral analysis was performed using MatLab (Mathworks, version 7.11). Assuming that the ear bars resulted in an attenuation of 40 dB (which is greater than the attenuation produced by industrial ear

plugs), the amplitude of the sound after attenuation was 30–40 dB greater than the audiometric threshold for the rat over the frequency range 8 kHz to 30 kHz, which corresponds to the frequency range at which rats hear best (14). The visual stimulus consisted of a bright light with a duration of 3 s directed to both eyes from a distance of ~20 cm, while the somatosensory stimulus was a hard pinch, with a duration of ~2 s, applied by forceps to a hind paw.

For picrotoxin microinjections into the colliculi, the tip of the micropipette was positioned stereotaxically at rostrocaudal levels ranging from 7.1 to 8.6 mm caudal to bregma in tracks located 1.0 to 2.5 mm lateral to the midline and a depth varying from 4.0 to 6.0 mm ventral to bregma, according to the atlas of Paxinos and Watson (38). In each track, injections were made into sites 0.5 mm apart, starting at the most dorsal site. Once the most ventral site in each track was reached, the micropipette was placed in a new track that was 0.5 mm lateral, medial, rostral, or caudal to the previous track. Injections were applied by pressure, and the volume of each injection measured by movement of the meniscus against a grid corresponding to 20-nl volumes monitored using an operating microscope. The number of injection sites in each experiment varied between 2 and 14. The sites into which microinjections were made included the region in which, as mapped previously, microinjection of bicuculline evoked synchronized bursts of renal sympathetic nerve activity and phrenic nerve activity (PNA) (17). If a natural stimulus evoked a response following picrotoxin microinjection, there was a waiting period of at least 30 min before the next picrotoxin microinjection. In experiments in which decerebration was performed, the procedure was the same except that 1) bicuculline was microinjected instead of picrotoxin, 2) only auditory stimuli were applied, 3) the procedure of bicuculline microinjection followed by application of auditory stimuli was performed before and after decerebration, and 4) PNA was not recorded in three of the four experiments.

Data analysis. Natural stimuli evoked synchronized bursts of splanchnic nerve activity (SpSNA), PNA, and sciatic nerve activity (ScNA) after GABA receptor blockade at many sites in the colliculi. At some of these sites, the stimulus was repeated several times, so that cycle-triggered averaging could be used to determine the time relationships between the bursts of SpSNA, PNA, and ScNA and the associated changes in MAP evoked by an auditory, visual, or somatosensory stimulus. For cycle-triggered averaging, the recorded digitized SpSNA, PNA, and ScNA signals were first rectified and then integrated (time constant 20 ms). For each stimulus, the onset of the evoked SpSNA burst was first identified, and then samples of the signals for all four simultaneously recorded variables (integrated SpSNA, integrated PNA, integrated ScNA, and MAP) were taken over the period from 2.5 s before to 2.5 s after this trigger point (200 samples/s) (e.g., Fig. 3B). This process was done for 4–19 stimuli, and the average of these sweeps was calculated for all four variables. The time point of the onset of increases in these averaged integrated SpSNA, PNA, and ScNA signals was then identified, in each case, as the point at which 1) the value of averaged signal increased, relative to the immediately preceding value, by an amount that was greater than twice the standard deviation of the preceding 10 values, and 2) the averaged signal continued to increase thereafter toward the peak value.

Cycle-triggered averaging was also used to compare the magnitudes of the increases in MAP and of the bursts of SpSNA and PNA (expressed relative to their baseline levels of activity) evoked by the auditory, visual, and somatosensory stimuli. For this purpose, at each site at which cycle-triggered averaging was performed, the maximum increases in the averaged MAP, integrated SpSNA, and integrated PNA variables, relative to their respective prestimulus baseline levels, were measured. The prestimulus baseline level was, in each case, the mean value of the averaged variable over the time period from 2.5 to 0.5 s before the stimulus. The magnitude of the integrated ScNA burst amplitude could not be measured in this way, however, because there was no detectable baseline ScNA activity above the noise level.

A paired *t*-test was used to determine whether the time differences between the onsets of the increases in 1) SpSNA and PNA and 2) SpSNA and ScNA evoked by auditory or visual stimuli were significantly different from zero. An unpaired *t*-test was then used to determine whether these time differences were significantly different from each other and also whether they were significantly different when responses were evoked by a visual stimulus compared with those evoked by an auditory stimulus. An unpaired *t*-test was also used to determine whether the magnitudes of the evoked increases in MAP, SpSNA, or PNA were significantly different when evoked by the different stimuli. *P* values of <0.05 were taken as statistically significant.

RESULTS

Responses to auditory, visual, and somatosensory stimuli, following picrotoxin microinjection into the colliculi. Under baseline conditions, before injection of picrotoxin into sites in the colliculi, no changes in SpSNA, PNA, or ScNA were evoked by auditory (clap: Fig. 1A), visual (light flash), or somatosensory (pinch) stimuli in urethane-anesthetized, vagotomized, paralyzed, and artificially ventilated rats. However, following microinjection of picrotoxin (50 pmol/50 nl) at 57 out of 124 sites in the midbrain colliculi, one or more of these stimuli triggered immediate and coordinated activation of SpSNA and PNA, followed by increases in arterial pressure (Fig. 1A, B). At most (37 out of 57) of these positive sites, the picrotoxin microinjection itself had no effect on the baseline levels of SpSNA, PNA, or ScNA, and variable effects at the remaining 20 sites (either a transient response or a more sustained modest response). At seven positive sites, after picrotoxin microinjection, synchronized bursts of SpSNA and PNA also occurred spontaneously, in addition to the stimulus-evoked synchronized bursts (Fig. 2A).

After picrotoxin injection, the auditory stimuli evoked a response at 96% of the positive sites, while the visual and somatosensory stimuli evoked responses at 46 and 40%, respectively, of the positive sites at which they were tested. The somatosensory stimulus (pinch) was applied to the hind paw on one side only, but responses to this stimulus were obtained after picrotoxin microinjections into sites in either the ipsilateral or contralateral colliculi. All three types of stimuli evoked responses in 9 of the 35 positive sites in which all three were tested (e.g., Fig. 1A). At all 57 positive sites, increases in both SpSNA and PNA were always evoked. The sympathetic and respiratory responses to alerting stimuli were also accompanied by a somatomotor response (increase in ScNA) at 30 of the 42 positive sites in which ScNA was also measured (Fig. 1, A and B).

Magnitudes of the evoked responses. At sites at which cycle-triggered averaging was performed, the magnitudes of the averaged responses evoked by clap, light, or pinch were determined (Fig. 3). As shown in Fig. 4, the three different stimuli evoked increases in the averaged MAP and in the amplitudes of the SpSNA and PNA bursts that were of similar magnitude for all stimuli. Changes in heart rate were also evoked, but these were very small (<20 beats/min), probably because the rats were vagotomized. A pairwise comparison (clap vs. light, clap vs. pinch, and light vs. pinch) revealed no significant difference in the magnitudes of the evoked increases in MAP, or in the averaged SpSNA and PNA burst amplitudes ($P > 0.5$ in all cases).

