



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**MODULACIÓN SOMATOSTATINÉRGICA DEL CIRCUITO GENERADOR  
DEL RITMO RESPIRATORIO**

**TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**BIÓL. JOSUÉ ORLANDO RAMÍREZ JARQUÍN**

**TUTOR PRINCIPAL:**

**DR. JOSÉ FERNANDO PEÑA ORTEGA, INB-UNAM.**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**

**DR. LUIS ALFONSO VACA DOMÍNGUEZ, IFC-UNAM.**

**DRA. CLORINDA ÁRIAS ÁLVAREZ, IIB-UNAM.**

**MÉXICO, D. F. FEBRERO 2013.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de CIRCUITOS NEURONALES del DEPARTAMENTO DE NEUROBIOLOGÍA DEL DESARROLLO Y NEUROFISIOLOGÍA del INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA de la UNAM Y EN EL LABORATORIO 9 del DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA DEL CINVESTAV DEL IPN, bajo la dirección del Dr. José Fernando Peña Ortega. Así como en el LABORATORIO 126-NORTE, del DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, del INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR DE LA UNAM, a cargo del Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez.

Para el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo de los donativos de CONACyT (151261), de la Alzheimer's Association (NIRG-11-205443) y de DGAPA-UNAM (IACODI1201511) otorgados al Dr. José Fernando Peña Ortega. Además, se contó con el apoyo del donativo DGAPA-UNAM (PAPIIT-IX200210) otorgado al Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez.

Finalmente, para la realización de esta tesis se contó con una beca de CONACyT (número de registro 195295) y, al término de ésta, con una beca de DGAPA-UNAM (PAPIIT-IX200210).

## **AGRADECIMIENTOS:**

**Al Dr. José Fernando Peña Ortega por el apoyo brindado para el desarrollo y la culminación de este proyecto doctoral.**

**Al comité tutorial:**

**Al Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez y la Dra. Clorinda Árias Álvarez por toda la asesoría brindada durante el desarrollo de este doctorado.**

**Al jurado del examen por todos los comentarios y sugerencias brindados para mejorar la tesis.**

**Dra. Elvira Galarraga Palacio (IFC-UNAM).**

**Dra. Patricia Segura Medina (INER).**

**Dr. Stefan Mihailescu (FM-UNAM).**

**Dr. Rodolfo Delgado Lezama (CINVESTAV, IPN).**

**Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM por otorgarme un espacio en sus listas y permitirme realizar mis estudios de posgrado.**

**Al CONACyT y a la DGAPA-UNAM por haberme otorgado un apoyo económico durante el desarrollo del posgrado.**

**A la UNAM por todo el tiempo que me permitió aprender, crecer y formarme en sus aulas, sus bibliotecas, sus áreas verdes y sus zonas de recreación.**

Además, quiero agradecer a todas las personas que durante tanto tiempo me han apoyado para seguir adelante.

Primero que nada, a mi familia.

- Mis padres: Camelia Jarquín López y Francisco Ramírez, por mantenerse a mi lado durante este trayecto y por enseñarme a que nunca se debe de renunciar.
- Mis hermanos: Arely Esmeralda Ramírez Jarquín y Uri Nimrod Ramírez Jarquín, porque siempre me ayudan a salir adelante y me acompañan en todos los momentos, buenos y malos.

A la familia Juárez-Gutiérrez por toda su compañía, cariño y apoyo durante este trayecto. Mi padrino Ligorio Juárez, mi madrina Lucía Gutiérrez Guzmán. Mis primos: Bruno Juárez Gutiérrez y Adán Juárez Gutiérrez

A la familia Ramírez-Hernández. Mis tíos Blanca y Bertario, mis primos Lourdes, Rolando, Viviana y Mónica por mantenerse con nosotros y contar con su amistad durante tanto tiempo.

A mis primos Yolanda Jarquín Jiménez y Ernesto Jarquín Jiménez; y mi tía Vicenta Jiménez Reyes por todo el apoyo que hemos recibido, no solo yo, sino toda mi familia a lo largo de todos estos años.

A la familia Ramírez-Ríos: Mis tíos Paula Ríos Gutiérrez y Domingo Ramírez-Juárez. Mis primos: Leonel Ramírez Ríos, Sergio Octavio Ramírez Ríos y René Rodrigo Ramírez Ríos por su amistad y compañía durante tantos años.

A mi tío Alfredo Jarquín López por toda su sinceridad y su amistad, porque sigue siendo un ejemplo de cómo enfrentar las adversidades.

A mi tío Jaime Ramírez por todo el apoyo recibido por parte de él y su familia durante toda la vida.

A mi comadre María López Hernández, mi compadre José Juan Jarquín Cortés. Mis ahijados Mayreth Edith Jarquín López y José Luis Jarquín López. Mi primo y amigo José Carlos López Hernández, por toda su compañía y apoyo durante tantos años de conocernos.

A mi comadre María García, mi compadre Justino Cortés, y mis ahijados Sandra Itzel Cortés García y Oscar Francisco Cortés García por darme su confianza y permitirme compartir con ustedes parte de su formación.

A mi comadre Vianey Ferman, mi ahijada Melany Ramírez y a Gabriel Ferman, por su sinceridad y amistad y porque, aunque no nos vemos, muy seguido siempre los tengo presentes.

A mis amigos que conocí desde el inicio de mi carrera: Ángel Andrade Torres, Etienne Rajchenberg Ceceña, Rafael Rodríguez Martínez, Armando Gutiérrez Lerma, Noe Santiago Alavés Pérez, Luis Polanco Sarabia, Israel Santiago Sánchez, Adrián Rocha Garfias, Martha Alejandra Gómez López, Meztli Gaytán, Gabriela Berenice Jiménez, Andrea Aguilar Arredondo, Daniel Chapela, Juan Javier López Guerrero, Cecilia Zavala Tecuapetla, Deyanira Acuña Hernández, Fernando Gutiérrez, Erick Alejandro Arce, porque siempre me han ayudado y dado su apoyo para continuar con este proyecto.

A mis amigos de los lugares en que he laborado, Ana Julia Rivera Angulo, Jonathan Enrique Pacheco, Carlos Bastián, Alicia Sampieri, Jena Rosado Matos, Doña Saluz, por todo el apoyo y la comprensión durante todo este tiempo.

A mis compañeros del basquetbol: Emmanuel Ortiz, Raúl Núñez, Benji Castillo, Rodrigo Roa, Marco León, Leonel Ramírez, Uri Nimrod, Tallo (Bertario Ramírez), Panchito (Francisco Ramírez), Yuka (Alfredo Frías), peluche (José Luis), Charly (Carlos López) por permitirme convivir con ustedes y compartirme no solo de su modo de jugar sino también de su amistad.

A todos los que me llegasen a faltar enunciarlos aquí (por falta de espacio) les agradezco sinceramente todo el apoyo recibido durante tanto tiempo.

Finalmente, a la vida, por permitirme conocerlos y convivir con todos los aquí mencionados.

***In Memoriam:***

A ti que me enseñaste a sonreír siempre, incluso en los momentos más difíciles, y a siempre dar lo mejor de mí. En todo momento te tengo presente con mucho afecto y admiración. Gracias por todo lo que me diste, padrino, tío, amigo ...



**Gracias Goyito (Ligorio Juárez Ramírez).**

## ÍNDICE

Índice de tablas y figuras.....	1
Abreviaturas.....	6
Resumen.....	9
Introducción	
La respiración y la generación de los ritmos respiratorios.....	10
Ciclo respiratorio.....	12
Control y regulación central de la generación del ritmo respiratorio.....	13
Neuronas respiratorias.....	16
El circuito generador del ritmo respiratorio: el complejo preBötzingher.....	17
Ritmos respiratorios producidos por el complejo preBötzingher.....	21
La hipoxia.....	24
Respuesta cerebral a la hipoxia.....	25
Respuesta respiratoria a la hipoxia.....	28
La generación del ritmo respiratorio.....	30
Generación de la eupnea y de los boqueos: papel de las neuronas marcapaso.....	33
Modulación de la respiración.....	37
Los receptores de la SST.....	38
Distribución de los receptores de SST en el SNC.....	40
Acciones electrofisiológicas de la SST.....	41
Efectos de la SST sobre la respiración.....	43
Planteamiento del problema.....	47
Hipótesis.....	47

Objetivos	
Objetivo general.....	48
Objetivos específicos.....	48
Materiales y métodos	
Animales.....	49
Obtención de rebanadas transversales de tallo cerebral.....	49
Registros electrofisiológicos.....	50
Registros multiunitarios de la actividad poblacional del complejo preBötzinger..	50
Registros de patch-clamp de neuronas respiratorias.....	51
Registros pletismográficos.....	52
rt-PCR en tiempo real (qPCR) .....	53
Diseño de los primers utilizados para la qPCR.....	54
Análisis de datos.....	55
Fármacos.....	57
Resultados	
La somatostatina inhibe la generación de los ritmos respiratorios e incrementa la regularidad de la eupnea.....	59
La somatostatina endógena modula la actividad del complejo preBötzinger.....	64
La somatostatina modula la actividad del complejo preBötzinger a través de sus receptores tipo 2.....	67
La aplicación de SST exógena se asocia con la activación de diferentes canales de K <sup>+</sup> en el preBötC.....	71
La somatostatina inhibe la actividad eléctrica de las neuronas del complejo preBötzinger.....	75
La somatostatina inhibe la respiración <i>in vivo</i> .....	78



Discusión.....	<b>83</b>
Conclusiones.....	<b>101</b>
Referencias.....	<b>103</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS:

**Figura 1. Organización esquemática del sistema respiratorio.** La actividad de los centros respiratorios se modula por diversas entradas como son las provenientes de los cuerpos carotídeos, los quimiorreceptores periféricos y centrales, los receptores de estiramiento pulmonar que regulan la ventilación y otros centros respiratorios. Otras estructuras superiores como la corteza, el tálamo y el hipotálamo también actúan sobre las motoneuronas respiratorias el circuito generador del ritmo respiratorio.

**Figura 2. Representación esquemática del ciclo respiratorio en humano.** La respiración es una conducta que regula el intercambio gaseoso de los pulmones. Se muestran los movimientos musculares involucrados en la inspiración y la espiración.

**Figura 3. Representación de los principales grupos neuronales respiratorios del tallo cerebral y la médula espinal de los mamíferos.** Se muestra la localización de los diferentes grupos de neuronas respiratorias del tallo cerebral. Estos núcleos se organizan a manera de columna a lo largo del tallo cerebral y su organización es bilateral.

**Figura 4. Trazos representativos del patrón de disparo de diferentes tipos de neuronas inspiratorias.** Se muestra el registro de las neuronas que disparan ráfagas de potenciales de acción en fase con la actividad poblacional del complejo preBötzinger. Con base a su frecuencia de disparo y a los cambios en su voltaje se pueden clasificar neuronas con un patrón de disparo incrementador, decrementador o constante.

**Figura 5. Representación de la rebanada transversal que contiene al complejo preBötzinger obtenida del tallo cerebral.** Se muestra una fotografía del tallo cerebral y la altura a la que se realizan los cortes transversales necesarios para obtener una rebanada transversal que contiene al complejo preBötzinger y otros núcleos neuronales. A partir de esta rebanada se puede obtener una isla del complejo preBötzinger.

**Figura 6. Organización de los circuitos generadores del ritmo respiratorio localizados en el tallo cerebral.** Representación esquemática de una vista sagital del tallo cerebral que muestra la ubicación del grupo respiratorio parafacial (GRpF) y del complejo preBötzinger (preBötC).

Actualmente, se sugiere que el GRpF genera la actividad espiratoria, y que el preBötC genera la actividad inspiratoria.

**Figura 7. Generación de diferentes patrones respiratorios por el complejo preBötzinger en diferentes condiciones de oxigenación.** Bajo condiciones de normoxia se generan dos ritmos respiratorios: la eupnea y los suspiros (marcados con \*). Cuando el complejo preBötzinger se encuentra en condiciones hipóxicas sufre un proceso de reconfiguración y genera un incremento en la frecuencia de la respiración. Después de esto, ocurre una depresión respiratoria durante la que se producen los boqueos.

**Figura 8. Diferencias entre los patrones de las ráfagas correspondientes a los diferentes ritmos respiratorios.** Se muestran la eupnea y los suspiros generados en condiciones de normoxia. El suspiro es bifásico y comienza igual que una eupnea, pero después se genera una actividad inspiratoria más profunda. Se muestran las diferencias del patrón respiratorio entre la eupnea y el boqueo. Tanto la duración como el tiempo de subida de los boqueos son menores que los de la eupnea.

**Figura 9. Diferentes tipos neuronales del complejo preBötzinger.** Se muestran registros simultáneos de la actividad poblacional del complejo preBötzinger y de distintos tipos de neuronas de éste núcleo. Con base a su patrón de disparo, se identifican tres tipos de neuronas respiratorias: inspiratorias, que disparan ráfagas de potenciales de acción en fase con el ritmo poblacional; espiratorias, que tienen actividad en contrafase con el ritmo poblacional; y marcapaso que, siendo originalmente neuronas inspiratorias, mantienen la capacidad de generar ráfagas de potenciales de acción en ausencia de transmisión sináptica.

**Figura 10. Modelo propuesto para explicar la contribución de las neuronas marcapaso a la generación de los ritmos respiratorios en condiciones de normoxia e hipoxia.** En condiciones de oxigenación normal, los dos tipos de neuronas marcapaso están activas y participan en la generación de la eupnea. Si ambas poblaciones de neuronas marcapaso se bloquean, se inhibe la generación de la eupnea. En condiciones de hipoxia, las neuronas sensibles a  $\text{Cd}^{2+}$  se inhiben. Sin embargo, una parte de las neuronas que son insensibles al  $\text{Cd}^{2+}$  mantienen su actividad y

contribuyen a la generación de los boqueos. El bloqueo de la actividad de estas neuronas con riluzol evita la generación de los boqueos.

**Figura 11. Representación esquemática de la somatostatina.** Se muestra la secuencia de aminoácidos que conforman a la somatostatina-14 y su forma extendida en la parte amino terminal, la somatostatina-28.

**Figura 12. Registros electrofisiológicos realizados en la rebanada de tallo cerebral.** En la preparación de la rebanada de tallo cerebral se realizaron registros duales. Por una parte se registró la actividad poblacional del complejo preBötzing y, simultáneamente, se registró la actividad unicelular de neuronas respiratorias. También se hicieron registros electrofisiológicos de islas del complejo preBötzing, extraídas de la rebanada de tallo cerebral, en las que se registró la actividad poblacional del preBötC.

**Figura 13. Método pletismográfico utilizado para registrar la respiración en condiciones *in vivo*.** Se muestra el modo en que se registró la actividad respiratoria *in vivo* de los ratones estudiados. Para esto se utilizó un método barométrico en el que se registran los cambios de presión producidos por la expansión y contracción de la caja torácica del ratón.

**Figura 14. Parámetros del patrón respiratorio cuantificados en las diferentes condiciones experimentales.** Los parámetros medidos fueron el tiempo de subida, la duración media y la amplitud de las ráfagas respiratorias. Además, se muestra la fórmula para calcular la irregularidad del ritmo respiratorio.

**Figura 15. La somatostatina modula la generación de la eupnea actuando directamente sobre el complejo preBötzing.** Efectos de diferentes concentraciones de SST sobre la frecuencia, la irregularidad y el coeficiente de variación de los periodos del ritmo respiratorio en condiciones de oxigenación normal. También se muestra el efecto de la SST sobre las islas del complejo preBötzing. Los efectos de la SST sobre la frecuencia y la irregularidad de la eupnea son idénticos tanto en la rebanada completa del tallo cerebral como en la isla del complejo preBötzing.

**Figura 16. Efecto de la SST sobre los otros ritmos respiratorios generados por el complejo preBötzing, los suspiros y los boqueos.** La SST deprime la generación de los suspiros en

condiciones de normoxia. Además, en condiciones de hipoxia, la SST también disminuye significativamente la frecuencia de los boqueos.

**Figura 17. La SST endógena modula la generación del ritmo respiratorio por el complejo preBötzinger, tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia.** El bloqueo de los receptores de somatostatina con ciclosomatostatina incrementa la frecuencia y la irregularidad del ritmo respiratorio en condiciones de oxigenación normal y disminuye la amplitud de las ráfagas inspiratorias. Además, el bloqueo de estos receptores evita la respuesta inhibitoria de la SST sobre la eupnea y los suspiros y los boqueos. Los efectos de la CSST sobre la frecuencia e irregularidad del ritmo respiratorio producido por las islas del complejo preBötzinger son idénticos a los observados en la rebanada completa de tallo cerebral.

**Figura 18. Caracterización de los diferentes tipos de receptores localizados en el complejo preBötzinger mediante el uso de la PCR en tiempo real.** Se muestran los niveles de expresión de los diferentes receptores de SST, el receptor NK1 y la enzima GAPDH observados en muestras del complejo preBötzinger y del cerebro completo. Los receptores de SST más expresados son el SSTR2 y el SSTR3. Sin embargo, solo cuando se antagoniza el SSTR2 se evita el efecto depresor de la SST sobre el ritmo respiratorio por lo que se sugiere que el SSTR2 es el receptor involucrado en la regulación somatostatinérgica del complejo preBötzinger.

**Figura 19. El agonista específico de los SSTR2, el BIM23014C, mimetiza los efectos de la SST.** El agonista específico de los SSTR2, el BIM23014C, reduce la frecuencia, y la irregularidad del ritmo respiratorio del mismo modo que la SST.

**Figura 20. Efecto de diferentes bloqueadores de canales de calcio y potasio sobre el efecto modulador de la SST sobre el ritmo respiratorio.** Se muestra que al bloquear a los canales de  $K^+$  de la corriente M, ya sea con la linopirdina o el XE-991, se bloquea la actividad depresora de la SST sobre la frecuencia del ritmo respiratorio. Además, el bloqueo de los canales de potasio dependientes de calcio, también inhibe el efecto depresor de la SST sobre la eupnea. El bloqueo de canales de calcio tipo L, de canales de potasio dependientes de voltaje y de canales de potasio dependientes de ATP no evita la acción de la SST sobre la frecuencia del ritmo respiratorio.

**Figura 21. Efecto de la SST sobre los diferentes tipos neuronales del preBötC y sobre las propiedades intrínsecas de este circuito neuronal.** La SST deprime la actividad eléctrica de las neuronas respiratorias del complejo preBötzinger causando una hiperpolarización del potencial de membrana y una disminución de su frecuencia de disparo. Además, la SST deprime la actividad sináptica de este circuito neuronal al disminuir tanto la amplitud como la frecuencia de los potenciales sinápticos. También se muestra que, aunque la SST produce una hiperpolarización y una reducción de la frecuencia de disparo de las neuronas marcapaso, no afecta la duración de sus ráfagas de potenciales de acción y sí incrementa la amplitud de éstas.

**Figura 22. Efecto de la SST sobre la frecuencia respiratoria en condiciones *in vivo*.** En estas condiciones, la SST disminuye la respiración mediante un enlentecimiento “tipo-cuántico”. Además, inhibe la generación de los suspiros. Este efecto es mimetizado por el agonista de los SSTR2, el BIM23014C, y bloqueado por el antagonista inespecífico de estos receptores, la cianamida 154806.