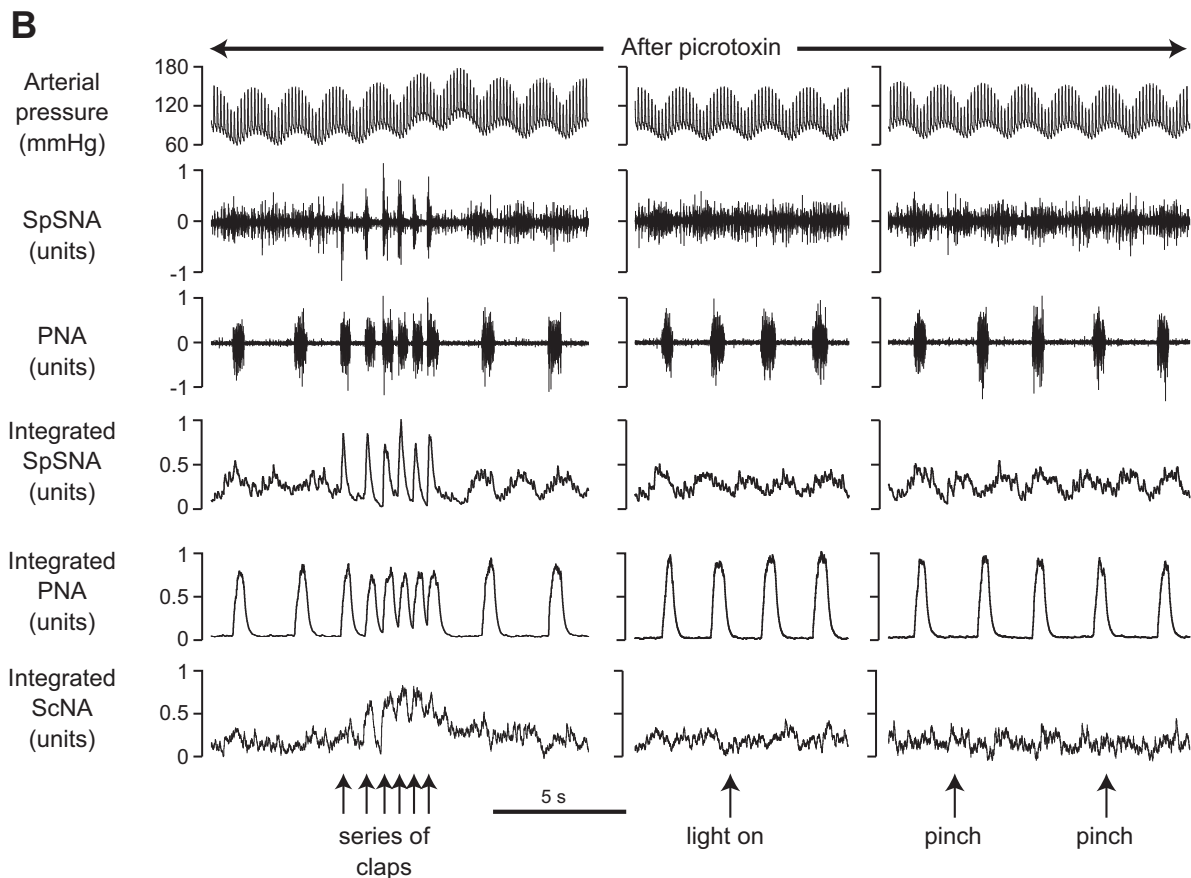
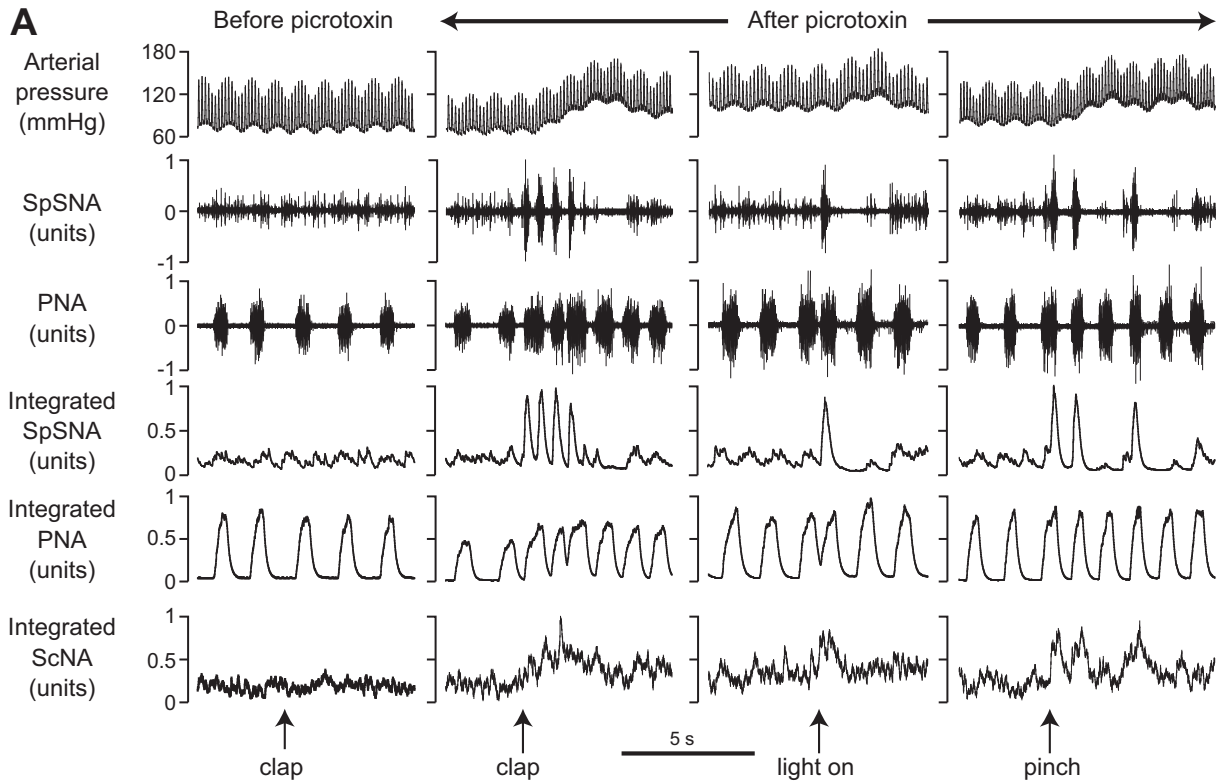
Time relationships of the evoked responses. The most striking feature of the responses to natural sensory stimuli was the tight synchronization of the recorded sympathetic, respiratory, and somatomotor responses (Fig. 3). Using cycle-triggered averaging, we found that the onsets of the PNA and ScNA responses to the auditory stimuli consistently preceded the onset of the SpSNA response (Fig. 3C) by 26.0 ± 2.7 and 41.7 ± 2.7 ms, respectively (Fig. 5). Similarly, the onsets of the PNA and ScNA responses to the visual stimuli preceded the onset of the SpSNA response by 30.0 ± 4.2 and 48.3 ± 4.4 ms, respectively (Fig. 5). These time differences were in all cases significantly different from zero, for both the visual and auditory evoked responses ($P < 0.001$). Furthermore, the time difference between the onsets of the ScNA and SpSNA responses was greater than that between the onsets of the PNA and SpSNA responses, when either auditory or visual stimuli were applied ($P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively; Fig. 5). Thus, following either an auditory or visual stimulus, the ScNA response occurred first followed by the PNA response and then the SpSNA response. The latencies of the SpSNA responses relative to the PNA or ScNA responses, however, were not significantly different when the effects of auditory and visual stimuli were compared ($P > 0.3$ in both cases; Fig. 5).

Location of positive sites. The centers of the 57 positive sites were located predominantly within the deep layers of the SC and the external and central nuclei of the IC, with a few sites in the adjacent lateral periaqueductal gray and precuneiform nucleus (Fig. 6). The midbrain region, identified previously as a region capable of evoking synchronized sympathetic/respiratory responses (17), contained virtually all the positive response sites identified in the present study.

Effects of decerebration. To determine whether forebrain regions were essential for the expression of cardiovascular and respiratory responses to alerting stimuli, we examined the effects of decerebration ($n = 4$). In all of these experiments, we first confirmed that, before decerebration, responses to auditory stimuli could be evoked after disinhibition of a site in the SC or IC. Following removal of most of the forebrain (Fig. 7C), including the prefrontal cortex, amygdala, auditory cortex, and dorsomedial, perifornical, and lateral hypothalamus, auditory stimuli still evoked bursts of SpSNA after (but not before) collicular disinhibition in all four experiments. In one of these experiments PNA was also recorded, and in this case, the stimuli also evoked bursts of PNA that were highly synchronized with the bursts of SpSNA (e.g., Fig. 7, A and B). As previously reported (17), bursts of SpSNA and PNA also occurred spontaneously after bicuculline injection (Fig. 2B), in addition to the stimulus-evoked synchronized bursts.

DISCUSSION

The main finding of the present study is that disinhibition of neurons within parts of the SC and IC permits the production of highly synchronized sympathetic, respiratory, and somatomotor responses to different sensory stimuli. Such responses are suppressed under baseline conditions in anesthetized rats. In this DISCUSSION, we shall consider 1) whether these responses are driven by a common population of command neurons in the colliculi, 2) the central circuitry that subserves these responses, and 3) the physiological significance of our findings. First, however, we will consider some methodological issues.



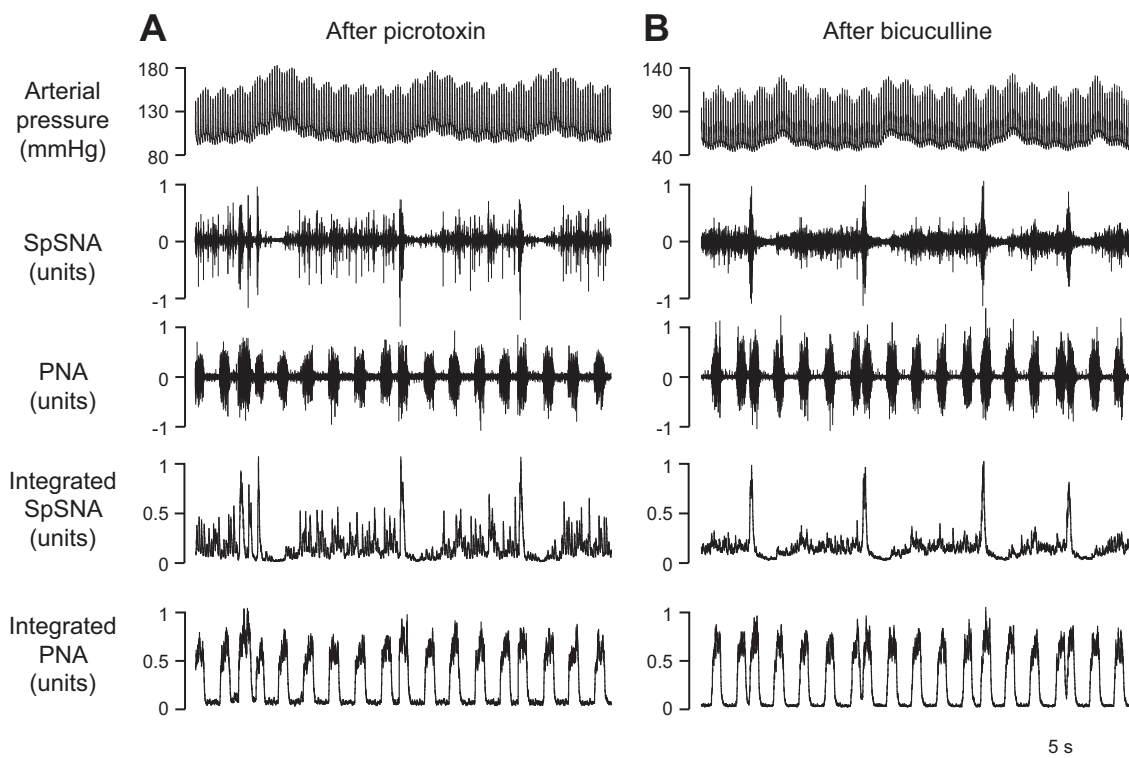


Fig. 2. Examples of recordings from two different experiments showing spontaneously occurring synchronized bursts of SpSNA and PNA following microinjection of picrotoxin (A) and bicuculline (B) into the midbrain colliculi.

Methodological considerations. The auditory stimulus was a hand clap, made ~30 cm from the animal. The rat was placed in atraumatic ear bars, such that the tympanic membrane was not punctured. The presence of ear bars would have reduced the amplitude of the auditory signal, but as described in the MATERIALS AND METHODS, measurements of the intensity and power spectra of hand claps indicated that the amplitude of the sound would have exceeded the auditory threshold, even allowing for the attenuating effect of the ear bars. Furthermore, the fact that responses were evoked by the auditory stimuli demonstrates that the signal was not eliminated. We did not systematically examine the relationship between the magnitude of the auditory stimulus and the magnitude of the evoked responses, although in some experiments, softer and louder handclaps were made. In those cases, there was no discernible effect of stimulus strength on the magnitude of the evoked responses, suggesting that the responses were “all-or-nothing” rather than graded. Similarly, visual or somatosensory stimuli either evoked a clear response or no response at all.

The sciatic nerve contains sympathetic postganglionic fibers, as well as somatomotor fibers (43), but two lines of evidence indicate that the recorded evoked responses in this nerve represent increased somatomotor activity. First, the onset of the evoked ScNA responses to auditory and visual stimuli preceded the onset of the SpSNA responses by 41.7 ± 2.7 and 48.3 ± 4.4 ms, respectively (Fig. 5), consistent with a response

mediated by fast-conducting myelinated somatomotor fibers rather than slow-conducting unmyelinated sympathetic postganglionic fibers. Second, unlike SpSNA, there was no detectable resting level of ScNA, which would be expected if sympathetic activity were being recorded. Although we cannot rule out the possibility that increased sympathetic activity may have contributed to the ScNA response, we believe that this response predominantly reflects increased somatomotor nerve activity.

The auditory and visual stimuli were bilateral, but the somatosensory stimulus was applied to the hind paw on one side only. Responses to this stimulus, however, were obtained after picrotoxin microinjections into sites in either the ipsilateral or contralateral colliculi, showing that unilateral disinhibition of collicular neurons was capable of unmasking responses to somatosensory inputs originating from either the ipsilateral or contralateral side. Consistent with this, anatomical studies have shown that somatosensory inputs project bilaterally to the superior colliculus (50) and that there are also extensive interconnections between the right and left sides of the superior colliculi (20, 21).