**Figura 23. Efecto de la SST sobre la generación de los boqueos y el proceso de autorresucitación.** La activación o el bloqueo del sistema somatostatinérgico producen una disminución en la frecuencia de boqueos *in vivo*. Sin embargo, el bloqueo específico de los SSTR2 disminuyen la amplitud de los boqueos y además inhiben totalmente el proceso de autorresucitación.

**Tabla 1. Vías de señalización activadas para los diferentes receptores para somatostatina.** Se muestran las diferentes vías de señalización activadas por los diferentes receptores de SST. Sin embargo, todos estos receptores comparten en común que disminuyen la actividad de la adenilato ciclasa.

**Tabla 2. Lista de los pares de *primers* utilizados.** Se enlistan los *primers* utilizados para evaluar la expresión de los transcritos de los diferentes receptores de SST (SSTR1-STR5), así como sus controles (GAPDH y NK1R), tanto en el complejo preBötzinger como en el cerebro completo.

## **ABREVIATURAS:**

**5-Br-2-Met:** 5-Bromo-2-metoxipiridina, antagonista específico de los receptores tipo 3 de somatostatina.

**AFF:** ácido flufenámico, bloqueador de la ICAN.

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero.

**BIM23014C:** agonista específico del receptor tipo 2 de SST.

**BK:** canales de potasio, dependientes de calcio, de alta conductancia.

**CB:** complejo Böttinger.

**CSST:** ciclosomatostatina.

**CV:** coeficiente de variación de los periodos.

**CYN:** cianamida 154806, antagonista específico de los receptores tipo 2 de SST.

**GAPDH:** gliceraldehído 3-fostato deshidrogenasa.

**GRD:** grupo respiratorio dorsal.

**GRP:** grupo respiratorio pontino.

**GRpF:** grupo respiratorio parafacial.

**GRV:** grupo respiratorio ventral.

**GRVc:** grupo respiratorio ventral caudal.

**GRVr:** grupo respiratorio ventral rostral.

**ic:** Aplicación intracisternal.

**IC50:** concentración inhibitoria en que se alcanza el 50% del efecto.

**ICAN:** calcium-activated nonspecific cation current; corriente catiónica inespecífica activada por calcio.

**IK<sub>ATP</sub>:** canales de potasio sensibles a ATP.

**IK<sub>Ca</sub>**: canales de potasio dependientes de calcio.

**I<sub>M</sub>**: corriente M de potasio.

**Ins-Cd**: neuronas marcapaso insensibles al cadmio.

**KF**: núcleo Kölliker-Fuse.

**MX**: núcleo motor del nervio vago.

**MRVL**: médula rostro ventrolateral.

**NA**: núcleo ambiguo.

**NK1R**: receptor a sustancia P.

**NRA**: núcleo retro ambiguo.

**NRF**: núcleo retrofacial.

**NRL**: núcleo reticular lateral.

**NRT**: núcleo retrotrapezoide.

**NTE**: núcleo trigémino espinal.

**NTS**: núcleo del tracto solitario.

**VII**: núcleo facial.

**NX**: núcleo dorsal del nervio vago.

**XII**: núcleo del nervio hipogloso.

**OI**: núcleo de la oliva inferior.

**PA**: potenciales de acción.

**PBL**: núcleo parabraquial lateral.

**PBM**: núcleo parabraquial medial.

**preBötC**: complejo preBötzingen.

**PXLN**: paxilina.

**Sen-Cd**: neuronas marcapaso sensibles al cadmio.



**SK:** canales de potasio, dependientes de calcio, de baja conductancia.

**SMSL:** síndrome de muerte súbita del lactante.

**SNC:** sistema nervioso central.

**SST:** somatostatina-14.

**SSTRs:** receptores de somatostatina; SSTR1 -SSTR5.

**TTX:** tetrodotoxina.

**XE-991:** bloqueador específico de la corriente M de K<sup>+</sup>.

**XII:** núcleo hipogloso.

## Resumen:

La respiración es un proceso altamente regulado. Actualmente, se propone que el complejo preBöttinger (preBötC) genera la respiración. El preBötC produce diferentes ritmos respiratorios como la eupnea, los suspiros, y los boqueos. La actividad del preBötC se modula por neurotransmisores, aminas biogénicas, y péptidos. La somatostatina (SST) es un péptido que modifica la respiración a nivel sistémico, periférico y central. Se sabe que las neuronas del preBötC producen la SST pero se desconoce si ésta actúa directamente sobre las neuronas del preBötC. Tampoco se sabe qué receptores de SST expresan las células del preBötC ni la vía de acción de éste péptido en el preBötC. En esta tesis se investigó la regulación de la SST sobre la generación del ritmo respiratorio en condiciones de normoxia e hipoxia. Además, se caracterizaron los receptores y canales iónicos involucrados en la modulación somatostatinérgica del preBötC. Por último, se evaluó el efecto de la SST sobre la respiración y la autorresucitación, *in vivo*. Aquí mostramos que la SST modula constitutivamente la generación de los ritmos respiratorios por el preBötC. En normoxia la SST reduce la frecuencia y la irregularidad de la eupnea y elimina los suspiros. En hipoxia, la SST disminuye la frecuencia de los boqueos. Además, se sugiere que la SST modula el ritmo respiratorio mediante la activación de los receptores tipo 2 y que esto se asocia con una activación de canales de potasio dependientes de calcio y de la corriente M. A nivel unicelular, la SST hiperpolarizó el potencial de membrana en reposo y disminuyó la frecuencia de disparo de las neuronas del preBötC. Además, la SST redujo la transmisión sináptica del preBötC. Finalmente, el bloqueo de los receptores 2 de SST, *in vivo*, disminuyó la amplitud de los boqueos y evitó la autorresucitación. A partir de estos resultados, se sugiere que la modulación somatostatinérgica del preBötC es esencial para la generación del ritmo respiratorio y la autorresucitación.

## INTRODUCCIÓN

### **La respiración y la generación de los ritmos respiratorios.**

La respiración es el proceso por el que se realiza el intercambio de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> entre el medio ambiente y el medio interno de los organismos (Trés Guerres, 1999; Guyton y Hall, 2006; Barret et al., 2010). En los mamíferos este intercambio de gases depende de un movimiento rítmico que involucra la contracción coordinada de varios músculos que se dividen principalmente en tres grupos, que son (Hilaire y Pásaro, 2003):

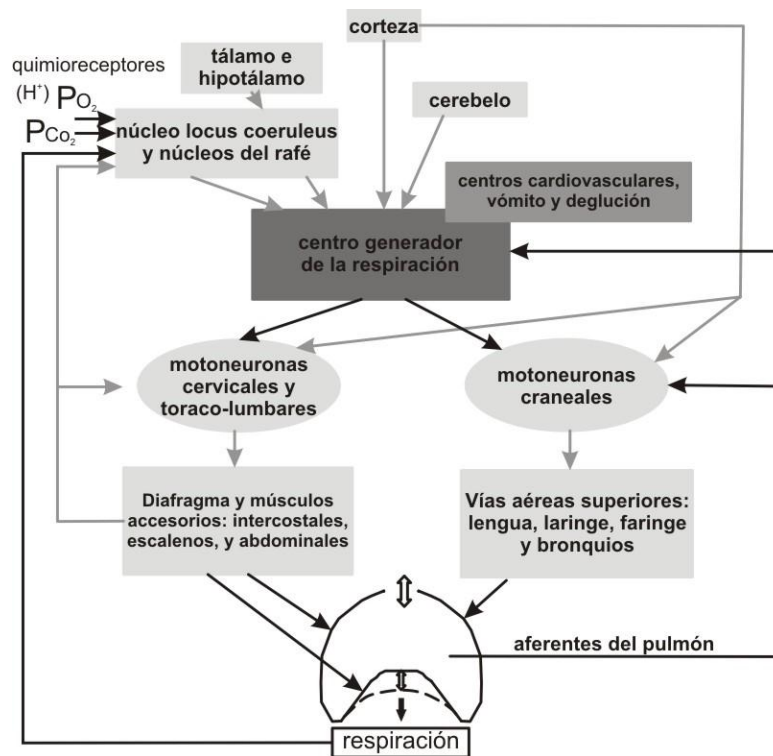
1) El diafragma, que actúa como bomba y se encarga de mover la caja torácica hacia arriba y abajo, y cuya contracción es directamente responsable del movimiento de los pulmones (Fig. 1; Hilaire y Pásaro, 2003).

2) El segundo grupo se compone por varios pares de músculos, denominados músculos accesorios, e involucra a los músculos intercostales internos y externos, los escalenos, los costales elevadores y los abdominales. Estos grupos de músculos aumentan la eficiencia de la función del diafragma (Hilaire y Pásaro, 2003).

3) El tercer grupo está conformado por los músculos de las vías aéreas superiores, como los músculos laríngeos y faríngeos, que controlan la apertura y el cierre rítmico de estas vías (Hilaire y Pásaro, 2003).

Todos estos músculos se activan por las motoneuronas espinales que los inervan (Bianchi et al., 1995; Richter y Spyer, 2001; Hilaire y Pásaro, 2003). Estas motoneuronas incluyen: motoneuronas de las vías aéreas superiores (motoneuronas craneales), motoneuronas frénicas que controlan el diafragma (ubicadas en el asta ventral de la médula cervical), motoneuronas de la caja torácica y motoneuronas abdominales (localizadas en el asta ventral de los segmentos toracolumbar (Fig.1; Bianchi et al., 1995; Richter y Spyer, 2001; Hilaire y Pásaro, 2003). Estos “músculos respiratorios” en condiciones fisiológicas también realizan funciones no respiratorias como la vocalización, la deglución, el vómito, la micción, la defecación y el parto (Hilaire y Pásaro, 2003).

La respiración requiere de una contracción coordinada entre los músculos respiratorios, que se regula y comanda, tanto a nivel periférico como central, por varios “centros respiratorios” localizados en el tallo cerebral (Richter y Spyer, 2001; Feldman et al., 2003; Wong-Riley y Liu, 2005). La actividad de estos centros respiratorios se modula por diversas entradas como son las provenientes de los cuerpos carotídeos, los quimiorreceptores periféricos y centrales (que modulan los niveles de  $O_2$ ,  $CO_2$  y pH en la sangre), los receptores de estiramiento pulmonar que regulan la ventilación y otros centros respiratorios (Hilaire y Pásaro, 2003). Además, otras estructuras superiores como la corteza, el tálamo y el hipotálamo, actúan sobre las motoneuronas respiratorias y el centro generador del ritmo respiratorio (Fig. 1; Hilaire y Pásaro, 2003).



**Figura 1. Organización esquemática del sistema respiratorio.** El centro generador de la respiración que produce el comando central rítmico de este proceso controla las motoneuronas craneales, las motoneuronas cervicales y las motoneuronas toraco-lumbares que comandan las vías aéreas superiores, el diafragma y los músculos “accesorios” de la caja torácica, respectivamente. La actividad de los centros respiratorios se modula por diversas entradas como son las provenientes de los cuerpos carotídeos, los quimiorreceptores periféricos y centrales (que modulan los niveles de  $O_2$ ,  $CO_2$  y pH en la sangre), los receptores de estiramiento pulmonar que regulan la ventilación y otros centros respiratorios. Además, estructuras superiores como la corteza, el tálamo y el hipotálamo actúan sobre las motoneuronas respiratorias y el centro generador del ritmo respiratorio. Modificado de Hilaire y Pásaro, 2003.

## **Ciclo respiratorio.**

Para generar los movimientos respiratorios es necesario, en primer lugar, que el comando inspiratorio central active a las motoneuronas respiratorias, de manera secuencial (Hilaire y Pásaro, 2003). Las primeras motoneuronas que se reclutan son las de las vías aéreas superiores, antes que las motoneuronas del diafragma y las de la caja torácica (Hilaire y Pásaro, 2003). Esto produce que se abra la glotis, antes de que la presión traqueal disminuya, lo que provoca que el diafragma se contraiga, previniendo así la aparición de algún colapso de las vías aéreas respiratorias (Hilaire y Pásaro, 2003). Cuando hay una mala coordinación entre las válvulas de las vías aéreas superiores y los músculos inspiratorios se producen colapsos que son responsables de diversos desórdenes respiratorios como las apneas obstructivas (Hilaire y Pásaro, 2003). Además, debido a que el diafragma se encuentra insertado entre las costillas inferiores, sus movimientos podrían contraer las costillas también y, con esto, disminuir el diámetro transversal de la caja torácica durante la inspiración, lo que reduciría la eficiencia de la contracción del diafragma (Hilaire y Pásaro, 2003). Esta situación se previene gracias a la co-contracción de los músculos accesorios, que permite a las costillas mantenerse en una posición fija durante la contracción del diafragma (Hilaire y Pásaro, 2003). Si la coordinación que existe entre el diafragma y las contracciones de los músculos intercostales falla, el proceso de la respiración es menos eficiente, como ocurre ocasionalmente en bebés prematuros (Hilaire y Pásaro, 2003). En la Figura 2 se muestran los diferentes músculos involucrados en el proceso de la respiración.

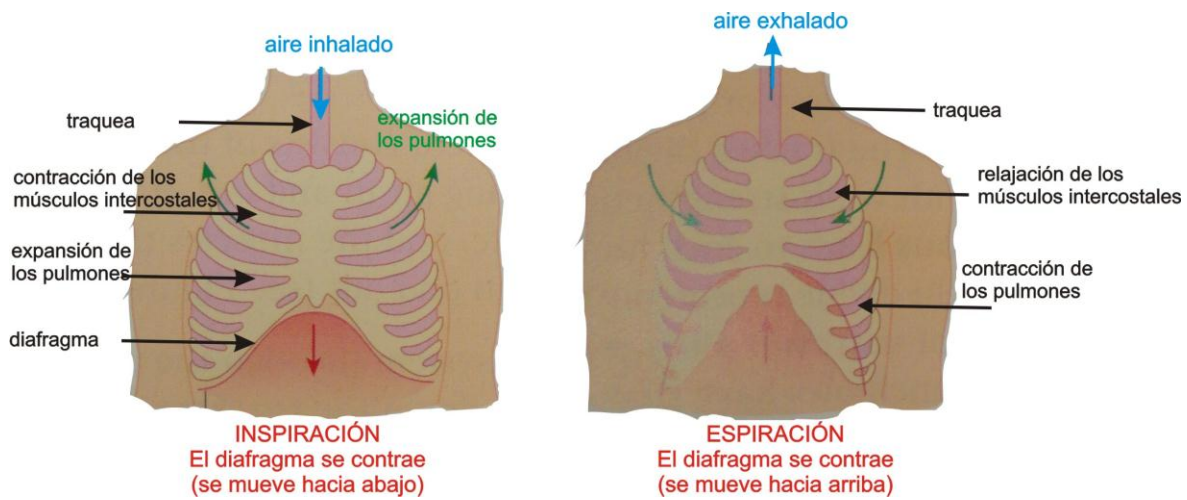
La respiración se genera y se controla a través de un eje neuronal que se localiza en la parte inferior del tallo cerebral (Richter et al., 2000, Hilaire y Pásaro, 2003). Los movimientos respiratorios necesarios para producir la ventilación se producen durante una actividad rítmica que se compone por tres diferentes fases:

- a) La inspiración: es la fase que involucra la contracción del diafragma y de otros músculos inspiratorios de la caja torácica (Fig. 2; Hají et al., 2000; Hilaire y Pásaro, 2003).
- b) La post-inspiración: es la fase donde los músculos inspiratorios dejan de contraerse de manera progresiva mientras que los músculos espiratorios de la faringe se contraen para controlar el flujo de aire fuera de los pulmones. La importancia de esta fase es que

controla la relajación del diafragma y la activación del músculo aductor laríngeo (Hají et al., 2000; Hilaire y Pásaro, 2003).

- c) La espiración: es la fase en que los músculos intercostales y abdominales espiratorios se contraen (Hají et al., 2000; Hilaire y Pásaro, 2003).

De forma general, el ritmo respiratorio se genera mediante la alternancia coordinada de estas tres fases (Hají et al., 2000; Hilaire y Pásaro, 2003). Cada una de las fases mencionadas se produce por la actividad de los diferentes tipos neuronales que constituyen al eje neuronal respiratorio, localizado en el tallo cerebral, y que está conformado por varios centros respiratorios (Hají et al., 2000).



**Figura 2. Representación esquemática del ciclo respiratorio en humano.** La respiración es una conducta que regula el intercambio gaseoso de los pulmones. Cuando se expande el tórax, en la inspiración, por la contracción del diafragma y de los músculos intercostales externos, los pulmones se expanden y entonces el aire entra a éstos (izquierda). Contrario a esto, en la espiración, el diafragma se relaja y produce la contracción de los pulmones y la salida del aire (derecha). Tomado de Allott y Mindorff, 2010.

### Control y regulación central de la generación del ritmo respiratorio.

Como se mencionó, la respiración es un proceso altamente integrado que involucra una compleja red de interacciones entre el cerebro, el tallo cerebral, la médula espinal, los nervios espinales y craneales, el diafragma, los músculos intercostales, laríngeos y faríngeos, los pulmones y la vasculatura sanguínea (Wong-Riley y Liu, 2005). La generación y la coordinación de estos

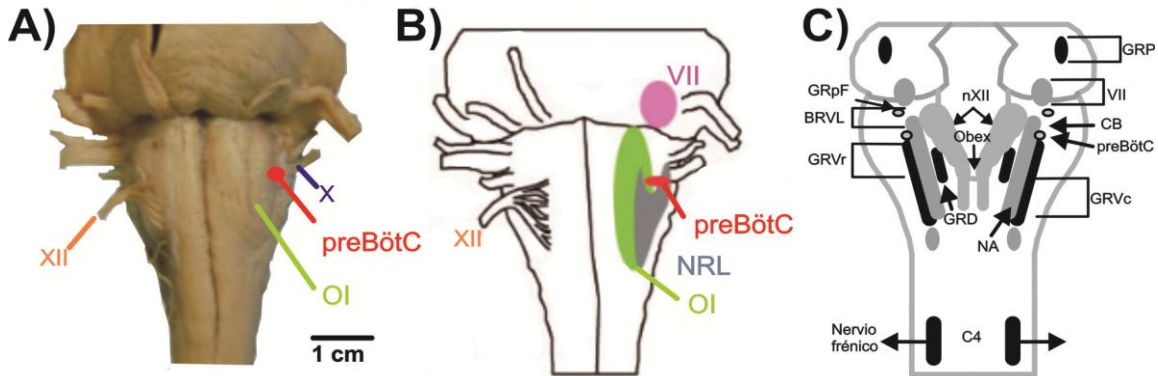
movimientos se producen tanto a nivel periférico como a nivel central (Bianchi et al., 1995; Feldman et al., 2003; Hilaire y Pásaro, 2003; Wong-Riley y Liu, 2005).