Following picrotoxin microinjection into seven sites (out of a total of 124 sites), synchronized bursts of SpSNA and PNA also occurred spontaneously (i.e., in the absence of auditory or other stimuli). In contrast, in a previous study from our laboratory (17), such spontaneous synchronized bursts of SpSNA

Fig. 1. Cardiovascular, respiratory, and somatomotor responses evoked by different stimuli after microinjection of picrotoxin into the midbrain colliculi. A: example in which all three stimuli evoked responses in splanchnic nerve activity (SpSNA), phrenic nerve activity (PNA), and sciatic nerve activity (ScNA) after, but not before, picrotoxin microinjection. B: example in which only the auditory stimulus (series of claps) evoked responses after picrotoxin microinjection.

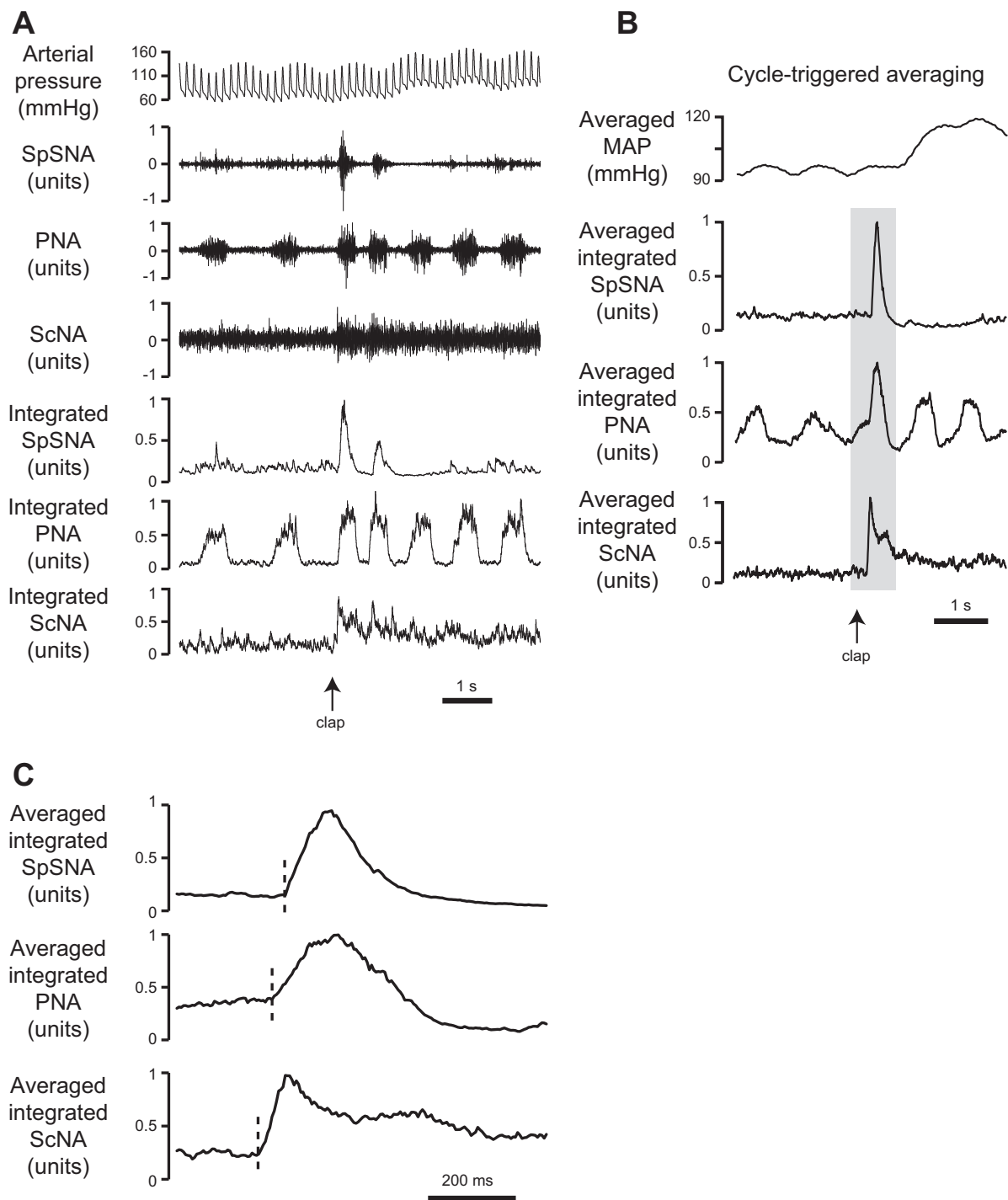


Fig. 3. Cycle-triggered averaging of stimulus-evoked responses. *A*: example of bursts of SpSNA, PNA, and ScNA evoked by a single clap. *B*: average of 10 responses, including the response shown in *A*, evoked by single claps following picrotoxin microinjection into one site in the colliculi. *C*: portion of the averaged response (indicated by shaded portion in *B*), showing that the onsets of the bursts of PNA and ScNA occurred slightly before the onset of the burst of SpSNA. The time of onset in each case is indicated by the vertical dashed line.

and PNA were evoked following microinjection of bicuculline methiodide at 55 out of a total of 129 sites. The fact that spontaneous synchronized bursts of SpSNA and PNA occurred more frequently following bicuculline injection compared with picrotoxin injection may be due to differences in the pharmacological properties of the two drugs. Apart from blocking

GABA_A receptors, bicuculline methiodide also blocks small-conductance calcium-activated potassium channels (28), which can potentiate *N*-methyl-D-aspartate-dependent burst firing in neurons (22). In contrast, picrotoxin does not have this effect (28). Therefore, under resting conditions, bicuculline methiodide may be more effective than picrotoxin in generating bursts

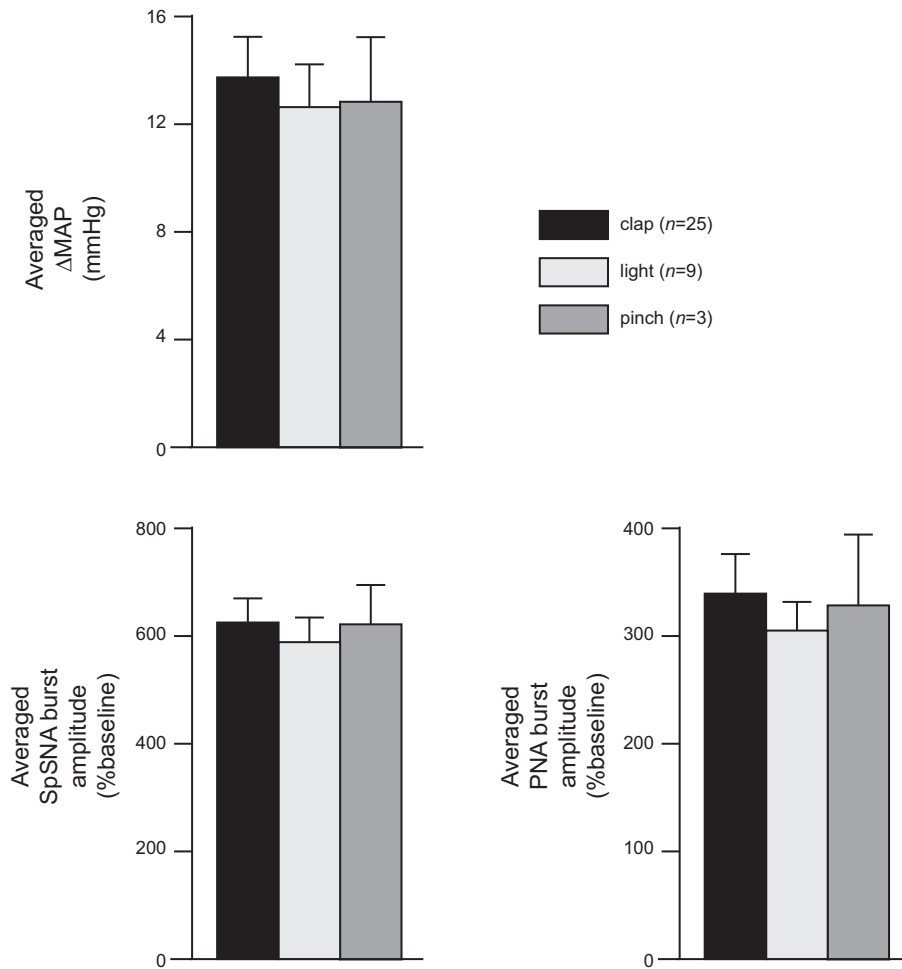


Fig. 4. Histogram showing the magnitudes (means \pm SE) of the increase in averaged MAP and the amplitudes of the averaged SpSNA and PNA bursts as determined from cycle-triggered averaging of the responses evoked by auditory (clap), visual (light), or somatosensory (pinch) stimuli. Note that the responses were of very similar magnitude, whether evoked by clap, light, or pinch.

of activity in collicular neurons that, in turn, generate synchronized bursts of SpSNA and PNA. Consistent with our observations, highly synchronized bursts of neural activity are reliably evoked by application of bicuculline methiodide to brain slices containing the thalamus, whereas these occur much less frequently following application of picrotoxin in the same preparation (28). Similarly, previous studies have also shown that injection of bicuculline into other regions, such as the hypothalamic paraventricular nucleus or the spinal cord, can evoke low-frequency bursts of sympathetic activity (12, 25, 26).

Although they have some different pharmacological properties, a common property of picrotoxin and bicuculline is that they both block GABA_A receptors (28). Our results, therefore, show that in anesthetized rats, blockade of GABA_A receptors within the deep layers of the SC or external and central nuclei of the IC allows the expression of stimulus-evoked synchronized sympathetic, respiratory and somatomotor responses that are normally suppressed under control conditions. Further studies will be required, however, to determine whether the GABA_A receptors that suppress the evoked responses are synaptic or extrasynaptic, since picrotoxin and bicuculline block both types of receptors (44).

Collicular neurons driving the sympathetic, respiratory, and somatomotor responses. Two lines of evidence suggest that the sympathetic and respiratory components of the evoked re-

sponses are driven by a common population of command neurons in the colliculi. First, in all cases in which a response was evoked, there were marked increases in both SpSNA and PNA. Second, the increases in SpSNA and PNA were highly synchronized, such that the onset of the auditory or light-triggered SpSNA bursts lagged the onset of the PNA bursts (by 25–30 ms). It seems unlikely that such a time lag could be explained by a difference in the number of central synapses in the descending pathways mediating the increases in SpSNA and PNA, because the transmission time for synapses in the brain stem is typically <1 ms (39). This time lag is, however, consistent with activation of respiratory and sympathetic outputs by a single population of collicular neurons, given the relatively slow conduction velocity of sympathetic efferent pathways compared with that of phrenic motor pathways (19, 40). At the same time, we cannot rule out the possibility that the sympathetic and respiratory responses are driven by separate populations of collicular neurons that are simultaneously activated by auditory, visual, or somatosensory inputs.

At 30 of the 42 positive sites at which ScNA was recorded in addition to SpSNA and PNA, stimulus-evoked increases in SpSNA and PNA were also accompanied by an increase in ScNA, the onset of which also preceded the onset of the sound- or light-triggered SpSNA bursts. Again, this difference in onset time can be explained by the fact that sciatic motor nerves have a much higher conduction velocity than sympathetic efferent

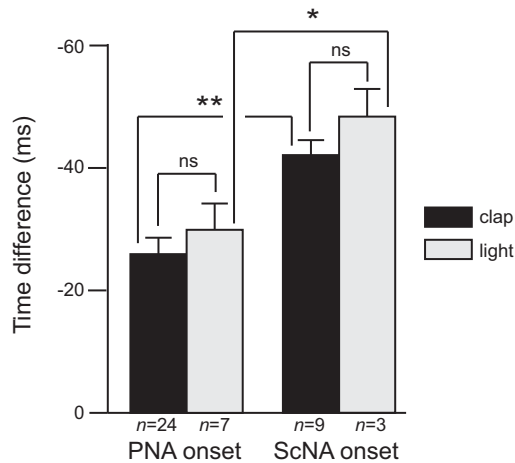


Fig. 5. Histogram showing the time differences (means \pm SE) between the onset of SpSNA bursts and the onsets of PNA bursts or ScNA bursts as determined from cycle-triggered averaging of the responses evoked by auditory (clap) or visual (light) stimuli, following picrotoxin microinjection into different positive sites in the colliculi. The negative values indicate that the onsets of PNA and ScNA bursts preceded the onset of SpSNA bursts. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ns, not significant.

pathways (19, 48). The inability to detect ScNA responses in some cases could reflect technical difficulties associated with detecting motor activity in the sciatic nerve, or differential sensitivity of motor compared with phrenic/sympathetic outputs under anesthesia. Alternatively, some collicular neurons driving cardiovascular/respiratory responses may not influence somatomotor activity. Nevertheless, the data are consistent with the hypothesis that a population of command neurons in the colliculi can generate synchronized sympathetic, respiratory, and somatomotor responses to multimodal sensory inputs, even under surgical anesthesia. In this regard, it is interesting to note that the intermediate and deep layers of the SC contain multisensory neurons that respond to visual, auditory, and somatosensory stimuli (15, 16, 27, 31, 33, 34). In particular, Meredith and Stein (34) demonstrated a convergence of visual, auditory, and somatosensory inputs onto many individual cells in the deep layers of the SC. Further studies are required, however, to determine whether multisensory neurons in the SC can simultaneously drive sympathetic, respiratory, and somatomotor responses, or whether these responses are driven by separate populations of collicular neurons.

Central pathways mediating the reflex responses. The essential circuitry subserving the coordinated sympathetic, respiratory, and motor responses (at least to auditory stimuli) must be contained within the brain stem and spinal cord, as responses were present after removal of virtually the entire forebrain. This is consistent with previous reports that behavioral responses, when triggered by visual, somatosensory, or auditory stimuli signaling a threat, are dependent upon relays in the SC and (for auditory stimuli) the IC, but not the thalamus or cortex (3, 5).