A nivel central, los distintos núcleos neuronales encargados del control respiratorio se encuentran en el tallo cerebral y se localizan en tres áreas principalmente: 1) el puente; 2) el bulbo raquídeo dorsal; y 3) el bulbo raquídeo ventrolateral (Bianchi et al., 1995; Feldman et al., 2003; Wong-Riley y Liu, 2005). A cada una de estas tres zonas se les conoce como el grupo respiratorio pontino (GRP), el grupo respiratorio dorsal (GRD) y el grupo respiratorio ventral (GRV), respectivamente (Wong-Riley y Liu, 2005). El GRP se compone principalmente por los núcleos parabraquial medial (PBM), parabraquial lateral (PBL) y por el núcleo Kölliker-Fuse (KF) (Wong-Riley y Liu, 2005). Estos núcleos reciben información de la médula espinal y están involucrados en el control motor del diafragma, la modulación del ritmo respiratorio, la vocalización y el control de los músculos de las vías aéreas durante el ejercicio y el sueño (Alheid et al., 2004; Wong-Riley y Liu, 2005). El GRD está formado básicamente por el núcleo del tracto solitario (NTS) (Wong-Riley y Liu, 2005). Las células del GRD son principalmente neuronas inspiratorias, es decir, que disparan en fase con las ráfagas de actividad de los nervios frénicos, que permiten la contracción del diafragma (Hilaire et al., 1990; Wong-Riley y Liu, 2005). La mayoría de las neuronas del GRD son bulboespinales e inspiratorias que tienen efectos excitadores sobre las motoneuronas del nervio frénico (Bianchi et al., 1995; Hilaire y Pásaro, 2003). Por último, el GRV se divide funcionalmente en el grupo respiratorio ventral rostral (GRVr) y el grupo respiratorio ventral caudal (GRVc) (Wong-Riley y Liu, 2005). El GRVr incluye al complejo Bötzing (CB), al complejo preBötzing (preBötC) y al grupo respiratorio parafacial (GRpF) (Wong-Riley y Liu, 2005). Estos núcleos están localizados en un área conocida como bulbo raquídeo ventrolateral (BRVL) (Wong-Riley y Liu, 2005). El CB contiene neuronas espiratorias inhibitorias (Ezure et al., 2003; Wong-Riley y Liu, 2005), mientras que el preBötC y el GRpF se consideran como los centros generadores de la respiración (Onimaru et al., 1988; Smith et al., 1991; Onimaru y Homma, 2003; Wong-Riley y Liu, 2005). El GRVc se conforma principalmente por el núcleo retroambiguo (NRA) y contiene principalmente neuronas promotoras de la espiración (Shen y Duffin, 2002; Wong-Riley y Liu, 2005).

Otros núcleos neuronales del tallo cerebral que se involucran en la regulación de la respiración son el núcleo ambiguo (NA), el núcleo motor del nervio vago (X) y el núcleo hipoglosa

(XII). Estos núcleos controlan a las motoneuronas de las vías aéreas superiores (Núñez-Abades et al., 1992; St-John, 1998; Jordan, 2001; Wong-Riley y Liu, 2005). Por otra parte, el núcleo de la oliva inferior (OI), que está altamente asociado con el cerebelo, podría estar involucrado en la coordinación entre músculos esqueléticos y músculos de las vías aéreas superiores durante la respiración (Ruigrok, 1997; Harper et al., 1998; Wong-Riley y Liu, 2005).

Además de estos núcleos respiratorios, existe toda una red de quimiorreceptores centrales que contribuyen a la regulación de la salida respiratoria en respuesta a concentraciones normales o anormales de gases y a la concentración de iones de hidrógeno en la sangre (ver Fig. 1; Hilare y Pásaro, 2003; Wong-Riley y Liu, 2005). Estas neuronas quimio-sensibles se distribuyen ampliamente en el sistema nervioso central (SNC) en regiones como el cerebelo, el hipotálamo posterior y diversas áreas del tallo cerebral, sobre todo en los núcleos del rafe, el *locus coeruleus*, el NTS, el núcleo retrotrapezoide (NRT) y un área cerca de la superficie ventral del bulbo raquídeo (Fig. 3) (Nattie, 2001; Okada et al., 2001; Putnam, 2001; Messier et al., 2004; Wong-Riley y Liu, 2005).



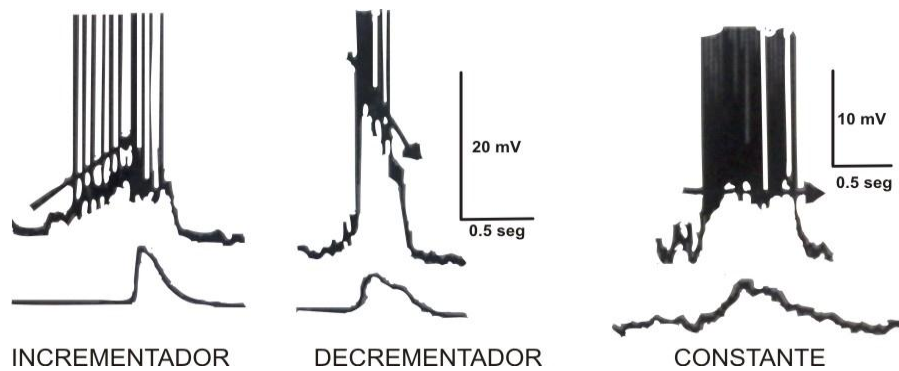
**Figura 3. Representación de los principales grupos neuronales respiratorios del tallo cerebral y la médula espinal de los mamíferos.** A) Fotografía de un tallo cerebral y señalización de algunos núcleos relacionados con la respiración. B) Se muestra la extensión en columna de estos núcleos respiratorios a lo largo del tallo cerebral. C) Representación esquemática de la localización de los diferentes grupos de neuronas respiratorias del tallo cerebral. Nótese que los distintos núcleos respiratorios están organizados a manera de columna a lo largo del tallo cerebral y que esta organización es bilateral. Abreviaturas: GRpF, grupo respiratorio parafacial; BRVL, bulbo raquídeo ventrolateral; GRVr, grupo respiratorio ventral rostral; GRVc, grupo respiratorio ventral caudal; GRP, grupo respiratorio pontino; VII, núcleo facial; CB, complejo Bötzing; preBötC, complejo preBötzing; C4 corresponde al segmento de la médula espinal que inerva al nervio frénico, la cervical 4. A y B, modificados de Schwarzacher et al., 2011. C, modificado de Duffin, 2004.



## Neuronas respiratorias.

Las neuronas respiratorias se definen como aquellas que disparan ráfagas de potenciales de acción en fase con la respiración (Peña y García, 2006). Estas células se clasifican en distintos subgrupos, dependiendo de su localización anatómica (McCrimmon et al., 2000; Duffin, 2004), de sus proyecciones (Hají et al., 2000; McCrimmon et al., 2000; Duffin, 2004) y de su patrón de disparo (Duffin, 2004; Hayes y Del Negro, 2007). A continuación se explican estos criterios de clasificación de las neuronas respiratorias:

- a) Por localización: Como se mencionó previamente, las neuronas respiratorias se localizan en tres grupos principalmente, que están distribuidos longitudinalmente en el tallo cerebral y son bilateralmente simétricos. Éstos grupos de núcleos incluyen al GRP, al GRD y al GRV (Fig. 3; McCrimmon et al., 2000; Duffin, 2004).
- b) Por proyecciones: La función de las neuronas respiratorias se relaciona con sus proyecciones axonales y sus conexiones (Duffin, 2004). De modo que se pueden clasificar en neuronas bulboespinales, que proyectan sus axones hacia las neuronas motoras espinales; motoneuronas craneales que mandan sus terminaciones a los músculos de las vías aéreas superiores; y finalmente, neuronas propiobulbares, que envían sus proyecciones dentro del mismo tallo cerebral (Hají et al., 2000; McCrimmon et al., 2000; Duffin, 2004).
- c) Por patrón de disparo: Tomando como referencia su actividad eléctrica, las células respiratorias se clasifican en neuronas inspiratorias, que disparan ráfagas de potenciales de acción en fase con la actividad poblacional del GRV; y en neuronas espiratorias, que contrario a las neuronas inspiratorias, se inhiben durante la actividad poblacional del GRV (McCrimmon et al., 2000; Thoby-Brisson y Ramirez, 2000). Por otra parte, con respecto a la frecuencia de disparo de las ráfagas de potenciales de acción durante la ráfaga inspiratoria, se diferencian neuronas inspiratorias con un patrón de disparo incrementador, decrementador, o constante, es decir, con poco cambio en la frecuencia de disparo (Fig. 4; Duffin, 2004; Hayes y Del Negro, 2007). De este modo, la generación y regulación del patrón del ritmo respiratorio, se genera por una interacción entre diferentes subtipos de neuronas respiratorias (Richter et al., 2000).



**Figura 4. Trazos representativos del patrón de disparo de diferentes tipos de neuronas inspiratorias.** Estas neuronas (trazos superiores) disparan ráfagas de potenciales de acción en fase con la actividad poblacional del preBötC (trazos inferiores). Las flechas indican la trayectoria ascendente (trazo de la izquierda), descendente (trazo de en medio) y continuo (trazo de la derecha) del voltaje de las neuronas respiratorias, así como de su frecuencia de disparo. Modificado de Hayes y Del Negro, 2007.

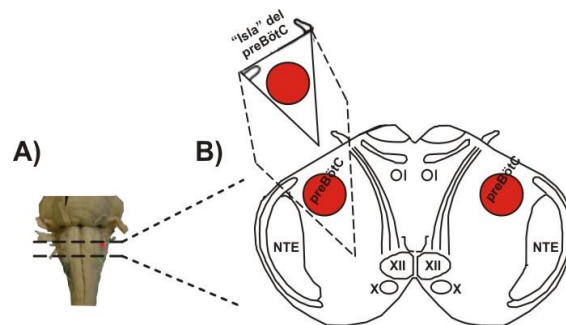
### El circuito generador del ritmo respiratorio: el complejo preBötzinger.

Como se mencionó, en el tallo cerebral existe un conjunto de neuronas llamado grupo respiratorio ventral (GRV), que incluye al preBötC (Fig.5; Smith et al., 1991; Lieske et al., 2000). El preBötC se constituye por un grupo heterogéneo de neuronas respiratorias (Connelly et al., 1992; Schwarzacher et al., 1995; Richter y Spyer 2001; Tan et al., 2008), e incluye neuronas con propiedades marcapaso (Smith et al., 1991; Johnson et al 1994; Koshiya y Smith 1999; Thoby-Brisson y Ramirez 2001; Peña et al., 2004). Se ha postulado que las neuronas respiratorias del preBötC conforman al circuito generador del ritmo respiratorio (Onimaru et al., 1988; Smith et al., 1991; Rekling y Feldman, 1998; Onimaru y Homma, 2003; Peña et al., 2004). Esto, debido a que hay estudios en donde se ha demostrado que el preBötC es suficiente y necesario para generar el ritmo respiratorio (Ramirez y Richter, 1996; Smith et al., 1991; Ramirez et al., 1998b). El papel esencial del preBötC como generador del ritmo respiratorio, se basa en evidencia tanto *in vivo* (Ramirez et al., 1998b; Gray et al., 2001; Wenninger et al., 2004b; Wenninger et al., 2004a; McKay et al., 2005; Tan et al., 2008), como *in vitro* (Ramirez et al., 1998a; Gray et al., 1999; Lieske et al., 2000; Smith et al., 2001; Peña et al., 2004). En ambas condiciones, se ha observado que el ritmo respiratorio desaparece cuando se elimina el preBötC o se deprime su actividad (Smith et al., 1991; Ramirez et al., 1998b; Gray et al., 2001; Wenninger et al., 2004a; Wenninger et al., 2004b; Tan et al., 2008). La “suficiencia” de este circuito, para la generación del ritmo respiratorio, se describe a continuación.

La suficiencia del preBötC como generador del ritmo respiratorio, se encontró en estudios desarrollados *in vitro*. En un trabajo realizado por Smith y cols., (1991), se seccionó secuencialmente la preparación del tallo cerebral–médula espinal de ratas neonatas (aproximadamente de 50 a 75  $\mu\text{m}$  de grosor cada corte en dirección rostro-caudal) y se demostró que la región que contiene al preBötC es necesaria para generar el ritmo respiratorio, que se registró en el nervio frénico (Smith et al., 1991). Dicha actividad respiratoria, persistió hasta que se realizó un corte en los límites de la parte caudal del núcleo retrofacial (NRF). Cuando se hicieron cortes posteriores, se provocó una disminución, e incluso la eliminación de la actividad rítmica (Smith et al., 2001). Así, se determinó que una región de entre 350 y 700  $\mu\text{m}$ , rostral al obex (región extrema rostral del cuarto ventrículo), ubicada de manera ventral al NA, a nivel caudal respecto al NRF, entre el CB y el GRVr, es la zona generadora del ritmo respiratorio. A esta zona, se le denominó complejo preBötzinger y se le juzgó como necesaria para la generación del ritmo respiratorio (preBötC, Fig. 5; Smith et al., 1991). Este núcleo constituye una columna de neuronas que se distribuyen bilateralmente (Duffin, 2004; Wong-Riley y Liu, 2005). Cada una de las dos columnas que contienen al preBötC es capaz de generar el ritmo respiratorio, independientemente de la otra (Gray et al., 2010). Sin embargo, existe una sincronización de ambos núcleos, que se mantiene gracias a la presencia de conexiones sinápticas comisurales (Ezure, 1990; Zheng et al., 1998; McCrimmon et al., 2000; Okazaki et al., 2001; Shen y Duffin, 2002; Funke et al., 2007). Smith y cols., (2001), demostraron que el preBötC también es suficiente para generar el ritmo respiratorio, debido a que una rebanada de tallo cerebral que contiene a este circuito mantiene la generación del ritmo respiratorio de manera estable (Smith et al., 1991). De este modo, se puede aislar y mantener al preBötC en una rebanada de tallo cerebral y registrar, sobre la superficie de la misma, la actividad respiratoria que se genera espontáneamente y se propaga a través del GRV (Fig. 5; Smith et al., 1991). Utilizando esta preparación, es posible investigar los mecanismos neuronales de la generación y el control de la actividad respiratoria mediante el uso de técnicas electrofisiológicas, moleculares y de imagenología (Smith et al., 1991; Koshiya y Smith, 1999; Peña et al., 2004; Thoby-Brisson et al., 2005; Funke et al., 2007; Koizumi y Smith, 2008; Gray et al., 2010). Dentro de esta rebanada de tallo cerebral, no sólo se encuentra el preBötC, sino también se encuentran el núcleo trigémino espinal (NTE), el núcleo del nervio vago (X), la oliva inferior (OI), el núcleo ambiguo (NA) y el núcleo del nervio hipoglosa (XII; Fig 5. Smith et al., 1991).

Como ya se mencionó, el hecho de que el preBötC se pueda aislar y, aun así, mantenga su actividad rítmica, demuestra que este núcleo es intrínsecamente ritmogénico y que es suficiente para la generación del ritmo respiratorio (Smith et al., 1991; Smith et al., 2000). Posteriormente, este paradigma de suficiencia se corroboró al mostrar que una “isla” extraída de la rebanada de tallo cerebral, que contiene casi exclusivamente al preBötC, es capaz de seguir generando el ritmo respiratorio (Figura 5C; Johnson et al., 2001; Tryba et al., 2008; Ramírez-Jarquín et al., 2012).

Bajo condiciones *in vivo*, también se ha demostrado el papel esencial del preBötC en la generación del ritmo respiratorio (Ramirez et al., 1998b; Gray et al., 2001; Wenninger et al., 2004b; Wenninger et al., 2004a; McKay et al., 2005; Tan et al., 2008). En un estudio realizado por Ramirez y cols., (1998b) se observó que cuando se reduce la actividad del preBötC de gatos, mediante el bloqueo de canales de calcio tipo N y de canales de sodio, se elimina la actividad respiratoria de estos animales (Ramirez et al., 1998b). Además, se ha reportado que la eliminación de las neuronas del preBötC, específicamente, aquellas que expresan el receptor a sustancia P (NK1R), produce alteraciones en la generación de la respiración en ratas (Gray et al., 2001; McKay et al., 2005) y cabras (Wenninger et al., 2004a). Esta manipulación incluso puede conducir a la desaparición total de la actividad respiratoria de cabras (Wenninger et al., 2004b). Finalmente, cuando se deprimen las neuronas somatostatinérgicas del preBötC en ratas despiertas, se induce la aparición de episodios de apnea, que pueden llegar a ser fatales (Tan et al., 2008).

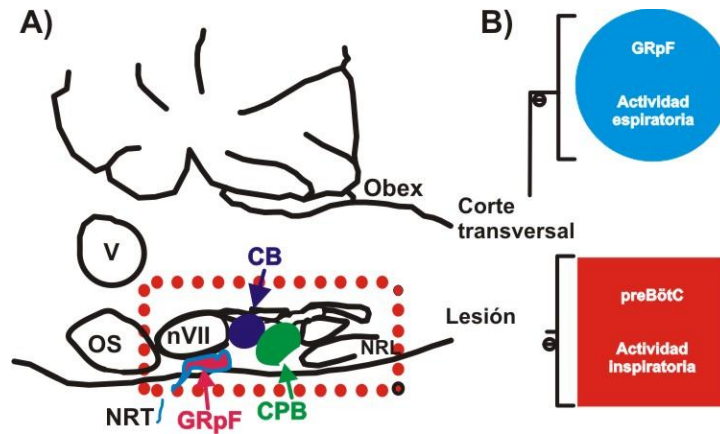


**Figura 5. Representación de la rebanada que contiene al preBötC obtenida mediante cortes transversales del tallo cerebral.** A) Fotografía que muestra el tallo cerebral, las líneas punteadas denotan la altura a la que se realizan los cortes transversales necesarios para obtener una rebanada del tallo cerebral que contiene al preBötC y otros núcleos neuronales. B) Representación esquemática de la rebanada obtenida del tallo cerebral sobre la que se realizan diferentes tipos de registros electrofisiológicos. Se muestran los diferentes núcleos que se encuentran en esta preparación. Nótese que a partir de esta rebanada es posible obtener una “isla del preBötC”, que contiene casi exclusivamente neuronas del preBötC. XII, núcleo del nervio hipogloso; X, núcleo del nervio vago; OI, oliva inferior; VII, núcleo facial; NTE, núcleo trigémino espinal; preBötC, complejo preBötzinger.

Además del preBötC, se ha propuesto la existencia de otro núcleo generador de la respiración (Onimaru y Homma, 2003), que está formado por un conjunto de neuronas pre-inspiratorias (Pre-I) que, como su nombre lo indica, producen actividad previa a la inspiración (aunque también generan actividad durante la post-inspiración) (Onimaru y Homma, 2003). Estas neuronas Pre-I conforman al grupo respiratorio parafacial (GRpF) (Fig 6; Mellen et al., 2003; Onimaru y Homma, 2003). Los dos generadores de la respiración, el preBötC y el GRpF, se distinguen por las diferencias en su localización dentro del bulbo raquídeo ventrolateral, la temporalidad de su disparo y en su sensibilidad farmacológica (Gray et al., 1999; Takeda et al., 2001; Mellen et al., 2003; Feldman y Del Negro, 2006; Janczewski y Feldman, 2006). Las neuronas del GRpF se ubican, respecto al preBötC, en una zona más rostral del bulbo raquídeo ventrolateral (Feldman y Del Negro, 2006; Janczewski y Feldman, 2006). Además, la actividad eléctrica de la mayoría de las neuronas del GRpF se genera previo a la inspiración, de ahí que se les denomina pre-inspiratorias, aunque posteriormente también generan actividad durante la post-inspiración (Onimaru y Homma, 2003; Feldman y Del Negro, 2006), mientras que las neuronas del preBötC generan su actividad en fase con la inspiración (Smith et al., 1991; Lieske et al., 2000; Peña et al., 2004). Finalmente, las neuronas inspiratorias del preBötC se hiperpolarizan ante la presencia de agonistas de receptores a opioides, mientras que las neuronas del GRpF no se inhiben por estos agonistas (Gray et al., 1999; Takeda et al., 2001; Mellen et al., 2003).