Similarly, our finding that responses to auditory stimuli were evoked in decerebrate rats following bicuculline microinjection into the colliculi also indicates that the tonic GABAergic inhibition that blocks the responses to natural stimuli in anesthetized rats must also arise from neurons within the brain stem or spinal cord. These neurons may be local interneurons (35) or

may project to the SC or IC from other nuclei, such as the substantia nigra. There is a direct GABAergic pathway from the substantia nigra pars reticulata (SNpr) to the colliculi (4, 41), and this pathway may, therefore, tonically inhibit command neurons that generate coordinated behavioral and autonomic responses to natural stimuli. It is very interesting to note that defensive behavioral responses evoked by electrical or chemical stimulation of the SC or IC in conscious rats are enhanced following blockade of neurons in the SNpr, whereas activation of such neurons in the SNpr has the opposite effect (4, 7, 36).

Output pathways from the SC have been studied primarily with respect to the role of the SC in somatomotor functions associated with orienting and escape behavior (8, 10). There are direct descending projections to the pontomedullary reticular nuclei that control somatomotor activity (42), but there is little anatomical information concerning possible connections with brain stem nuclei that control sympathetic or respiratory function, such as the rostral ventrolateral medulla or the dorsal and ventral respiratory groups. Similarly, the possible pathways by which neurons in the IC could regulate sympathetic or respiratory function are also unknown. There is a strong projection from the IC to the SC, however (11), and it is

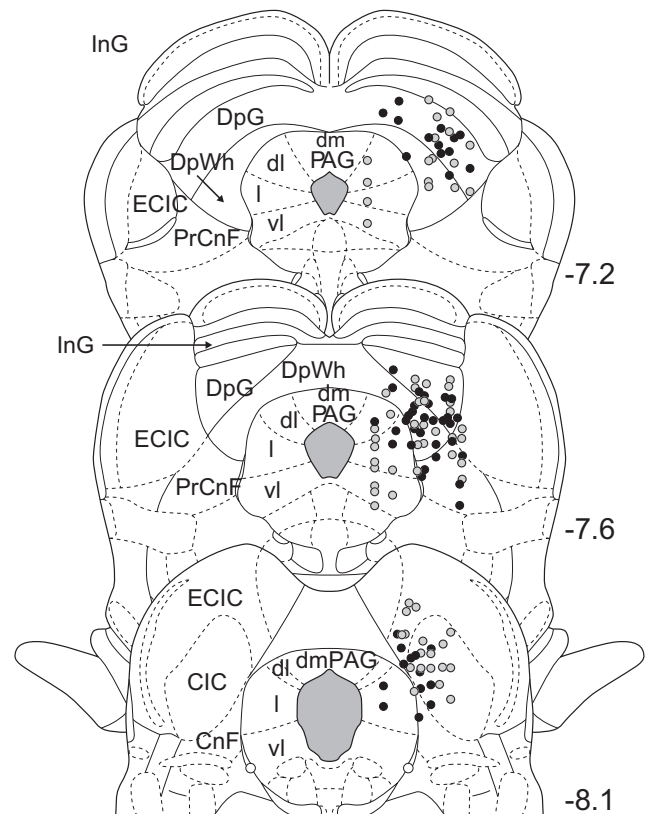


Fig. 6. Distribution of the centers of sites at which, following a picrotoxin microinjection, a response was evoked by an auditory, visual, and/or somatosensory stimulus (positive sites, solid circles) and sites at which no response was evoked (negative sites, gray circles), mapped on to three coronal sections of the brain at distances (in mm) caudal to bregma. CnF, cuneiform nucleus; dm, dorsomedial; dl, dorsolateral; DpG, deep gray layer of the SC; DpWh, deep white layer of the SC; ECIC, external nucleus of the IC; InG, intermediate gray layer of the SC; I, lateral; PAG, periaqueductal gray; PrCnF, precuneiform nucleus; vl, ventrolateral.

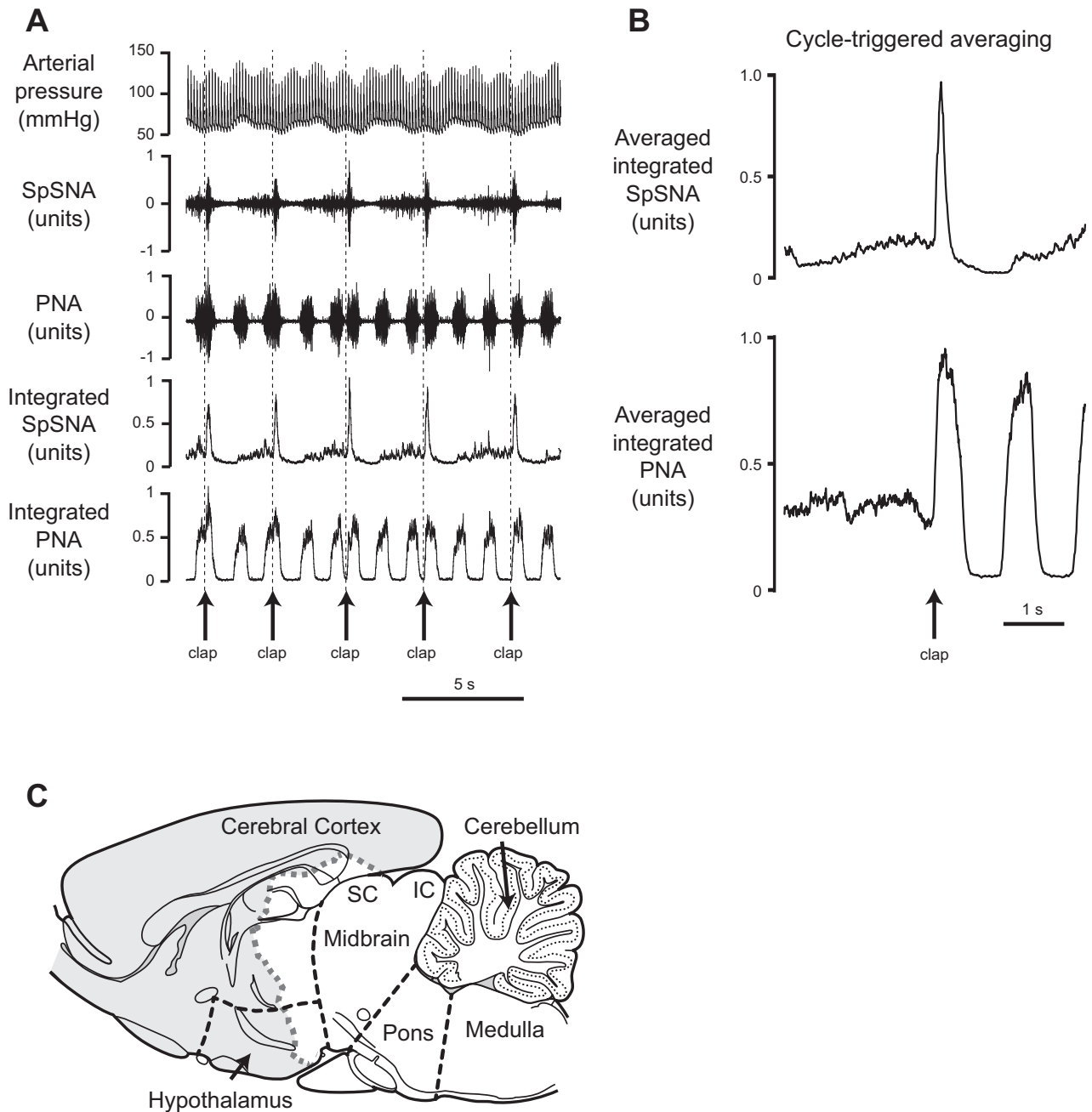


Fig. 7. Auditory evoked responses were intact following decerebration. *A*: responses evoked by auditory stimuli (series of claps) after microinjection of bicuculline into one positive site after decerebration. *B*: cycle-triggered average of 13 SpSNA and PNA auditorily evoked responses for this site, where the trigger point was the onset of the burst of SpSNA. *C*: sagittal section of the brain at 1.13 mm lateral to midline showing brain regions (in gray) removed by decerebration in this experiment. SC, superior colliculus; IC, inferior colliculus.

possible that this projection may target neurons within the SC that regulate sympathetic and respiratory activity.