La importancia de ambos núcleos sobre la generación del ritmo respiratorio ha sido ampliamente debatida (Mellen et al., 2003; Feldman y Del Negro, 2006; Janczewski y Feldman, 2006). Por un lado, Mellen y cols., (2003) propusieron que ambos generadores podrían interactuar conjuntamente para formar un sistema acoplado, de modo que las neuronas del GRpF interactúan de manera bidireccional con las neuronas del preBötC para generar el ritmo respiratorio (Mellen et al., 2003). Por otra parte, Janczewski y Feldman (2006), demostraron en ratas jóvenes, *in vivo*, que ambos núcleos están normalmente acoplados pero que pueden funcionar independientemente (Janczewski y Feldman, 2006). Esto se confirmó cuando se eliminó o se lesionó el preBötC, mediante un corte en la parte más caudal, y se observó que la respiración deja de generarse. Sin embargo, cuando se realiza un corte transversal entre ambos núcleos (en una zona más rostral), la actividad espiratoria se elimina y la actividad inspiratoria se continua generando sin presentar cambios (Janczewski y Feldman, 2006). Actualmente, se propone que el GRpF y el preBötC dirigen

la actividad espiratoria e inspiratoria, respectivamente (Fig. 6; Feldman y Del Negro, 2006; Janczewski y Feldman, 2006).



**Figura 6. Organización de los circuitos generadores del ritmo respiratorio localizados en el tallo cerebral.** A) Representación esquemática de una vista sagital del tallo cerebral que muestra la ubicación del grupo respiratorio parafacial (GRpF) y del complejo preBötzing (preBötC). B) Actualmente, se sugiere que el GRpF genera la actividad espiratoria, y que el preBötC genera la actividad inspiratoria. Cuando se elimina o se lesiona el preBötC la respiración no se genera (modificado de Janczewski y Feldman, 2006; y de Feldman y Del Negro, 2006). V, núcleo motor del trigémino; OS, oliva superior, nVII, núcleo facial; NRT, núcleo retrotrapezoide, CB, complejo Bötzing, NRL, núcleo reticular lateral; preBötC, complejo preBötzing.

### Ritmos respiratorios generados por el preBötC.

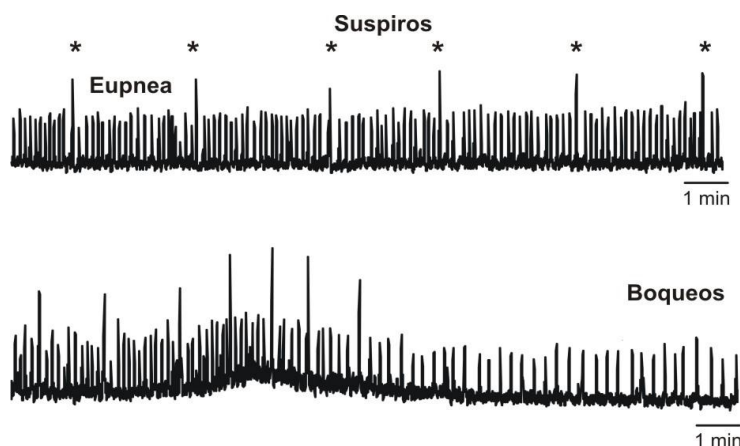
La actividad respiratoria generada por el preBötC se registra mediante técnicas electrofisiológicas. A partir de la integración electrónica de esta actividad se observan ráfagas en forma de campana de la actividad respiratoria poblacional (Smith et al., 1991; Lieske et al., 2000; Peña et al., 2004). El análisis de la cinética de estas ráfagas respiratorias permite identificar distintos tipos de actividad eléctrica asociados con los distintos ritmos respiratorios generados por el preBötC: la eupnea, los suspiros y los boqueos.

Lieske y cols., (2000) demostraron que el preBötC, en condiciones *in vitro*, genera tres ritmos respiratorios diferentes que correlacionan con los ritmos observados *in vivo* (Lieske et al., 2000; Garcia et al., 2011). Los ritmos respiratorios generados por el preBötC en condiciones de normoxia, son la eupnea y los suspiros; mientras que en condiciones de hipoxia el preBötC genera los boqueos (Fig. 7). A continuación, se explican las características de cada uno de estos ritmos:

La eupnea o respiración normal: *In vivo*, es un patrón observado bajo condiciones fisiológicas que se caracteriza por una activación paulatina de los músculos respiratorios (Ezure, 1990; Bianchi et al., 1995; Peña y Aguilera, 2007; Peña, 2008). Bajo condiciones *in vitro*, y de oxigenación normal (normoxia), se presenta como ráfagas de pequeña amplitud y con forma de campana (Fig. 8 A; Lieske et al., 2000). Los tipos de actividad neuronal involucrados en la generación de la eupnea incluyen células pre-inspiratorias, inspiratorias y células espiratorias (Lieske et al., 2000). Además, la transmisión sináptica inhibitoria es de gran importancia para la generación de las distintas fases del ritmo respiratorio y para establecer las diferentes características de la eupnea (Abdala et al., 2009; Rubin et al., 2009; Smith et al., 2009; Baekey et al., 2010; Ramirez et al., 2011). Esto pudiera deberse a que la inhibición sináptica regula la actividad de las neuronas marcapaso del preBötC, tanto en la fase de la inspiración como de la espiración (Ramirez et al., 1997; Ramirez et al., 2011).

Los suspiros: Este ritmo respiratorio se presenta como una inspiración de mayor amplitud, comparada con la eupnea (Fig. 7). Se caracteriza por una ráfaga bifásica que, inicialmente, es idéntica a las ráfagas de la eupnea y continúa con una fase diferente, de mayor amplitud que la eupnea (inspiración aumentada) (Lieske et al., 2000). Además, comúnmente después de un suspiro se presenta un periodo de apnea post-suspiro, que se caracteriza por una espiración prolongada (Fig. 8 A; Orem y Trotter, 1993; Feldman y Gray, 2000; Peña y Aguilera, 2007; Peña, 2008). En condiciones *in vitro*, los suspiros también se presentan como ráfagas bifásicas, que inician de manera similar a la eupnea y terminan con una fase de mayor amplitud que la eupnea. Generalmente también, después de cada suspiro se presenta un periodo de apnea post-suspiro (Fig. 8 A), tal y como se observa en condiciones *in vivo*. Finalmente, este ritmo es esencial para el mantenimiento de la función pulmonar ya que diversos estudios proponen que los suspiros podrían funcionar como un *reset* del sistema respiratorio (Vlemingx et al., 2009; Vlemingx et al., 2010a; Vlemingx et al., 2010b). Se propone también que los suspiros evitan condiciones de atelectasis, es decir, evitan que algunas porciones de los pulmones se colapsen y que no sean capaces de extenderse completamente (Vlemingx et al., 2009; Vlemingx et al., 2010a; Vlemingx et al., 2010b). De este modo, la generación de los suspiros ayuda a mantener el funcionamiento de los pulmones al evitar la atelectasis, la rigidez del tejido pulmonar y de las paredes aéreas (Vlemingx et al., 2009; Vlemingx et al., 2010a; Vlemingx et al., 2010b).

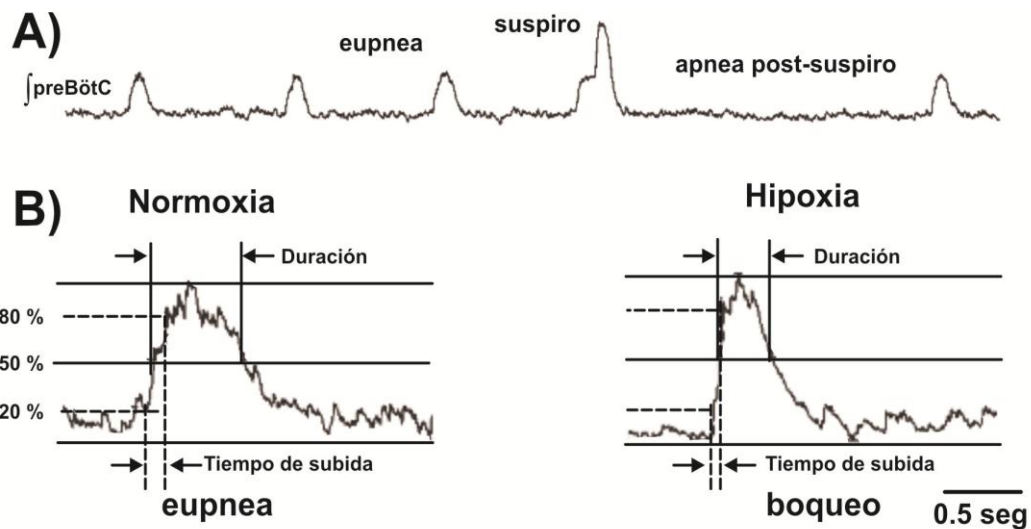
Los boqueos: En condiciones *in vivo*, los boqueos se generan cuando se presentan condiciones de hipoxia prolongada y se les caracteriza por una activación súbita de los músculos inspiratorios sin actividad espiratoria asociada (St-John, 1998). La respuesta respiratoria a la hipoxia produce un incremento inicial en la frecuencia y amplitud de la respiración (apnea y suspiros) (Richter et al., 1991; Haddad y Jiang, 1993; Lieske et al., 2000; Maxová y Vízek, 2001; Peña y Ramirez, 2005; Ramirez et al., 2007), que es seguida, si las condiciones hipóxicas se mantienen, por una segunda fase de depresión respiratoria en la que se disminuye tanto la frecuencia como la amplitud de las ráfagas respiratorias y se generan los boqueos (Lieske et al., 2000). Como ya se mencionó, los boqueos se caracterizan por un patrón que consiste de una inspiración más profunda, de menor duración y de inicio más rápido (Fig. 8 B) y por no presentar espiración subsecuente (Lieske et al., 2000; Peña y Ramirez, 2005; Ramirez et al., 2007). Los boqueos, en comparación con la eupnea, también se presentan con menor frecuencia (Feldman y Gray, 2000; Peña y García 2006; Peña y Aguilera, 2007; Peña, 2008). Bajo condiciones *in vitro*, los boqueos se observan como ráfagas inspiratorias de corta duración, inicio súbito y de menor frecuencia, comparadas con la eupnea (Lieske et al., 2000) (Fig. 8 B), de la misma manera en que se observa en condiciones *in vivo* (Feldman y Gray; 2000; Lieske et al., 2000). Estas diferencias, se obtienen de la cuantificación de los parámetros de la cinética de las ráfagas, como son el tiempo de subida, la duración media y la frecuencia (Lieske et al., 2000). Todos éstos parámetros son disminuidos en condiciones de hipoxia, comparados con la eupnea (Fig. 8 B; Lieske et al., 2000).



**Figura 7. Generación de diferentes patrones respiratorios por el preBötC en diferentes condiciones de oxigenación.** Bajo condiciones de normoxia (trazo superior) se generan dos ritmos respiratorios: la eupnea y los suspiros, marcados con \*. Cuando el preBötC se encuentra en condiciones hipóxicas (trazo inferior) sufre un proceso de reconfiguración y genera un incremento en la frecuencia de la respiración. Después de esto, se producen los boqueos.



Todos los ritmos respiratorios mencionados previamente se generan por el mismo circuito neuronal (el preBötC), por lo que se sugiere que este núcleo podría sufrir un proceso de reconfiguración que le permite alternar de la generación de un ritmo respiratorio a otro (Lieske et al., 2000). Se ha propuesto que este circuito neuronal es capaz de realizar un rearrreglo funcional durante las condiciones hipóxicas, que incluye cambios tanto en las propiedades intrínsecas neuronales como en las propiedades de transmisión sináptica, lo que le permite producir los diferentes patrones respiratorios dependiendo del nivel de oxigenación presente en el medio (Figs. 7 y 8; Lieske et al., 2000; Peña et al., 2004).



**Figura 8. Diferencias entre los patrones de las ráfagas correspondientes a los diferentes ritmos respiratorios.** A) Se muestran la eupnea y los suspiros generados en condiciones de normoxia. Nótese que el suspiro es bifásico y que comienza igual que la eupnea y después se genera una actividad inspiratoria más profunda. Después de esto, se genera un periodo de apnea, denominado apnea post-suspiro. B) Diferencias del patrón respiratorio entre la eupnea (izquierda) y el boqueo (derecha). Los principales parámetros afectados por la hipoxia son la duración y el tiempo de subida de la ráfaga inspiratoria. Ambos, se reducen en estas condiciones. Modificado de Lieske et al., 2000.

### La hipoxia.

El oxígeno ( $O_2$ ) es esencial para la supervivencia de las células de todos los organismos aerobios por su participación como receptor final de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial (Richter et al., 1992; Bianchi et al., 1995; Feldman, 1995; Gnaiger, 2001; Peña y García, 2006). Así, la vida de diversos organismos depende de que realicen un intercambio gaseoso adecuado, que consiste en capturar  $O_2$  y remover el  $CO_2$  del cuerpo (Trés Guerres, 1999; Guyton y Hall, 2006;

Barret et al., 2010), pues, la ausencia de O<sub>2</sub> puede conducir a la muerte del organismo (Trés Guerres, 1999; Guyton y Hall, 2006; Barret et al., 2010). Es por esto que los seres vivos han desarrollado diversas estrategias para mantener niveles óptimos de oxigenación, así como para detectar variaciones en los niveles de O<sub>2</sub> y responder adecuadamente ante estos cambios (Peña y Ramirez, 2005; Peña y García, 2006; Ramirez et al., 2007). La condición hipóxica se puede generar por una disminución en la presión parcial de O<sub>2</sub> del medio ambiente, por un transporte inadecuado del O<sub>2</sub>, o por una deficiencia de los tejidos para utilizar el O<sub>2</sub> (Peña y Ramirez, 2005; Peña y García, 2006; Ramirez et al., 2007). Todo esto, se asocia a diversas condiciones patológicas que pueden conducir a disfunciones respiratorias como: 1) apneas de sueño, en las que se interrumpe la respiración por periodos de, al menos 10 segundos, mínimo 5 veces por cada hora de dormir (Hui et al., 2000; Peña y García, 2006); 2) síndrome de hipoventilación congénita, que se asocia con un control autónomo erróneo, o ausente, de la respiración mientras se duerme, pero el control voluntario de ésta se mantiene intacto mientras se está despierto (Peña y García, 2006; Weese-Mayer et al., 2009); 3) depresión respiratoria inducida por drogas, en la que drogas como el alcohol, los analgésicos, los narcóticos, los barbitúricos y las benzodiazepinas pueden afectar los centros generadores de la respiración y, como consecuencia, disminuir la respiración (Brailowsky y García, 1999; Peña y García, 2006); 4) síndrome de hipoventilación por obesidad; que se presenta en niños obesos. Estos niños tienen somnolencia excesiva durante el día, fatiga y dolores de cabeza diurnos (Olson y Zwillich, 2005; Peña y García, 2006); 5) síndrome de Rett en el que se observa una respiración arrítmica que presenta transiciones entre periodos de hiperventilación e hiperventilación de manera caótica (Elian y Rudolf, 1991; Kerr, 1992; Peña y García, 2006); y 6) síndrome de muerte súbita del lactante (SMSL), que es la mayor causa de muerte en niños de hasta un año de edad y que se ha asociado a una disminución para la generación de boqueos (Willinger et al., 1991; Poets et al., 1999; Thach, 2005; Peña y García, 2006; Thach, 2008; Kinney y Thach, 2009).

### **Respuesta cerebral a la hipoxia.**

Como se mencionó antes, la vida de los organismos aerobios depende de una adecuada disponibilidad de oxígeno, así como de su uso apropiado (Trés Guerres, 1999; Guyton y Hall, 2006; Barret et al., 2010). De aquí la importancia de que estos seres vivos generen respuestas adaptativas

a condiciones ambientales adversas, como son las condiciones hipóxicas. Sin embargo, la respuesta a la hipoxia no es homogénea sino que depende del tipo de hipoxia al que se enfrente el organismo, del estado de salud y de la edad del mismo (Peña y Ramirez, 2005). Además, las diversas funciones neuronales se regulan de una manera heterogénea ante la hipoxia (Peña y Ramirez, 2005; Ramirez et al., 2007). Por ejemplo, se ha reportado que cuando se presentan condiciones de hipoxia aguda, que dura de segundos a minutos, las funciones cerebrales que no se requieren para la supervivencia del organismo (Rossen et al., 1943; Bachevalier y Meunier, 1989; Peña y Ramirez 2005) como aquellas que generan la conciencia (Rossen et al., 1943; Bachevalier y Meunier, 1989; Peña y Ramirez 2005) y la conducta dirigida (Rossen et al., 1943; Bachevalier y Meunier, 1989; Peña y Ramirez 2005), se inhiben; mientras que aquellas funciones neuronales que sí son esenciales para la supervivencia, como la respiración, se mantienen (Peña y Ramirez, 2005; Ramirez et al., 2007). Esta adaptación fisiológica es el resultado de una compleja coordinación, reorganización y bloqueo parcial de diferentes sistemas de órganos, que, además, se complementa con una reconfiguración a nivel celular (Luhman y Heinemann, 1992; Young y Somjen, 1992; Peña et al., 2004; Ramirez et al., 2004). Esta reorganización se genera por la necesidad de reducir los requerimientos de O<sub>2</sub> y de prevenir el daño celular a los diferentes circuitos neuronales; y, de este modo, mantener la integridad funcional de los organismos (Ramirez y Peña, 2005; Ramirez et al., 2007). A nivel celular, las modificaciones que sufren los circuitos neuronales durante condiciones hipóxicas se deben, generalmente, a cambios tanto en las propiedades intrínsecas de las neuronas (Peña et al., 2004; Ramírez et al., 2004; Luhmann y Heinemann, 1992; Young y Somjen, 1992), como en la transmisión sináptica entre ellas (Katchman y Hershkowitz, 1993; Gervitz et al., 2001; Fowler et al., 2003; Gervitz et al., 2003; Peña et al., 2004; Peña y Ramirez, 2005; Peña y García, 2006; Ramirez et al., 2007). Generalmente, la hipoxia afecta diversos procesos celulares simultáneamente, lo que genera una respuesta compleja en los distintos circuitos neuronales (Peña y Ramirez, 2005). Aunque la mayoría de los tipos neuronales dejan de disparar potenciales de acción en condiciones hipóxicas, existen algunas poblaciones neuronales que son más resistentes a la hipoxia (Peña et al., 2004; Peña y Ramirez, 2005). La inhibición del disparo neuronal podría ser una estrategia para disminuir la actividad del circuito neuronal, y así disminuir la demanda metabólica (Peña y Ramírez, 2005). Además, podría evitar consecuencias dañinas (como la muerte celular) producidas por la hipoxia (Peña y Ramírez, 2005). Por ejemplo, una entrada excesiva de calcio al interior celular o un periodo de excitotoxicidad, que son procesos altamente dañinos para las células, podrían ser prevenidos

mediante una disminución de la actividad neuronal durante la hipoxia (Brady et al., 2012, Peña y Ramirez, 2005). Sin embargo, sería igualmente de dañino para el organismo que todas las neuronas detuvieran su actividad, por lo que es de gran importancia que existan tipos neuronales resistentes a la hipoxia (Peña y Ramirez, 2005), como es el caso de muchas de las neuronas involucradas en la respiración (Peña et al., 2004; Peña y Ramirez, 2005).

Los efectos de la hipoxia sobre los distintos grupos neuronales pueden deberse a sus efectos sobre algunos canales iónicos que incluyen canales de  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  (Cummins et al., 1993; Jiang y Haddad, 1994; Belousov et al., 1995; O'Reilly et al., 1997; Yamamoto et al., 1997; Erdemli et al., 1998; Hammarstrom y Gage, 1998; Mironov et al., 1998; Nowicky y Duchon 1998; Kawai et al., 1999; Liu et al., 1999; Mironov y Richter, 1999; Hammarstrom y Gage, 2000; Horn y Waldrop, 2000; Mazza et al., 2000; Mironov y Richter, 2000; Shan y Cheng, 2000; Zavar y Neumcke, 2000; Fleidervish et al., 2001; Haller et al., 2001; Yamada et al., 2001; Hammarstrom y Gage, 2002; Plant et al., 2002; Campanucci et al., 2003; Lukyanetz et al., 2003a; Lukyanetz et al., 2003b; Park et al., 2003). Entre los canales de  $K^+$  afectados por la hipoxia se encuentran los canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  ( $IK_{Ca}$ ), los canales de  $K^+$  dependientes de ATP ( $IK_{ATP}$ ) y los canales de fuga (Mironov et al., 1998; Mironov y Richter, 2000; Shan y Cheng, 2000; Zavar y Neumcke, 2000; Fleidervish et al., 2001; Haller et al., 2001; Yamada et al., 2001; Park et al., 2003). La participación de los canales  $IK_{ATP}$  en la depresión neuronal durante la hipoxia se ha reportado en neuronas corticales (Fleidervish et al., 2001), hipocampales (Shan y Cheng, 2000; Zavar y Neumcke, 2000), de la sustancia nigra (Yamada et al., 2001), de la sustancia gelatinosa (Park et al., 2003) y neuronas respiratorias de la médula espinal (Mironov et al., 1998; Mironov y Richter, 2000; Haller et al., 2001). Por otra parte, la participación de los canales  $IK_{Ca}$ , en este mismo proceso se ha observado en neuronas piramidales del hipocampo (Belousov et al., 1995; Yamamoto et al., 1997; Erdemli et al., 1998; Nowicky y Duchon 1998), neuronas neocorticales (Jiang y Haddad, 1994; Liu et al., 1999) y neuronas de la sustancia nigra (Jiang y Haddad, 1994). Finalmente, se ha observado que los canales de fuga, se inhiben en neuronas del cerebelo (Plant et al., 2002) y neuronas glossofaríngeas (Campanucci et al., 2003) en condiciones hipóxicas. En relación a los canales de  $Na^+$ , la hipoxia incrementa la corriente persistente de sodio ( $INa_P$ ) en neuronas del hipocampo (Hammarstrom y Gage, 1998; Hammarstrom y Gage, 2000; Hammarstrom y Gage, 2002) y del hipotálamo (Horn y Waldrop, 2000). Sin embargo, también se ha observado una disminución de esta corriente iónica en

neuronas del hipocampo (O'Reilly et al., 1997), de la corteza cerebral (Cummins et al., 1993) y en neuronas respiratorias (Mironov y Richter, 1999). Finalmente, los canales de  $Ca^{2+}$  que se modulan por la hipoxia son los canales tipo L. Estos canales se activan en condiciones de hipoxia en neuronas del tallo cerebral (Kawai et al., 1999; Mazza et al., 2000) y del hipocampo (Lukyanetz et al., 2003a; Lukyanetz et al., 2003b).

Las condiciones hipóxicas también producen cambios en la transmisión sináptica de los circuitos neuronales. Generalmente, bajo estas condiciones se deprime la actividad sináptica de las redes neuronales, tanto *in vivo* (Erdemli y Crunelli, 1998; Hammarstrom y Gage, 1998; Mironov y Richter, 1999; Kulik et al., 2000) como *in vitro* (Luhmann y Heinemann, 1992; Jha y Deshpande, 2003; Deshpande y Jha, 2004). Esta depresión sináptica tiene como consecuencia una reducción del número total de neuronas activas del circuito neuronal (Peña y Ramirez, 2005). A diferencia de los efectos de la hipoxia sobre las propiedades intrínsecas, sus efectos sobre la transmisión sináptica son constantes en diversas áreas del cerebro como el hipocampo (Gervitz et al., 2003; Frenguelli et al., 2003; Pearson y Frenguelli, 2004), la corteza cerebral (Hentschel et al., 2003), el estriado (Centonze et al., 2001), el tallo cerebral (Richter et al., 1991; Pierrefiche et al., 1997; Lieske et al., 2000; Pascual et al., 2002) y la espina dorsal (Park et al., 2003; Deshpande y Jha, 2004). Los efectos depresores de la hipoxia sobre la transmisión sináptica se han observado en varios sistemas neurotransmisores como el glutamatérgico (Hammond et al., 1994; Coelho et al., 2000; Frenguelli et al., 2003; Hellweg et al., 2003; Perason y Frenguelli, 2004;), el GABAérgico (Rosen y Morris, 1993; Hammond et al., 1994; Centonze et al., 2001) y el colinérgico (Kasa et al., 1997; Porkka-Heiskanen et al., 1997).

### **Respuesta respiratoria a la hipoxia.**

Como ya se mencionó, cuando un organismo aerobio se encuentra en condiciones hipóxicas, la respuesta del sistema respiratorio consiste de dos fases (Fig. 7; Richter et al., 1991; Haddad y Jiang, 1993; Maxová y Vízek, 2001). En la primera fase, se incrementa la frecuencia y la amplitud, tanto de la eupnea como de los suspiros (Fig. 7; Lieske et al., 2000; Peña y Ramirez, 2005). En la segunda fase, se deprime la frecuencia y la amplitud de la respiración, lo que

posteriormente lleva a la generación de los boqueos (Lieske et al., 2000; Peña y Ramirez, 2005; Ramirez et al., 2007). Si el periodo de hipoxia es prolongado, la actividad respiratoria cesa (apnea hipóxica) y conduce irreversiblemente a la muerte del organismo (Lieske et al., 2000; Peña y Ramirez, 2005; Ramirez et al., 2007). Sin dejar de lado la participación de los quimiorreceptores periféricos, existe evidencia de que esta respuesta bifásica de la respiración a la hipoxia tiene un sustrato a nivel del SNC (Solomon, 2004; Solomon 2005). Bajo condiciones *in vitro*, también se observa la respuesta bifásica a las condiciones hipóxicas en el preBötC (Mironov et al., 1998; Telgkamp y Ramirez, 1999; Lieske et al., 2000; Thoby-Brisson y Ramirez, 2000; Peña et al., 2004). En mamíferos neonatos, la red neuronal respiratoria es muy resistente a la hipoxia (Ballanyi et al., 1994; Ramirez et al., 1996; Richter et al., 1999) y este comportamiento se mantiene en preparaciones *in vitro* de estos animales en las que el ritmo respiratorio persiste durante minutos e incluso horas (Greer y Carter, 1995; Volker et al., 1995; Ramirez et al., 1996; Ballanyi K et al., 1999). Contrario a esto, la red neuronal respiratoria de animales maduros, es menos resistente a la hipoxia (Neubauer et al., 1990; England et al., 1995), lo que también se reproduce en las preparaciones *in vitro* de animales maduros, donde la actividad respiratoria cesa después de un periodo hipóxico corto (minutos) (Ramirez et al., 1996).

Se sabe que la generación del ritmo respiratorio en condiciones normales de oxigenación depende de poblaciones heterogéneas de neuronas marcapaso y de sus interacciones sinápticas con el resto del circuito neuronal, mientras que en condiciones hipóxicas, la generación del ritmo depende prácticamente de solo un tipo de neuronas marcapaso, aquellas que dependen de la corriente persistente de sodio (Peña et al., 2004). Bajo condiciones de hipoxia, la dependencia del circuito neuronal a una sola población de neuronas, específicamente a una conductancia, deja a la red respiratoria vulnerable y hace de la generación de boqueos el último esfuerzo respiratorio. Esto es de gran importancia, porque los boqueos incrementan la apertura de las vías respiratorias, aún cuando los organismos se encuentran en condiciones hipóxicas. Además, los boqueos son esenciales para el proceso de la autorresucitación (Fewell et al., 2000; Gozal et al., 2002). El proceso de autorresucitación es un mecanismo primordial para promover la sobrevivencia del organismo a condiciones hipóxicas, ya que permite que el organismo se recupere de periodos de apnea, mediante la generación de boqueos (Erickson y Sposato, 2009). Un requisito indispensable para generar la autorresucitación es la generación de boqueos (Thach 1983; Hunt, 1992; Poets et

al., 1999; Harper et al., 2000; Gozal et al., 2002; Erickson y Sposato, 2009) ya que éstos sirven para reestablecer el suministro de oxígeno al cerebro después de un periodo de apnea (Gershan et al., 1990; Gershan et al., 1992). De aquí que la generación adecuada de los boqueos es primordial para la supervivencia de los organismos en condiciones hipóxicas (Thach 1983; Hunt, 1992; Poets et al., 1999; Harper et al., 2000; Gozal et al., 2002; Erickson y Sposato, 2009). Se ha propuesto que fallas en la generación de boqueos y de la autorresucitación podrían estar relacionadas con el síndrome de muerte súbita del lactante de humanos (SMSL; Hunt, 1992; Poets et al., 1999; Harper et al., 2000; Gozal et al., 2002).

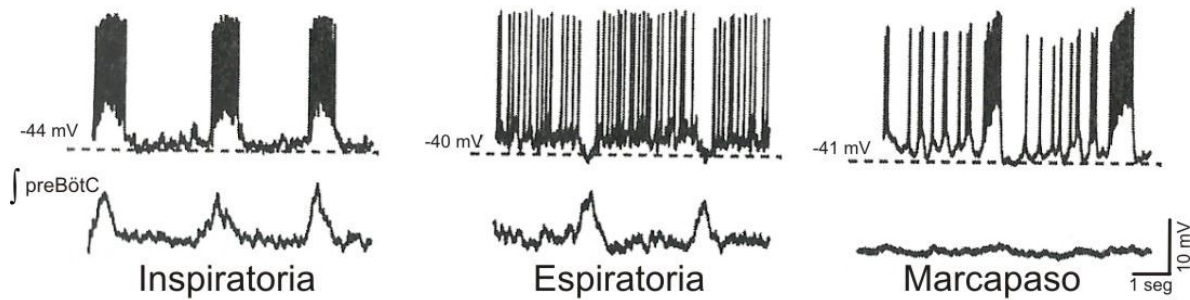
Aunque el mecanismo específico y preciso que explique el SMSL se desconoce, una de las principales hipótesis menciona que los niños que fallecen por este padecimiento presentan una incapacidad para generar boqueos, a pesar de que respiran normalmente en condiciones de normoxia. La capacidad disminuida para generar boqueos trae como consecuencia la falla en el proceso de autorresucitación y la muerte del bebé por asfixia (Hunt, 1992; Poets et al., 1999; Harper et al., 2000; Gozal et al., 2002).

### **La generación del ritmo respiratorio.**

Hasta la fecha, se han propuesto diversos modelos para explicar la generación del ritmo respiratorio por el preBötC (Richter y Spyer, 2001) entre las que se encuentran: la teoría de la red respiratoria condicional (Richter et al., 1992; Ramirez y Richter, 1996; Richter, 1996), la teoría de marcapasos (Feldman et al., 1991; Funk y Feldman, 1995; Koshiya y Smith, 1999), el modelo híbrido de marcapasos-red respiratoria (Butera et al., 1999a; Butera et al., 1999b; Smith et al., 2000) y el modelo de la red respiratoria dependiente de la maduración (Büsselberg et al., 2001). Actualmente, se propone que el ritmo respiratorio se genera por una interacción compleja entre diferentes neuronas marcapaso y no-marcapaso, las propiedades intrínsecas de membrana de éstas y la transmisión sináptica, tanto excitadora (glutamatérgica) como inhibidora (GABAérgica y glicinérgica) (Ramírez et al., 1997; Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2005; Feldman y Del Negro, 2006; Peña y Aguilera, 2007; Peña, 2008), además, se propone que dicho fenómeno no es fijo sino que puede variar de inspiración a inspiración (Carroll et al., 2012). Como ya se mencionó, el preBötC contiene

diferentes poblaciones de neuronas que se clasifican como inspiratorias, espiratorias y post-inspiratorias (Richter et al., 1991; Greer y Carter, 1995; Lieske et al., 2000; Peña y Ramirez, 2002; Peña et al., 2004; Peña y Ramirez, 2004), que se conectan mediante una inhibición y excitación recíprocas (Richter et al., 1991; Lieske et al., 2000; Peña y Ramirez, 2004). La excitación es necesaria para el proceso de sincronización del circuito (Smith et al., 1991; Koshiya y Smith, 1999), mientras que la inhibición es esencial para establecer las tres fases del ritmo respiratorio (la inspiración, la post-inspiración y la espiración) (Richter et al., 1991; Ballanyi et al., 1999; Lieske et al., 2000; Thoby-Brisson y Ramirez, 2001). Algunos estudios *in vitro* han demostrado que la inhibición no es necesaria para la generación del ritmo respiratorio (Lieske et al., 2000; Lieske et al., 2001; Ramirez y Lieske, 2003). En ausencia de transmisión sináptica inhibitoria las neuronas espiratorias pierden su ritmo y comienzan a disparar de manera tónica (Thoby-Brisson y Ramirez, 2000), las neuronas post-inspiratorias disparan ráfagas de potenciales de acción en fase con la inspiración y las neuronas inspiratorias continúan disparando de manera rítmica (Shao y Feldman, 1997; Lieske et al., 2000; Lieske et al., 2001; Ramirez y Lieske, 2003). Esto indica que la transmisión sináptica inhibitoria no se requiere para la generación del ritmo respiratorio y sugiere que este ritmo podría depender de la actividad de neuronas marcapaso (Smith et al., 1991; Koshiya y Smith, 1999). Para los fines de esta tesis, se identificará a las neuronas marcapaso como aquellas neuronas que son capaces de generar ráfagas de potenciales de acción de manera intrínseca y en ausencia de transmisión sináptica (Fig. 9; Koshiya y Smith, 1999; Smith et al., 2000; Thoby-Brisson y Ramirez, 2001; Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2005). Actualmente se conocen, por lo menos, dos tipos de neuronas marcapasos que se distinguen por sus propiedades electrofisiológicas (Thoby-Brisson y Ramirez, 2000; Peña y Ramirez, 2002; Peña et al., 2004; Peña y Ramirez, 2004; Del Negro et al., 2005), y que son esenciales para la generación de un patrón respiratorio normal (Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2005; Peña y Ramirez, 2005). En condiciones normales de oxigenación, este núcleo de neuronas marcapaso se conecta mediante conexiones excitadoras glutamatérgicas (Smith et al., 1991; Koshiya y Smith, 1999; Peña y Ramirez 2005), aunque existe evidencia de que algunas de estas neuronas pueden ser glicinérgicas (Morgado-Valle et al., 2010).





**Figura 9. Diferentes tipos neuronales del preBötC.** Se muestran registros simultáneos de la actividad poblacional del preBötC (trazos inferiores) y de distintos tipos de neuronas de éste núcleo (trazos superiores). Respecto a su patrón de disparo, se identifican tres tipos de neuronas respiratorias: inspiratorias (izquierda), que disparan ráfagas de potenciales de acción en fase con el ritmo poblacional; espiratorias (en medio), que tienen actividad en contrafase con el ritmo poblacional; y marcapaso (derecha) que, siendo originalmente neuronas inspiratorias, mantienen la capacidad de generar ráfagas de potenciales de acción en ausencia de transmisión sináptica (nótese que el ritmo respiratorio ha sido eliminado por la aplicación de un coctel de antagonistas para receptores de glutamato, GABA y glicina). Tomado de Zavala-Tecuapetla, 2008.

En algunos estudios se ha demostrado que, si bien, la transmisión sináptica inhibitoria no se necesita para generar el ritmo respiratorio, sí se requiere para modular la actividad marcapaso y la generación de las fases del ritmo respiratorio (Tryba et al., 2003; Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2005). De hecho, se ha reportado que la inhibición sináptica inhibe la expresión de la actividad marcapaso de muchas neuronas respiratorias (Ramirez et al., 1996; Tryba et al., 2003; Ramirez et al., 2004) y que una disminución de la inhibición produce que muchas células post-inspiratorias generen sus disparos en fase con la inspiración (Lieske et al., 2000; Lieske et al., 2001; Ramirez et al., 2004). Se postula que la modulación inhibitoria podría ser muy importante para evitar que la actividad marcapaso lleve al circuito neuronal a un estado “superactivo” (Van Drongelen et al., 2003), aunque un exceso de la transmisión sináptica inhibitoria puede disminuir la actividad marcapaso dentro del preBötC a niveles que lleven al circuito a la hipoactividad (Ramirez et al., 2004; Ren et al., 2011).

Como ya se mencionó, las conexiones excitadoras son esenciales para generar la sincronización de la actividad neuronal respiratoria (Koshiya y Smith, 1999). La generación del ritmo respiratorio depende de la transmisión sináptica excitadora glutamatérgica, tanto tipo NMDA como no-NMDA (Funk y Feldman, 1995; Bianchi et al., 1995; Ramirez y Richter, 1996; Ramirez et al., 1997), ya que las conexiones entre muchas neuronas respiratorias, que están activas

simultáneamente, son predominantemente excitadoras y son mediadas por transmisión sináptica glutamatérgica (Greer et al., 1991; McCrimmon et al., 1995).