Perspectives and Significance

LeDoux (29) suggested that a subcortical pathway that includes the lateral amygdala mediates rapid subconscious responses to threatening stimuli. In the present study, we observed no significant effect of removal of the amygdala on responses to auditory stimuli unmasked by collicular disinhibition. Therefore, it seems likely that the colliculi may mediate an even more rapid and primitive response. The SC and IC are

the mammalian homologs of the optic tectum and torus semicircularis, respectively, both of which evolved very early and are highly conserved in vertebrates (1, 47). As in mammals (31, 33, 34), reptiles and fish have many neurons in the optic tectum that are multisensory, and the optic tectum in these species also has a critical role in generating defensive responses, triggered by signs of a predator (46). Thus, it is possible that the synchronized responses generated by the colliculi are part of a phylogenetically ancient and highly conserved defense system (47) that generates immediate somatomotor and supportive autonomic responses in reaction to

the perception of danger. For example, it has been shown in humans that a sudden noise or unexpected somatosensory stimulus commonly evokes both a sudden inspiration and increase in skin sympathetic activity (13).

The ability of the auditory system to perceive danger, or an unexpected stimulus in the environment, depends upon what has been termed stimulus-specific adaptation, such that there is neuronal adaptation to repeated sounds, while maintaining responsiveness to uncommon sounds (18). Neurons with such a capability were first identified in the auditory cortex (49) but more recently have also been identified in the IC (9, 30). Neurons that display stimulus-specific adaptation have also been identified in the optic tectum of the barn owl, and so this may be a general characteristic of some neurons in the SC, as well as in the IC. Such neurons in the IC and SC would, therefore, be good candidates as neurons that generate immediate coordinated physiological responses to novel or threatening stimuli.

Finally, consistent with our observations, the threshold for evoking avoidance and escape behavior in conscious rats is reduced by SC disinhibition (8). These findings, together with the data presented here, support our proposal that command neurons within the SC and IC, controlled by a GABAergic input, generate appropriate coordinated increases in autonomic, respiratory, and somatomotor activity as part of a generalized behavioral response to natural stimuli that require immediate action.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Phillip Wisinski-Bokinić for assistance with the histology, and we thank Associate Professor Simon Carlile for help with the measurements of sound amplitude and frequency range.

GRANTS

This work was supported by grants from the National Health and Medical Research Council of Australia (to R. A. L. Dampney, A. K. Goodchild, and S. McMullan), CAPES of Brazil (to F. C. F. Müller-Ribeiro) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (CBB-APQ-00353-13) and CNPq (PQ 306000/2013-0) of Brazil (to M. A. P. Fontes).

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: F.C.F.M.-R., R.A.D., M.A.P.F., and A.K.G. conception and design of research; F.C.F.M.-R. and A.K.G. performed experiments; F.C.F.M.-R., R.A.D., S.M., and A.K.G. analyzed data; F.C.F.M.-R., R.A.D., S.M., M.A.P.F., and A.K.G. interpreted results of experiments; F.C.F.M.-R., R.A.D., S.M., M.A.P.F., and A.K.G. edited and revised manuscript; F.C.F.M.-R., R.A.D., S.M., M.A.P.F., and A.K.G. approved final version of manuscript; R.A.D. prepared figures; R.A.D. drafted manuscript.