### **Generación de la eupnea y los boqueos: papel de las neuronas marcapaso.**

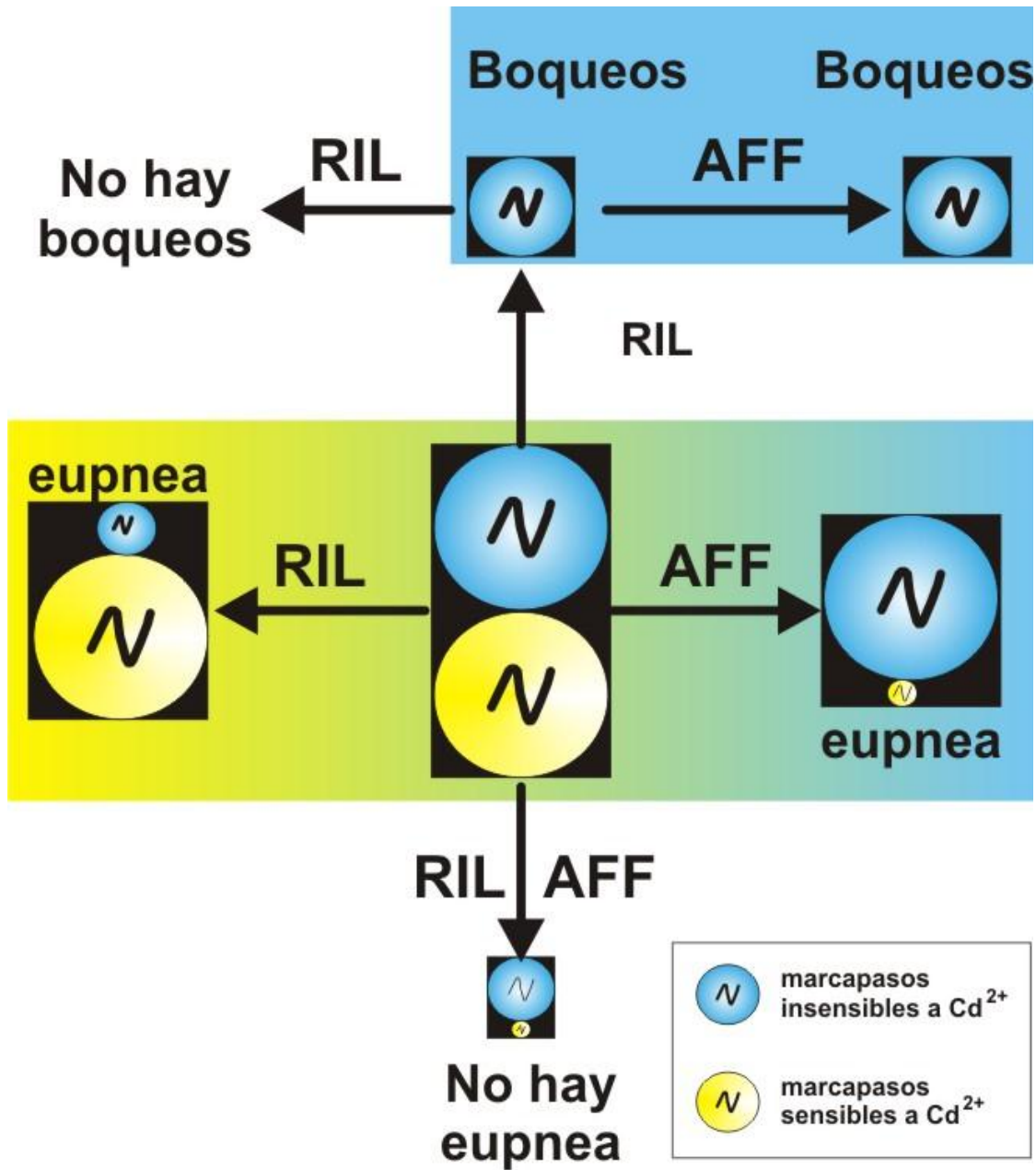
El preBötC contiene diferentes tipos de neuronas marcapaso que son esenciales para la generación del ritmo respiratorio (Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2005). En estudios realizados *in vitro* se determinó que estas neuronas tienen diferentes propiedades farmacológicas y de disparo (Thoby-Brisson y Ramirez, 2000; Peña y Ramirez, 2002; Peña y Ramirez, 2004; Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2005). Farmacológicamente, las neuronas marcapaso se clasifican en dos grupos: 1) neuronas insensibles al cadmio (Ins-Cd); y 2) neuronas sensibles al cadmio (Sen-Cd), que es un bloqueador inespecífico de los canales de  $Ca^{2+}$  (Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2005). El hecho de que los tipos de neuronas marcapaso sean diferencialmente sensibles a fármacos que bloquean corrientes iónicas indica que estos tipos neuronales tienen propiedades intrínsecas diferentes (Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2005). La actividad eléctrica de las neuronas marcapaso Ins-Cd depende de una corriente persistente de sodio; mientras que la actividad de la población Sen-Cd depende de una corriente catiónica activada por el  $Ca^{2+}$  (Thoby-Brisson y Ramirez, 2001; Peña et al., 2004). Por lo tanto, es posible bloquear la actividad eléctrica de las neuronas marcapaso Ins-Cd y las neuronas Sen-Cd, mediante la aplicación de riluzol (un bloqueador específico de la corriente persistente de sodio) y ácido flufenámico (AFF, un bloqueador de la corriente catiónica inespecífica activada por calcio), respectivamente (Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2005). Actualmente, se sabe que ambos tipos de neuronas marcapasos generan la actividad respiratoria bajo condiciones de oxigenación normal, tanto *in vitro* (Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2005) como *in vivo* (Peña y Aguilera, 2007).

En un estudio realizado por Peña y cols., (2004), se reportó que los dos tipos de neuronas marcapaso (las Ins-Cd y las Sen-Cd) participan en la generación del ritmo respiratorio bajo condiciones de normoxia (Peña et al., 2004) y que se necesita bloquear ambos tipos neuronales, con la co-aplicación de riluzol y de AFF, para eliminar la eupnea generada por el preBötC (Peña et al., 2004; Peña y Aguilera, 2007). Cuando solamente se bloquea la actividad de una población de

neuronas marcapaso, no se inhibe la generación del ritmo respiratorio (Peña et al., 2004; Peña y Aguilera, 2007), lo que sugiere que ambos tipos de neuronas marcapasos generan la eupnea *in vitro* (Fig. 10; Peña et al., 2004). Este mismo fenómeno se corroboró posteriormente *in vivo* (Peña y Aguilera, 2007; Peña, 2008).

En condiciones de hipoxia, el preBötC sufre un proceso de reconfiguración que se necesita para generar los boqueos (Lieske et al., 2000). En este proceso de reconfiguración, las neuronas marcapaso Sen-Cd y la mayoría de las neuronas no-marcapaso (Ramirez et al., 2001; Peña et al., 2004; Peña y Ramírez, 2005), disminuyen sus propiedades de disparo e inhiben su actividad eléctrica (Peña et al., 2004; Peña y Ramírez, 2005). Contrario a esto, las neuronas marcapaso Ins-Cd se mantienen intrínsecamente activas y continúan generando ráfagas de potenciales de acción, lo que sugiere que estas neuronas son las encargadas de generar el ritmo respiratorio en condiciones de hipoxia (Thoby-Brisson y Ramirez, 2000; Peña et al., 2004; Tryba et al., 2006). Esto se comprobó al bloquear la actividad de las neuronas Ins-Cd, con riluzol, y observar que bajo estas condiciones se elimina la generación de los boqueos, *in vitro* (Peña et al., 2004), *in situ* (Paton et al., 2006) e *in vivo* (Fig. 10; Peña y Aguilera, 2007). Además, de la corriente persistente de sodio y la corriente catiónica activada por calcio existen otras corrientes iónicas de las neuronas del preBötC que también se modifican por la hipoxia y contribuyen a la reconfiguración del circuito respiratorio (Mironov et al., 1998; Mironov y Richter, 1998; Mironov y Richter, 1999a; Mironov et al., 2000; Mironov y Richter, 2000; Peña y Ramirez, 2005). Por ejemplo, la amplitud de la corriente de  $Ca^{2+}$  tipo L de neuronas inspiratorias se incrementa bajo condiciones de hipoxia (Mironov y Richter, 1998), mientras que la corriente de  $Ca^{2+}$  tipo N es reducida por estas mismas condiciones (Elsen y Ramirez, 1998). La activación de la corriente tipo L de  $Ca^{2+}$  podría estar involucrada en la respuesta inicial (aceleración) de la respiración a la hipoxia, es decir, en la fase en que se incrementa la amplitud y la frecuencia de la respiración (Mironov y Richter, 1998). Por otra parte, los canales de  $K_{ATP}$  se activan durante la hipoxia (Mironov et al., 1998; Mironov y Richter, 2000), lo que trae como consecuencia una hiperpolarización del potencial de membrana de las células respiratorias. Esta hiperpolarización neuronal se asocia con la depresión respiratoria observada en condiciones de hipoxia (Mironov y Richter, 2000). Finalmente, la hipoxia también inhibe corrientes de  $Na^+$  (Mironov y Richter, 1999) y la corriente activada por la hiperpolarización (I<sub>h</sub>) (Mironov et al., 2000) de las neuronas inspiratorias (Mironov y Richter, 1999, Mironov et al., 2000).

Además de los cambios producidos en las propiedades intrínsecas de las neuronas respiratorias, las condiciones hipóxicas también modifican la transmisión sináptica del preBötC (Richter et al., 1991; Ballanyi et al., 1994; Ramirez et al., 1998; Ballanyi et al., 1999; Lieske et al., 2000). El efecto más consistente de la hipoxia es una depresión de la transmisión sináptica inhibitoria, que se ha observado tanto *in vitro* (Ramirez et al., 1998; Lieske et al., 2000) como *in vivo* (Richter et al., 1991). Esta depresión de la inhibición produce que las neuronas espiratorias dejen de disparar rítmicamente (Thoby-Brisson y Ramirez, 2000) y que las post-inspiratorias disparen en fase con la inspiración (Lieske et al., 2000), lo que tiene como consecuencia que no haya espiración durante la hipoxia (Peña y Ramirez, 2005). Por otra parte, la transmisión sináptica excitadora se inhibe moderadamente por la hipoxia y esto contribuye a que algunas neuronas inspiratorias reduzcan su excitabilidad (Ballanyi et al., 1994; Ballanyi et al., 1999). Sin embargo, esto no sucede en todas las conexiones excitadoras y existen neuronas inspiratorias cuya transmisión glutamatérgica no se modifica en estas condiciones (Ballanyi et al., 1994; Ballanyi et al., 1999). Esto sugiere que debe existir algún componente de la transmisión excitadora resistente a la hipoxia que podría estar críticamente involucrado en la generación de los boqueos (Peña y Ramirez 2005).



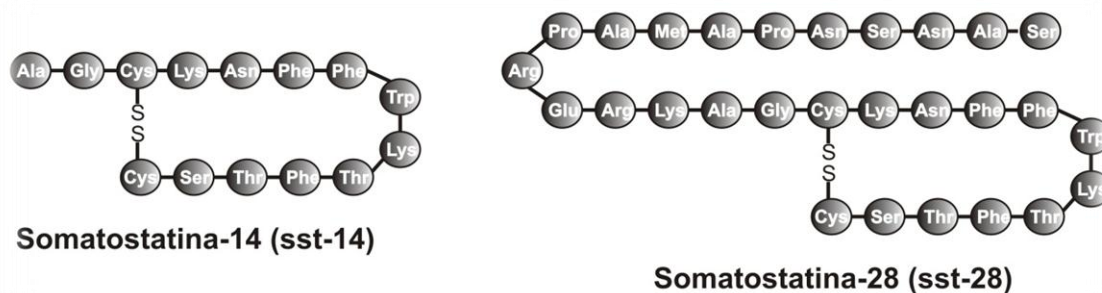
**Figura 10. Modelo propuesto para explicar la contribución de las neuronas marcapaso en la generación de los ritmos respiratorios en condiciones de normoxia e hipoxia** (Peña et al., 2004). El tamaño de los círculos representa el total de neuronas respiratorias activas en cada condición (100%). En condiciones de oxigenación normal, los dos tipos de neuronas marcapaso están activas y participan en la generación de la eupnea (centro de la figura). La aplicación de riluzol (RIL, izquierda), que inhibe la actividad de las neuronas marcapasos insensibles a  $\text{Cd}^{2+}$  (azules), no es suficiente para eliminar la generación de la eupnea. Por otra parte, la aplicación de ácido flufenámico (AFF, derecha), que inhibe la actividad de las neuronas marcapasos sensibles a  $\text{Cd}^{2+}$  (amarillo), tampoco es suficiente para anular la generación de la eupnea. Sin embargo, si ambas poblaciones de neuronas se bloquean (abajo), se inhibe la generación de la eupnea. En condiciones de hipoxia, las neuronas sensibles a  $\text{Cd}^{2+}$  se inhiben (arriba). Sin embargo, una parte de las neuronas que son insensibles al  $\text{Cd}^{2+}$  mantienen su actividad y contribuyen a la generación de los boqueos (arriba). El bloqueo de estas neuronas con riluzol evita la generación de los boqueos (arriba, izquierda). Modificado de Peña et al., 2004.

## **Modulación de la respiración.**

La respiración es un proceso altamente modulable (Bianchi et al., 1995; Butera et al., 1999a; Haji et al, 2000; Morin et al., 1990) y generalmente está sujeto a diversos cambios adaptativos en razón de las diversas situaciones que se presentan en la vida del organismo, como son el ejercicio, el sueño, la vocalización y los cambios en las presiones de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> (Peña y García, 2006). Una de las maneras en que se regula la actividad respiratoria es a través de la acción de diversos neuromoduladores que pueden actuar directamente sobre el circuito generador del ritmo respiratorio (Bianchi et al., 1995; Butera et al., 1999a; Haji et al, 2000; Morin et al., 1990). Algunos de estos neuromoduladores pertenecen a los grupos de las aminas biogénicas, los aminoácidos y los péptidos (Mueller et al., 1982; Bonham, 1995; Hilaire y Duron, 1999; Haji et al., 2000). Dentro del grupo de los péptidos que modulan la respiración se encuentra la somatostatina (SST; Stornetta et al., 2003; Llona et al., 2004; Llona y Eugenín, 2005). La SST o factor inhibidor de la liberación de somatotropina (*somatotropina release-inhibiting factor*, SRIF) es un péptido del que se conocen dos formas biológicas activas: el tetradecapéptido cíclico somatostatina-14 (SST-14), que se encontró originalmente en el hipotálamo (Brazeau et al., 1973) y el péptido amino-terminal extendido somatostatina-28 (SST-28; Fig. 11), que corresponde a la SST-14 extendida catorce aminoácidos más en la parte amino terminal (Pradayrol et al., 1980). Ambos péptidos se generan por el proceso proteolítico de una molécula precursora llamada preprosomatostatina, formada por 116 aminoácidos, que incluye a la prosomatostatina y un péptido señal de 24 aminoácidos que le sirve para transitar por el aparato de Golgi (Bell et al., 1995; Csaba y Dournaud, 2001; Olias et al., 2004). Tanto la SST-14 como la SST-28 se producen, predominantemente, por células secretoras y neuronas del SNC, así como por células de la pared del tracto gastrointestinal (Reisine y Bell, 1995a, Reisine y Bell, 1995b; Olias et al., 2004) aunque también se han descrito otros sitios de producción de SST como la placenta, el riñón, la retina, otras células endócrinas y del sistema inmune (Reichlin, 1983a; Reichlin, 1983b). A nivel del SNC, la zona de mayor concentración de SST está constituida por neuronas tuberoinfundibulares que participan en la regulación del eje hipotálamo-hipofisario (Schettini, 1991).

Además, dentro del SNC hay neuronas que expresan SST en diversas estructuras cerebrales como la corteza, el sistema límbico (particularmente el hipocampo y la amígdala) y el sistema nigroestriatal (Schettini, 1991; Kawaguchi y Kondo, 2002; Baraban y Tallent, 2004). En todos

estos casos, las neuronas que producen SST son interneuronas GABAérgicas (Schettini, 1991; Kawaguchi y Kondo, 2002; Baraban y Tallent, 2004). Además, se han identificado terminales nerviosas que expresan SST en la corteza cerebral, el hipocampo, la amígdala, el hipotálamo, el tallo cerebral y la médula espinal (Johansson et al., 1984; Kawaguchi y Kondo, 2002; Baraban y Tallent, 2004). Dependiendo de su localización y de sus efectos fisiológicos, se ha relacionado a este péptido con la regulación de diversas actividades motoras, sensoriales y cognitivas (Haroutunian et al., 1987; DeNoble et al., 1989; Raynor et al., 1993). Como se mencionó, la presencia de SST se observa en interneuronas GABAérgicas (Schettini, 1991; Kawaguchi y Kondo, 2002; Baraban y Tallent, 2004). Sin embargo, es importante mencionar que se ha reportado que algunos tipos neuronales glutamatérgicos también pueden generar SST (Epelbaum et al., 1994; Sosulina et al., 2006; Hrabovszky y Liposits, 2008; Viollet et al., 2008). Esta co-expresión de glutamato y SST se ha observado en neuronas del área preóptica (Epelbaum et al., 1994); del hipotálamo (Ziegler et al., 2002; Lin et al., 2003), de la amígdala (Sosulina et al., 2006) y también en las neuronas del preBötC (Stornetta et al., 2003).



**Figura 11. Representación esquemática de la somatostatina.** Se muestra la secuencia de aminoácidos que conforman a la somatostatina-14 (izquierda) y su forma extendida en la parte amino terminal, la somatostatina-28 (derecha). Ambos tipos de SST tienen una estructura cíclica y además cuentan con un puente disulfuro conformado por los residuos de aminoácidos de cisteína 1 y 12. Aunque ambos tipos de SST reconocen sus 5 diferentes receptores, generalmente, la SST-14 tiene mayor afinidad por el receptor tipo 2 y la SST-28 presenta mayor afinidad por el receptor tipo 5 (Olias et al., 2004; Kumar y Grant, 2010).

### Los receptores de SST.

Los efectos fisiológicos de la SST se producen a través de la unión de ésta con 6 receptores diferentes (sst1, sst2A, sst2B, sst3, sst4 y sst5) que pertenecen a la familia de receptores con 7

dominios transmembranales y que se acoplan a proteínas G (Hoyer et al., 1995; Csaba y Dournaud, 2001). Estos receptores se expresan ampliamente en diversos tejidos, incluido el sistema nervioso y la expresión de estos receptores puede ser específica del tejido. Por ejemplo, se sabe que los SSTR5 están mayoritariamente expresados en el intestino y en sistemas periféricos como el sistema respiratorio, mientras que los SSTR2 están más localizados en el SNC (Schulz et al., 2000; Csaba y Dournaud, 2001). Además, dentro del SNC la distribución de los diferentes receptores de SST también es específica para los diferentes circuitos neuronales (Reisine y Bell, 1995a; Reisine y Bell, 1995b; Videau et al., 2003; Viollet et al., 2008; Kumar y Grant 2010). Por ejemplo, el SSTR2 es ampliamente distribuido en áreas como el hipocampo, la amígdala y el tallo cerebral, mientras que el SSTR1 se restringe a áreas como el hipotálamo (Videau et al., 2003; Viollet et al., 2008; Kumar y Grant 2010).

Basándose en la homología de su secuencia y en sus propiedades farmacológicas, los receptores de SST se clasifican en dos subgrupos: los receptores a somatostatina tipo 1 (SRIF1) y los receptores a somatostatina tipo 2 (SRIF2) (Olias et al., 2004). Los receptores del subgrupo SRIF1 presentan alta afinidad a análogos clásicos de la SST de 6-8 aminoácidos, como el octreótido, el lanreótido y el vapreótido, mientras que los receptores del subgrupo SRIF2 tienen baja afinidad por los mismos (Olias et al., 2004). El grupo SRIF1 comprende los receptores SSTR2, SSTR3 y SSTR5, mientras que el grupo SRIF2 comprende los receptores SSTR1 y SSTR4 (Olias et al., 2004). De manera interesante, los receptores SSTR1 a SSTR4 se unen, con alta afinidad, tanto a la SST-14 como a la SST-28, mientras que el receptor SSTR5 tiene afinidad preferencial por la SST-28 (Olias et al., 2004).

Los receptores de SST (SSTRs) se acoplan a diversas vías efectoras intracelulares mediadas por proteínas G sensibles e insensibles a la toxina *pertusis* (Kleuss et al., 1991; Tallent y Reisine, 1992; Meyerhof, 1998; Patel, 1999; Csaba y Dournaud, 2001). Como se muestra en la tabla 1, a pesar de la gran variedad de vías de señalización reportadas para estos receptores, todos presentan en común el acople a proteínas G que inhiben la actividad de la enzima adenilatociclasa (AC) y, de esta manera, promueven la disminución en la producción de AMPc (Koch y Schonbrunn, 1984; Lahlou et al., 2004). Esta vía de señalización tiene como consecuencia la disminución de la actividad celular a través de la reducción en la conductancia de canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de



voltaje (Wang et al., 1990; Vilchis et al., 2002) y el aumento en la actividad de distintas corrientes de  $K^+$  (Mihara et al., 1987; Wang et al., 1989; Kim et al., 2002; Sun et al., 2002; Meis et al., 2005). La inhibición de las corrientes de  $Ca^{2+}$ , produce una disminución en la liberación de neurotransmisores (Viana y Hille, 1996; Galarraga et al., 2007; Brady et al., 2012) y la activación de canales de  $K^+$ , genera una hiperpolarización del potencial de membrana. En conjunto, esto produce una inhibición del disparo neuronal (Jiang et al., 2003; Baraban y Tallent, 2004; Meis et al., 2005; Brady et al., 2012) y por lo tanto se define a la SST como un neuromodulador inhibitorio (Tallent y Siggins, 1999; Vezzani y Hoyer, 1999; Leresche et al., 2000; McDonald y Mascagni, 2002; Saha et al., 2002).

### **Distribución de los receptores de SST en el SNC.**

La distribución de los diferentes tipos de receptores a SST (SSTRs; SSTR1–SSTR5) ha sido bien estudiada tanto en humanos como en roedores (Kumar y Grant 2010). Los SSTRs se distribuyen ampliamente en el SNC y su expresión es específica para los diferentes tejidos y tipos celulares (Reisine y Bell 1995a; Reisine y Bell 1995b, Patel, 1999; Kumar y Grant, 2010). De los diferentes receptores de SST, se ha observado que el SSTR2 es el más abundante en el SNC de murinos y es posible localizarlo en áreas como el bulbo olfatorio, el núcleo olfatorio anterior, la corteza, el hipocampo, la amígdala, el hipotálamo y el tallo cerebral (Videau et al., 2003; Kumar y Grant 2010; Viollet et al., 2008). A diferencia de la amplia distribución del SSTR2, la presencia de los SSTR1 es más reducida y se localiza en los ganglios basales, el hipotálamo y el núcleo arcuato (Stroh et al., 2006; Thermos et al., 2006; Viollet et al., 2008). Por otra parte, el SSTR3 es altamente expresado en el cerebelo pero presenta poca expresión en el resto del SNC (Viollet et al., 2008; Kumar y Grant 2010). La expresión del SSTR4 se restringe a áreas como el bulbo olfatorio, la corteza cerebral y el hipocampo (Schreff et al., 2000; Viollet et al., 2008; Kumar y Grant 2010). Finalmente, el SSTR5 presenta una expresión muy débil dentro del SNC (Stroh et al., 1999; Viollet et al., 2008). Algunas de las zonas del tallo cerebral en donde se ha detectado la expresión de los SSTR2 son el *locus coeruleus* (Videau., et al., 2003; Viollet et al., 2008) y el circuito generador del ritmo respiratorio, el preBötC (Gray et al., 2010).

SEÑALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES A SOMATOSTATINA					
VÍAS TRANSDUCCIONALES	sst1	sst2	sst3	sst4	sst5
Adenilatociclasa	↓	↓	↓	↓	↓
Fosfolipasa C	↑	↑	↑	↑	↓/↑
Fosfolipasa A2	↓	↓		↑	
Fosfatasa de tirosina SHP-1 SHP-2	↑ ↑	↑ ↑	↑	↑	↑
Cinasas de tirosina -c-src -JAK2	↑	↑ ↑			
PI <sub>3</sub> cinasa	↑	↑		↑	
Sintasas de óxido nítrico -Nnos -Enos		↑	↓		
Canales de Ca <sup>2+</sup>	↓	↓			↓
Canales de K <sup>+</sup>	↓	↑	↑	↑	↑
Intercambiador Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>	↓		↓	↓/↑	
MAP cinasas -ERK -p38 -JNK	↓/↑	↓/↑ ↑	↓	↑ ↑	↓ ↑

Tabla 1. Vías de señalización activadas para los diferentes receptores para somatostatina. Modificado de Lahlou et al., 2004.

### Acciones electrofisiológicas de la SST.

La amplia distribución de la SST y de sus receptores en el SNC, así como su acción sobre células secretoras, sugiere un papel importante de ésta como modulador de la excitabilidad neuronal (Selmer et al., 2000; Csaba y Dournaud, 2001). Como ya se mencionó, todos los subtipos de receptores para la SST están acoplados negativamente a la adenilato ciclasa (AC) (Olias et al.,

2004). De esta manera, la unión de la SST a su receptor se asocia con una disminución del AMPc intracelular y, como consecuencia de esto, la SST puede afectar distintas corrientes iónicas (Patel et al., 1994; Grant et al., 2004; Lahlou et al., 2004; Viollet et al., 2008; Kumar y Grant 2010).

Se ha observado ampliamente que la SST, a través de la unión a sus receptores, modula diversos canales de  $K^+$  (Mihara et al., 1987; Moore et al., 1988; Watson y Pittman, 1988; de Weille et al., 1989; Wang et al., 1989; Schweitzer et al., 1990; Raynor et al., 1991; Karschin et al., 1994; Karschin, 1995; Duerson et al., 1996; Schweitzer et al., 1998; Akopian et al., 2000; Kim et al., 2002; Vilchis et al., 2002; Meis et al., 2005; Galarraga et al., 2007). Mientras que existen muy pocos reportes que muestran que la SST induce la disminución de las corrientes de  $K^+$  como la corriente rectificadora retardada de  $K^+$  (Wang et al., 1989) y los canales rectificadores entrantes (Karschin et al., 1994; Karschin, 1995); la gran mayoría de los trabajos muestran que la SST incrementa diferentes corrientes de  $K^+$ , que incluyen el canal de  $K^+$  rectificador entrante (Mihara et al., 1987; Kim et al., 2002; Meis et al., 2005), los canales de  $K^+$  dependientes de ATP ( $IK_{ATP}$ ; de Weille et al., 1989); los canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  ( $IK_{Ca}$ ; Duerson et al., 1996; Galarraga et al., 2007), el canal rectificador retardado de  $K^+$  (Wang et al., 1989; Raynor et al., 1991; Akopian et al., 2000), así como la corriente M ( $I_M$ ) y la corriente de fuga (Moore et al., 1988; Watson y Pittman, 1988; Schweitzer et al., 1990; Schweitzer et al., 1998; Vilchis et al., 2002). Todos estos efectos de la SST involucran la inhibición de la actividad de la AC en diversos tipos neuronales incluidas neuronas del plexo submucoso (Mihara et al., 1987), de la amígdala (Meis et al., 2005), de la sustancia gelatinosa (Kim et al., 2002), de la corteza cerebral (Wang et al., 1989), de los fotorreceptores (Akopian et al., 2000) y del hipocampo (Moore et al., 1988; Watson y Pittman, 1988; Schweitzer et al., 1990; Schweitzer et al., 1998). Además, se sabe que la SST también puede activar corrientes de  $K^+$  mediante la activación de la fosfolipasa C y la proteína cinasa C (Ribalet y Eddlestone, 1995), así como de la vía de la fosfolipasa A2 y el ácido araquidónico (ver tabla 2; Schweitzer et al., 1990; Schweitzer et al., 1993; Duerson et al., 1996; Lammers et al., 1996). El incremento de estas corrientes de  $K^+$  produce que las membranas celulares se hiperpolaricen y, en consecuencia, se inhiba el disparo neuronal (Bell et al., 1995; Csaba y Dournaud, 2001; Kim et al., 2002; Meis et al., 2005).

Por otra parte, la SST también puede inhibir corrientes de  $Ca^{2+}$  (Golard et al., 1993; Golard y Siegelbaum, 1993; Shapiro y Hille, 1993; Patel et al., 1994; Shapiro et al., 1994; Viana y Hille, 1996;

Boehm y Betz, 1997; Grant et al., 2004; Lahlou et al., 2004; Viollet et al., 2008; Kumar y Grant 2010). Las principales corrientes de  $Ca^{2+}$  afectadas por la SST son las del tipo L (Kleuss et al., 1991; Kleuss et al., 1992), del tipo N (Shapiro y Hille, 1993; Shapiro et al., 1994), y del tipo P/Q (Viana y Hille, 1996). Esto se ha reportado en neuronas simpáticas (Golard et al., 1993; Golard y Siegelbaum, 1993), neuronas del ganglio cervical superior (Shapiro y Hille, 1993), neuronas del hipocampo (Boehm y Betz, 1997), de la neocorteza (Raynor et al., 1991), del estriado (Vilchis et al., 2002) y de la amígdala (Viana y Hille, 1996). Como consecuencia de la disminución de estas corrientes de  $Ca^{2+}$ , se presenta una disminución en el disparo neuronal y sobretodo una disminución en la liberación de neurotransmisores (Vilchis et al., 2002; Olias et al., 2004; López-Huerta et al., 2012). En suma, los efectos electrofisiológicos de la SST actúan sinérgicamente para inhibir la excitabilidad neuronal (Tallent y Siggins, 1999; Vilchis et al., 2002).

### **Efectos de la SST sobre la respiración.**

En diversos estudios se ha reportado que la SST puede modular la función de diferentes circuitos neuronales como el giro dentado (Baraban y Tallent, 2004), el hipotálamo (Peineau et al., 2003), la amígdala (Meis et al., 2005), la sustancia gelatinosa (Kim et al., 2002), la corteza cerebral (Wang et al., 1989), la retina (Akopian et al., 2000) y el hipocampo (Moore et al., 1988; Watson y Pittman, 1988; Schweitzer et al., 1990; Schweitzer et al., 1998). Además, se ha propuesto que, alteraciones del sistema somatostatinérgico de estos circuitos neuronales, podrían estar relacionadas con distintos desórdenes neurológicos como la enfermedad de Alzheimer (Craft et al., 1999; Davis et al., 1999; van de Nes et al., 2002), la enfermedad de Huntington (Aronin et al., 1983; Beal et al., 1988), la enfermedad de Parkinson (Beal et al., 1988; Strittmatter et al., 1996; Eve et al., 1997) y la epilepsia del lóbulo temporal (Robbins et al., 1991; Strowbridge et al., 1992). Por otra parte, en algunos estudios, se propone que problemas relacionados con el desarrollo del sistema somatostatinérgico podrían estar involucrados en fallas respiratorias, sobre todo en el proceso de generación de boqueos de bebés que murieron a causa del SMSL (Chigr et al., 1992; Carpentier et al., 1998; Carpentier et al., 1999; Lavezzi et al., 2004a; Lavezzi et al., 2004b; Lavezzi y Maturri, 2008). Por ejemplo, en infantes que fallecieron a causa del SMSL, se reportó que éstos tienen mayor número de sitios de unión a la SST en diversos núcleos neuronales relacionados con la generación

de la respiración, en comparación con la cantidad de sitios de unión a SST observados en niños que no fallecieron por este mal (Chigr et al., 1992; Carpentier et al., 1998). Como se mencionó previamente, el SMSL se asocia a una falla en la generación de los boqueos, que son indispensables para llevar a cabo el proceso de autorresucitación (Poets et al., 1999; Thach, 2005; Erickson y Sposato, 2009). El aumento en la cantidad de receptores a SST, observado en niños que murieron por el SMSL (Chigr et al., 1992; Carpentier et al., 1998), se podría relacionar con la incapacidad de estos niños para generar el proceso de autorresucitación (Lavezzi y Maturri, 2008). Además de estas evidencias, que muestran una relación entre posibles problemas del sistema somatostatinérgico y el SMSL, también se ha reportado un aumento en la cantidad de la somatostatina en núcleos relacionados con la generación de la respiración, tales como el núcleo Kölliker-Fuse, el *locus coeruleus*, el núcleo hipogloso, el núcleo dorsal motor del vago, el núcleo del tracto solitario y el núcleo ambiguo (Lavezzi et al., 2004a; Lavezzi et al., 2004b). En conjunto, el aumento en la concentración, tanto de la SST como de sus receptores, en núcleos involucrados con la generación del ritmo respiratorio de infantes que fallecieron por el SMSL, nos permiten sugerir que los sistemas de la SST son fundamentales para la regulación de la respiración y, también, para realizar un proceso adecuado de autorresucitación en infantes que sufren un periodo de apnea.

Por otra parte, los efectos de la SST sobre la respiración se han estudiado ampliamente y se ha reportado que este péptido modula la respiración a diferentes niveles (Llona y Eugenin, 2005). A nivel sistémico, se ha reportado que la infusión intravenosa de SST en seres humanos deprime la respiración tanto en condiciones de oxigenación normal como en condiciones de hipoxia (Maxwell et al., 1986; Filuk et al., 1988; Pedersen et al., 1999). Además, a nivel periférico, se ha observado que la SST también afecta la actividad de motoneuronas respiratorias (Oomura y Mizuno, 1986) e inhibe corrientes de  $Ca^{2+}$  en células de los cuerpos carotídeos (e Silva y Lewis, 1995). Sin embargo, estos estudios solamente demuestran los efectos de la SST a nivel sistémico y periférico y no permiten determinar si la SST podría ejercer sus efectos a nivel del SNC. En esta tesis, se sugiere que la SST podría actuar en el SNC, puesto que se ha detectado la expresión de ésta en somas y terminales nerviosas de diversos núcleos respiratorios del tallo cerebral, incluidos el núcleo del tracto solitario (Kalia et al., 1984, Leibstein et al., 1985), el núcleo ambiguo (Leibstein et al., 1985), el núcleo trigémino espinal (Leibstein et al., 1985) y de gran interés para este trabajo en el preBötC (Stornetta et al., 2003). Hasta el momento, diversos estudios han evaluado el efecto de la SST sobre la

respiración, a nivel del SNC (Härfstrand et al., 1984; Kalia et al., 1984; Härfstrand et al. 1985; Yamamoto et al., 1988; Llona et al., 2004; Gray et al., 2010; Pantaleo et al., 2011). Kalia y cols., (1984), reportaron que la inyección intracisternal de SST en ratas anestesiadas produce eventos de apnea irreversible (Kalia et al., 1984). Esta depresión de la respiración también se observó cuando se aplicó SST sobre el núcleo paragigantocelular lateral de gatos y ratas (Yamamoto et al., 1988). Por otra parte, e interesantemente, la latencia de esta apnea, producida por la SST, se acorta por condiciones de hipoxia y de hipercapnia (Härfstrand et al., 1984; Härfstrand et al., 1985). Estas observaciones en conjunto, nos permiten sugerir que la SST ejerce efectos neuromoduladores sobre diferentes núcleos neuronales relacionados con la respiración y, muy posiblemente, de manera directa sobre el circuito que genera la respiración, el preBötC. Esta posibilidad no se ha estudiado con profundidad y existen pocos estudios en los que se ha investigado el efecto de la modulación de la SST sobre diferentes núcleos neuronales relacionados con la respiración, como el complejo Bötzing y el preBötC (Llona et al., 2004; Gray et al., 2010; Pantaleo et al., 2011). En un trabajo en el que se utilizó la preparación de tallo cerebral-médula espinal, Llona y cols., (2004), demostraron que mediante la aplicación de SST, en forma de *bolus*, se disminuye la frecuencia y la amplitud de las ráfagas de actividad respiratoria, registradas en el nervio frénico, sugiriendo que la SST modula la generación de la respiración mediante un efecto sobre el SNC (Llona et al., 2004). Además, también se ha propuesto que la depresión de la ventilación, mediada por la inyección de ácido aspártico en el tallo cerebral, se debe a la liberación endógena de SST (Feldman et al., 1990). De manera más específica, se ha reportado que la aplicación de SST directamente sobre núcleos relacionados con la generación de la respiración, como son el CB y el preBötC de conejos, afecta la frecuencia del ritmo respiratorio, registrado en el nervio frénico, lo que sugiere que este péptido modula al núcleo generador de la respiración (Pantaleo et al., 2011). Recientemente, en un estudio donde también se utilizó la preparación *en bloc* y se registró la actividad respiratoria del nervio frénico, se reportó que la aplicación de SST reduce la frecuencia del ritmo respiratorio (Gray et al., 2010). En ese estudio, se observó que la SST reduce la frecuencia respiratoria de manera “cuántica”, es decir, que los periodos entre cada ráfaga respiratoria se incrementaron, en múltiplos enteros, de los periodos obtenidos bajo condiciones control (Gray et al., 2010). Se ha reportado previamente que esta disminución de la frecuencia respiratoria, de “tipo cuántico” ocurre cuando el fármaco inhibe directamente al preBötC (Mellen et al., 2003). A diferencia de los estudios previos, que no distinguen claramente los sitios de acción de la SST, aquí se propone que la SST podría

ejercer sus efectos sobre la respiración al actuar directamente sobre el circuito generador de ésta, el preBötC. Además, es posible que la SST module, de manera endógena y constitutiva, la generación del ritmo respiratorio ya que se sabe que las células del preBötC tienen la maquinaria necesaria para generar la SST (Llona et al., 2001; Stornetta et al., 2003) y también expresan el receptor tipo 2 para somatostatina (Gray et al., 2010). Hasta la fecha, se desconoce si la SST es capaz de modular la generación de los diferentes ritmos respiratorios producidos por el preBötC y, mucho menos, se conoce su mecanismo de acción en este circuito neuronal. Además, aunque se ha reportado la expresión del SSTR2 en las neuronas del preBötC (Gray et al., 2010), no existen trabajos que descarten la expresión de otros SSTRs, o bien que demuestren la posible participación de éstos en la modulación somatostatinérgica de la respiración. Por otra parte, a nivel celular, no se han investigado los efectos de la SST sobre las propiedades intrínsecas y sinápticas del preBötC. Finalmente, aunque se ha reportado que problemas en el desarrollo del sistema somatostatinérgico podrían estar involucrados en el SMSL (Chigr et al., 1992; Carpentier et al., 1998; Lavezzi et al., 2004a; Lavezzi et al., 2004b; Lavezzi y Maturri, 2008), no se han realizado estudios en los que se evalúe directamente la relación del sistema somatostatinérgico con el proceso de autorresucitación.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

La SST deprime la respiración mediante efectos a nivel sistémico y central. Este efecto depresor de la SST se ha observado tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia. Además, las neuronas del circuito generador del ritmo respiratorio, el preBötC, producen SST. También se sabe que las neuronas de este circuito expresan receptores del tipo 2 para la SST (SSTR2), por lo que es posible que la SST actúe en el preBötC a través de los SSTR2 en condiciones de normoxia y de hipoxia. A partir de lo anterior, en esta tesis se investigó si la SST es capaz de modular la generación de los diferentes ritmos respiratorios, actuando directamente sobre el preBötC, tanto en condiciones de oxigenación normal como de hipoxia. Por otra parte, se sabe que la SST modifica la actividad sináptica y las propiedades intrínsecas de diferentes circuitos neuronales, activando o inhibiendo canales de potasio y calcio, respectivamente. Debido a esto, en este trabajo también se estudió cómo afecta la SST a las propiedades intrínsecas y sinápticas del preBötC, así como los posibles canales iónicos involucrados en estos efectos. Finalmente, se ha propuesto que existen alteraciones en el sistema somatostatinérgico de bebés recién nacidos que sufren del SMSL, síndrome relacionado con una incapacidad para producir boqueos y autorresucitación. Con base a esto, se estudió el efecto de la SST sobre la respiración *in vivo* en condiciones de normoxia y de asfixia, así como sobre el proceso de autorresucitación.