REFERENCES

1. **Belekhova MG, Kenigfest-Rio NB, Vesselkin NP, Rio JP, Reperant J, Ward R.** Evolutionary significance of different neurochemical organization of the internal and external regions of auditory centres in the reptilian brain: an immunocytochemical and reduced NADPH-diaphorase histochemical study in turtles. *Brain Res* 925: 100–106, 2002.
2. **Brandao ML, Tomaz C, Leao Borges PC, Coimbra NC, Bagri A.** Defense reaction induced by microinjections of bicuculline into the inferior colliculus. *Physiol Behav* 44: 361–365, 1988.
3. **Casseday JH, Covey E.** A neuroethological theory of the operation of the superior colliculus. *Brain Behav Evol* 47: 311–336, 1996.
4. **Castellan-Baldan L, da Costa Kawasaki M, Ribeiro SJ, Calvo F, Correa VM, Coimbra NC.** Topographic and functional neuroanatomical study of GABAergic disinhibitory striatum-nigral inputs and inhibitory nigrocollicular pathways: Neural hodology recruiting the substantia nigra, pars reticulata, for the modulation of the neural activity in the inferior colliculus involved with panic-like emotions. *J Chem Neuroanat* 32: 1–27, 2006.
5. **Cohen JD, Castro-Alamancos MA.** Early sensory pathways for detection of fearful conditioned stimuli: tectal and thalamic relays. *J Neurosci* 27: 7762–7776, 2007.
6. **Cohen JD, Castro-Alamancos MA.** Neural correlates of active avoidance behavior in superior colliculus. *J Neurosci* 30: 8502–8511, 2010.
7. **Coimbra NC, Brandao ML.** GABAergic nigro-collicular pathways modulate the defensive behaviour elicited by midbrain tectum stimulation. *Behav Brain Res* 59: 131–139, 1993.
8. **Dean P, Redgrave P, Westby GW.** Event or emergency? Two response systems in the mammalian superior colliculus. *Trends Neurosci* 12: 137–147, 1989.
9. **Duque D, Perez-Gonzalez D, Ayala YA, Palmer AR, Malmierca MS.** Topographic distribution, frequency, and intensity dependence of stimulus-specific adaptation in the inferior colliculus of the rat. *J Neurosci* 32: 17762–17774, 2012.
10. **Gandhi NJ, Katnani HA.** Motor functions of the superior colliculus. *Ann Rev Neurosci* 34: 205–231, 2011.
11. **Garcia Del Cano G, Gerrikagoitia I, Alonso-Cabria A, Martinez-Millan L.** Organization and origin of the connection from the inferior to the superior colliculi in the rat. *J Comp Neurol* 499: 716–731, 2006.
12. **Goodchild AK, van Deurzen BTM, Hildreth CM, Pilowsky PM.** Control of sympathetic, respiratory and somatomotor outflow by an intraspinal pattern generator. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35: 447–453, 2008.
13. **Hagbarth RG, Hallin A, Hongell HE, Torebjörk HE, Wallin BG.** General characteristics of sympathetic activity in human skin nerves. *Acta Physiol Scand* 84: 164–176, 1972.
14. **Heffner HE, Heffner RS, Contos C, Ott T.** Audiogram of the hooded Norway rat. *Hear Res* 73: 244–247, 1994.
15. **Hirokawa J, Sadakane O, Sakata S, Bosch M, Sakurai Y, Yamamori T.** Multisensory information facilitates reaction speed by enlarging activity difference between superior colliculus hemispheres in rats. *PLoS One* 6: e25283, 2011.
16. **Huffman RF, Henson OW.** The descending auditory pathway and acousticomotor systems: connections with the inferior colliculus. *Brain Res Rev* 15: 295–323, 1990.
17. **Iigaya K, Muller-Ribeiro FC, Horiuchi J, McDowall LM, Nalivaiko E, Fontes MAP, Dampney RAL.** Synchronized activation of sympathetic vasomotor, cardiac, and respiratory outputs by neurons in the midbrain colliculi. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 303: R599–R610, 2012.
18. **Jääskeläinen IP, Ahveninen J, Belliveau JW, Raij T, Sams M.** Short-term plasticity in auditory cognition. *Trends Neurosci* 30: 653–661, 2007.
19. **Jänig W.** Pre- and postganglionic vasoconstrictor neurons: differentiation, types, and discharge properties. *Annu Rev Physiol* 50: 525–539, 1988.
20. **Jen LS, Au C.** Intercollicular fibers terminating in the superficial layers of the superior colliculus: a WHA-HRP study in the rat. *Brain Res* 379: 385–389, 1986.
21. **Jiang ZD, Moore DR, King AJ.** Sources of subcortical projections to the superior colliculus in the ferret. *Brain Res* 755: 279–292, 1997.
22. **Johnson SW, Seutin V.** Bicuculline methiodide potentiates NMDA-dependent burst firing in rat dopamine neurons by blocking apamin-sensitive Ca²⁺-activated K⁺ currents. *Neurosci Lett* 231: 13–16, 1997.
23. **Keay KA, Dean P, Redgrave P.** N-methyl D-aspartate (NMDA) evoked changes in blood pressure and heart rate from the rat superior colliculus. *Exp Brain Res* 80: 148–156, 1990.
24. **Keay KA, Redgrave P, Dean P.** Cardiovascular and respiratory changes elicited by stimulation of rat superior colliculus. *Brain Res Bull* 20: 13–26, 1998.
25. **Kenney MJ, Weiss ML, Patel KP, Wang Y, Fels RJ.** Paraventricular nucleus bicuculline alters frequency components of sympathetic nerve discharge bursts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H1233–H1241, 2001.
26. **Kenney MJ, Weiss ML, Mendes T, Wang Y, Fels RJ.** Role of paraventricular nucleus in regulation of sympathetic nerve frequency components. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H1710–H1720, 2003.
27. **King AJ, Palmer AR.** Integration of visual and auditory information in bimodal neurons in the guinea-pig superior colliculus. *Exp Brain Res* 60: 492–500, 1985.

28. **Kleiman-Weiner M, Beenhakker MP, Segal WA, Huguenard JR.** Synergistic roles of GABA_A receptors and SK channels in regulating thalamocortical oscillations. *J Neurophysiol* 102: 203–213, 2009.
29. **LeDoux JE.** Brain mechanisms of emotion and emotional learning. *Curr Opin Neurobiol* 2: 191–197, 1992.
30. **Malmierca MS, Cristaudo S, Peérez-González D, Covey E.** Stimulus-specific adaptation in the inferior colliculus of the anesthetized rat. *J Neurosci* 29: 5483–5493, 2009.
31. **May PJ.** The mammalian superior colliculus: laminar structure and connections. *Prog Brain Res* 151: 321–378, 2006.
32. **McDowall LM, Horiuchi J, Dampney RA.** Effects of disinhibition of neurons in the dorsomedial hypothalamus on central respiratory drive. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R1728–R1735, 2007.
33. **Meredith MA, Stein BE.** Spatial factors determine the activity of multi-sensory neurons in cat superior colliculus. *Brain Res* 365: 350–354, 1986.
34. **Meredith MA, Stein BE.** Visual, auditory, and somatosensory convergence on cells in superior colliculus results in multisensory integration. *J Neurophysiol* 356: 640–662, 1986.
35. **Mize RR.** The organization of GABAergic neurons in the mammalian superior colliculus. *Prog Brain Res* 90: 219–248, 1992.
36. **Nobre MJ, Lopes MG, Brandao ML.** Defense reaction mediated by NMDA mechanisms in the inferior colliculus is modulated by GABAergic nigro-collicular pathways. *Brain Res* 999: 124–131, 2004.
37. **Padley JR, Li Q, Pilowsky PM, Goodchild AK.** Cannabinoid receptor activation in the rostral ventrolateral medulla oblongata evokes cardiorespiratory effects in anaesthetised rats. *Br J Pharmacol* 140: 384–394, 2003.
38. **Paxinos G, Watson C.** *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic, 2004.
39. **Pellet J.** Neural organization in the brainstem circuit mediating the primary acoustic head startle: an electrophysiological study in the rat. *Physiol Behav* 48: 727–739, 1990.
40. **Pickering M, Jones JF.** Comparison of the motor discharge to the crural and costal diaphragm in the rat. *Respir Physiol Neurobiol* 159: 21–27, 2007.
41. **Redgrave P, Marrow L, Dean P.** Topographical organization of the nigrotetal projection in rat: evidence for segregated channels. *Neuroscience* 50: 571–595, 1992.
42. **Redgrave P, Mitchell IJ, Dean P.** Descending projections from the superior colliculus in rat: a study using orthograde transport of wheatgerm-agglutinin conjugated horseradish peroxidase. *Exp Brain Res* 68: 47–167, 1987.
43. **Schmalbruch H.** Fiber composition of the rat sciatic nerve. *Anat Rec* 215: 71–81, 1986.
44. **Semyanov A, Walker MC, Kullmann DM, Silver RA.** Tonically active GABA_A receptors: modulating gain and maintaining the tone. *Trends Neurosci* 27: 71–81, 1986.
45. **Soltis RP, DiMicco JA.** Interaction of hypothalamic GABA_A and excitatory amino acid receptors controlling heart rate in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 261: R427–R433, 1991.
46. **Stein BE.** Neural mechanisms for synthesizing sensory information and producing adaptive behaviors. *Exp Brain Res* 123: 124–135, 1998.
47. **Stein BE, Gauthier NS.** Sensory representation in reptilian optic tectum: some comparisons with mammals. *J Comp Neurol* 202: 69–87, 1981.
48. **Thomas PK, Jefferys JGR, Sharma AK, Bajada S.** Nerve conduction velocity in experimental diabetes in the rat and rabbit. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 44: 233–238, 1981.
49. **Ulanovsky N, Las L, Nelken I.** Processing of low-probability sounds by cortical neurons. *Nat Neurosci* 6: 391–398, 2003.
50. **Wiberg M, Westman J, Blomqvist A.** Somatosensory projection to the mesencephalon: an anatomical study in the monkey. *J Comp Neurol* 264: 92–117, 1987.