## **HIPÓTESIS.**

La SST inhibirá los diferentes ritmos respiratorios: eupnea, suspiros y boqueos, a través de una acción directa sobre el circuito generador del ritmo respiratorio. Este péptido ejercerá sus efectos mediante la activación de los SSTR2, lo que activará o inhibirá, uno o varios canales de  $K^+$  o de  $Ca^{2+}$ , respectivamente. En consecuencia, se disminuirá la generación de la respiración y el proceso de autorresucitación *in vivo*.



## OBJETIVOS:

### Objetivo general:

- Caracterizar la modulación somatostatinérgica de la generación del ritmo respiratorio por el preBötC, bajo condiciones de normoxia e hipoxia, tanto *in vitro* como *in vivo*.

### Objetivos específicos:

- Analizar el efecto de la SST sobre los ritmos respiratorios generados por el preBötC *in vitro*.
- Determinar los receptores involucrados en la modulación somatostatinérgica del preBötC *in vitro*.
- Determinar los cambios en las propiedades intrínsecas neuronales que participan en la modulación somatostatinérgica del preBötC *in vitro*.
- Determinar los cambios en las propiedades sinápticas que participan en la modulación somatostatinérgica del preBötC *in vitro*.
- Evaluar los efectos de la SST sobre la generación de los distintos ritmos respiratorios y la autorresucitación, *in vivo*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **Animales.**

Todos los experimentos de esta tesis se realizaron en ratones neonatos de 6 a 8 días de nacidos (P6-P8) de la cepa Swiss-Webster. Los protocolos experimentales se aprobaron por los comités locales de ética en experimentación animal (CICUAL-Cinvestav e INB-UNAM). Además, todos nuestros experimentos se realizaron conforme la Norma Oficial Mexicana para el Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

### **Obtención de rebanadas transversales de tallo cerebral.**

Los registros electrofisiológicos *in vitro* se realizaron en rebanadas transversales de tallo cerebral que se obtuvieron de la siguiente manera: Los animales se decapitaron y se les extrajo rápidamente el tallo cerebral. Éste se colocó en líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) frío y burbujeado constantemente con carbógeno (mezcla de O<sub>2</sub> 95% y CO<sub>2</sub> 5%). El LCRA contenía: NaCl 119 mM, KCl 3 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM y D-glucosa 30 mM, ajustado a un pH de 7.4. El tallo cerebral se pegó sobre un bloque de agar y se colocó en un vibratomo para realizar los cortes seriales, de manera transversal, en dirección rostro-caudal, hasta identificar el margen rostral del preBötC. Para identificar esta zona, se utilizaron marcadores anatómicos como la desaparición del núcleo facial (VII) y la aparición de la oliva inferior (OI), el núcleo ambiguo (NA) y el núcleo hipogloso (XII). Las rebanadas utilizadas tenían un grosor de 700 µm. Solamente se obtuvo una rebanada por cada animal. Una vez obtenida esta rebanada, se le colocó en una cámara de registro que contenía 3 ml de LCRA. Dicha rebanada se perfundió constantemente con LCRA a una velocidad de flujo de 15-20 ml/minuto, en un volumen total de 50 ml. La temperatura de la cámara de registro se mantuvo constante a un valor de 29 ± 1 °C. Con la intención de facilitar la generación del ritmo respiratorio y de mantenerlo constante por horas, se elevó la concentración extracelular de KCl desde una concentración inicial de 3 mM a una concentración final de 8 mM durante un periodo de

30 minutos antes de iniciar los registros electrofisiológicos (Tryba et al., 2003). Para la inducción de las condiciones hipóxicas, se dejó de burbujear el LCRA con carbógeno y se burbujeó con una mezcla de nitrógeno (N 95% y CO<sub>2</sub> 5%; Peña et al., 2004; Peña et al., 2008; Zavala-Tecuapetla et al., 2008).

### **Registros electrofisiológicos.**

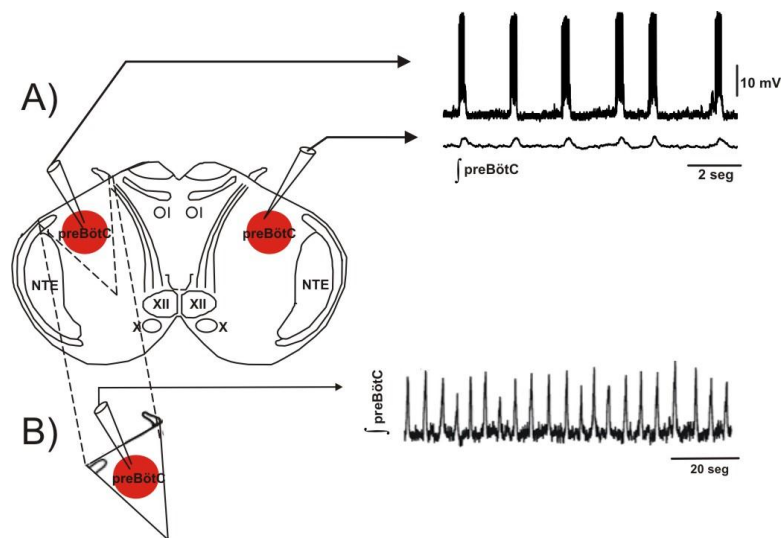
Para el desarrollo de esta tesis, se realizaron diferentes tipos de registros, dependiendo del tipo de actividad que se deseaba obtener. En condiciones *in vitro*, se hicieron registros electrofisiológicos multiunitarios para registrar la actividad poblacional del preBötC. Además, para registrar la actividad de neuronas respiratorias, tanto espiratorias como inspiratorias, del tipo marcapaso y no marcapaso, se realizaron registros unicelulares mediante la técnica del patch-clamp. Finalmente, en condiciones *in vivo* se obtuvieron registros pletismográficos para determinar el efecto de diferentes fármacos sobre la respiración. A continuación, se detallan cada uno de los diferentes tipos de registros utilizados:

### **Registros multiunitarios de la actividad poblacional del preBötC.**

Para registrar la actividad poblacional del preBötC, los registros electrofisiológicos se hicieron con electrodos de succión, colocados sobre la superficie de la rebanada a nivel del preBötC (Fig. 12). La señal se amplificó y se filtró con un amplificador de corriente alterna con un ancho de banda de 0.25 KHz a 5 KHz (Grass Instruments, Quincy, MA, USA). La señal obtenida también se rectificó e integró simultáneamente con un filtro electrónico (constante de tiempo 30-50 mseg, diseñado por JFO electronics de la Universidad de Chicago; Peña y Ramirez, 2002; Peña y Alavez-Perez, 2006). Finalmente, la señal eléctrica se digitalizó con un convertidor analógico-digital (BNC-2110, National Instruments) y los datos se almacenaron en una computadora personal para su posterior análisis.

## Registros de patch-clamp de neuronas respiratorias.

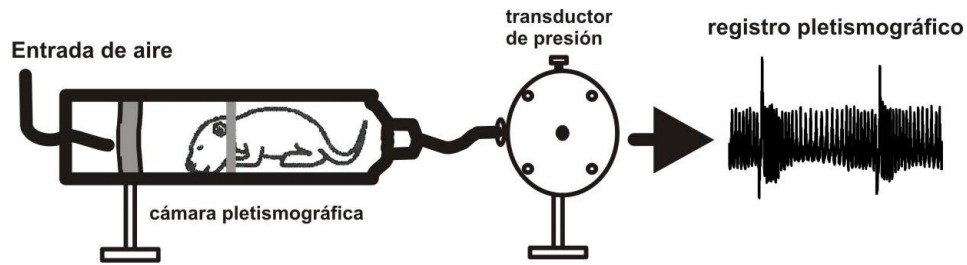
Para registrar individualmente la actividad de las neuronas del preBötC, se utilizó la técnica del patch-clamp “a ciegas” (Zavala-Tecuapetla et al., 2008). Para estos registros, se usaron electrodos, hechos de capilares de borosilicato (G150F-4; Warner Instruments, Harden, CT, USA), rellenos con solución interna, que contenía: K-gluconato 120 mM; KCl 20 mM; CaCl<sub>2</sub> 1 mM; EGTA 10 mM; MgCl<sub>2</sub> 2mM, Na<sub>2</sub>ATP 4 mM y HEPES 10 mM; ajustada a un pH de 7.2. Para identificar a las neuronas respiratorias, se registró simultáneamente la actividad poblacional del preBötC, que se usó como referencia. Las células se mantuvieron en la configuración de “cell-attached” mientras se identificaba su patrón de disparo. Una vez que se identificaba el tipo celular (inspiratoria o espiratoria) se generó un gigasello y se registró su actividad eléctrica en la configuración de célula entera en la modalidad de fijación de corriente (Peña et al., 2004). En algunos de estos experimentos, se bloqueó la actividad sináptica con la intención de identificar neuronas inspiratorias de tipo marcapaso. Para hacer esto, se aplicó un coctel de antagonistas de receptores para GABA, glicina y glutamato (Peña y Ramirez, 2002; Peña et al., 2004). Solamente se registró una neurona por cada rebanada de tallo cerebral.



**Figura 12. Registros electrofisiológicos realizados en la rebanada de tallo cerebral.** A) En la preparación de la rebanada de tallo cerebral se realizaron registros duales. Por una parte se registró la actividad poblacional del preBötC (trazo inferior) y, simultáneamente, se registró la actividad unicelular de neuronas respiratorias (trazo superior). B) Islas del preBötC, extraídas de la rebanada de tallo cerebral, en las que se registró la actividad poblacional del preBötC (∫ preBötC). Las islas del preBötC se obtienen con la intención de remover todos los núcleos vecinos al mismo. XII, núcleo del nervio hipogloso; X, núcleo del nervio vago; OI, oliva inferior; NTE, núcleo trigémino espinal; ∫ preBötC, señal integrada del complejo preBötzingger.

## Registros pletismográficos.

Para registrar los movimientos respiratorios, *in vivo*, se hicieron registros pletismográficos de ratones P6 a P8 (Fig. 13). Para esto, los animales se colocaron en una cámara pletismográfica y se les dejó recuperar durante, al menos, 10 minutos. La cámara de registro se ajustó al tamaño exacto del animal, con la intención de evitar el movimiento del mismo (Fig. 13). Las señales de la respiración, producidas por el desplazamiento del tórax, se obtuvieron por un método barométrico (Peña y Aguilera, 2007; Peña et al., 2008; Zavala-Tecuapetla et al., 2008). Los cambios de presión, producidos por los movimientos inspiratorios y espiratorios, se midieron utilizando un transductor de presión de alta ganancia diferencial (Grass Instruments). La señal obtenida se amplificó y se filtró (pasa bajas 0.25 KHz, pasa altas 0.3 KHz) con un amplificador de corriente directa (Grass Instruments). En estas condiciones, los fármacos se aplicaron de manera intracisternal (en 5  $\mu$ l de LCRA) (Yoneda et al., 1991; Martínez et al., 1995; Martínez et al., 2000; Peña y Aguilera, 2007; Peña et al., 2008; Zavala-Tecuapetla et al., 2008) y sus efectos sobre la respiración se registraron durante 10 minutos. Con la intención de aplicar concentraciones equiparables de los fármacos, tanto *in vitro* como *in vivo*, se asumió que la cantidad del fármaco inyectado se diluía en el cerebro completo de los ratones, que tenía un peso promedio de 330 mg (Peña y Aguilera, 2007; Zavala-Tecuapetla et al., 2008). De este modo, se aplicó la cantidad necesaria del fármaco, a partir de un stock, para alcanzar la concentración deseada al diluirse en 330  $\mu$ L (Peña y Aguilera, 2007; Zavala-Tecuapetla et al., 2008). En todos los experimentos se humidificó el aire y esto se consideró como la normoxia. Para inducir las condiciones de asfixia, el aire se sustituyó por una mezcla de nitrógeno (N 95% y CO<sub>2</sub> 5%) y se mantuvo durante 3 minutos, hasta inducir un periodo de apnea y con esto, la generación de los boqueos (Peña et al., 2004; Peña et al., 2008; Zavala-Tecuapetla et al., 2008). Finalmente, se restituyó el aire normal y se evaluó el proceso de la autorresucitación de los ratones. La autorresucitación se consideró exitosa cuando el animal recuperó totalmente la capacidad de generar la eupnea (Fewell et al., 2000; Gozal et al., 2002).



**Figura 13. Método pletoimográfico utilizado para registrar la respiración en condiciones *in vivo*.** El animal se coloca en una cámara pletoimográfica con la cabeza por fuera de la misma. Enfrente del animal se coloca un sistema de aplicación constante de aire humidificado (lado izquierdo). Los cambios producidos por la expansión y la contracción de la caja torácica del ratón son registrados por un transductor de presión (en medio). Los registros se digitalizaron y almacenaron en una computadora para su análisis posterior. Tomado de Zavala-Tecuapetla (2008).

### rt-PCR en tiempo real (qPCR).

La expresión de ARNm para los diferentes receptores de SST se evaluó a partir de muestras de ARN de cerebro total y del preBötC, por separado, en ratones neonatos de P6 a P8 y con el uso de la técnica de rt-PCR en tiempo real (qPCR). Para extraer específicamente el preBötC de la rebanada completa del tallo cerebral, se utilizó una aguja del tamaño 17, que tiene un diámetro de 1.06 mm, y que es del tamaño indicado para extraer el área correspondiente al preBötC (Lai et al., 2001). Con el objetivo de obtener suficiente ARNm del preBötC, se utilizaron 3 grupos de ratones. Cada grupo se conformó de 12 a 14 animales. Para obtener el ARNm del cerebro completo, se utilizó un cerebro por cada experimento. Las muestras de tejido del preBötC y del cerebro se colocaron por separado en tubos eppendorf que contenían 1 ml de reactivo de Trizol® y se almacenaron a -90 °C, hasta continuar con los siguientes pasos del experimento. Para la extracción del ARNm se siguió el protocolo del reactivo de Trizol® (Invitrogen, Cat. No. 15596-018). Para producir el ADNc se utilizó el protocolo de la enzima Super-Script II de Invitrogen (Cat. No. 18064). Finalmente, los experimentos de PCR en tiempo real se realizaron usando la mezcla preparada de SYBR PCR (Bio-Rad). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador ABI Prism 7000 (Applied Biosystems). Cada tubo de reacción contenía: 5 µl de la mezcla SYBR, 3 µl de la mezcla de *primers*, tanto 5' → 3' como 3' → 5' (cada uno a una concentración de 10 µM) y 2 µl de ADNc. Las reacciones de PCR se iniciaron con una temperatura de 95 °C para desnaturalizar el ADNc. Después, la temperatura se disminuyó a 65 °C para favorecer el alineamiento de los *primers* y, finalmente, se aplicaron 40 ciclos de 37 °C a 65 °C para realizar la amplificación. La cuantificación de

los niveles de expresión de los genes de interés se realizó utilizando el valor del ciclo umbral (CT, por sus siglas en inglés). El valor del CT se obtuvo con el software del termociclador ABI Prism 7000. La cantidad de la expresión de cada uno de los genes se calculó con la fórmula:  $(1/2^{-CT})$ . Todos los valores fueron normalizados al valor de la expresión de ARNm para GAPDH, para cada uno de los tejidos utilizados.

### Diseño de los *primers* utilizados para la qPCR.

En este trabajo, se amplificaron los ADNc para 7 transcritos diferentes: el de la enzima GAPDH, los 5 receptores a SST (SSTR1–SSTR5) y el del receptor a sustancia P (NK1R). El gen de la GAPDH se utilizó para normalizar todos los valores de expresión al valor de este transcrito constitutivo. El transcrito del NK1R se utilizó como marcador molecular de las neuronas respiratorias del preBötC (Gray et al., 2001; Gray et al., 2010). Las secuencias y los números de acceso de estos genes se obtuvieron del GenBank ®. A continuación, se muestra la tabla con los números de accesos de cada gen, los *primers* utilizados para amplificar cada uno de estos y el tamaño de cada amplificado.

GEN	Número de acceso GENBANK	<i>primer 5' → 3'</i>	<i>primer 3' → 5'</i>	Tamaño del producto
GAPDH	XM_001473623.1	AACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA	GGCTAAGCAGTTGGTGGTGC	50 nt
NK1	NM_009313.4	ATTGAGTGGCCAGAACATCCC	GGATCTCACTGGCCCACAGT	142 nt
SSTR1	NM_009216	GCTCAGAGCGCAAGATCACTC	CAGACAACCTGGCTCACGGTG	135 nt
SSTR2	NM_009217	AGTCCTCTGGAATCCGAGTGG	CCACAGACACGGAAGAGACGT	141 nt
SSTR3	NM_009218	GCAACTCGCTGGTGATCTACG	GTTCTGAGCAGCCAGGAAGG	131 nt
SSTR4	NM_009219	TCCTGGAAACAACCTGGAGGTG	GACTTGCTTGCAGCCAGGTT	146 nt
SSTR5	NM_011425	CACCTAGCTGGAATGCCTCAG	GTGTGTTTCCACCCAGTCCC	144 nt

Tabla 2. Lista de los pares de *primers* utilizados para evaluar la expresión de los transcritos de los diferentes receptores de SST, así como los controles (GAPDH y NK1R), tanto en el preBötC como en el cerebro completo.

## Análisis de datos

Todos los registros electrofisiológicos se analizaron utilizando los programas IGOR-Pro (WaveMetrics, Lake Oswego, Oregon) y AxoScope (Axon Instruments). Las curvas concentración–respuesta se utilizaron para calcular los valores  $IC_{50}$  con el programa SigmaPlot (Systat Software Inc, Germany). Las comparaciones estadísticas se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, CA). Los parámetros de periodicidad que se analizaron son la irregularidad y la frecuencia de los ritmos respiratorios, registrados en diferentes condiciones experimentales. Estos parámetros, se evaluaron cada minuto, durante un periodo de 10 minutos, para cada condición experimental. La irregularidad (I) del ritmo respiratorio, se calculó con la fórmula  $I_n = ABS (P_n - P_{n-1}) / P_{n-1}$ ; donde,  $I_n$  es el valor de la irregularidad;  $n_{th}$  es el número del ciclo,  $P_n$  representa un periodo en este ciclo,  $P_{n-1}$  es el periodo anterior y ABS es el valor absoluto. Además, se usaron dos métodos adicionales para evaluar este parámetro. Por un lado, se calculó el coeficiente de variación de los periodos (CV), utilizando la fórmula:  $CV = (desviación\ estándar / media) * 100$  (Viemari et al., 2004; Viemari et al., 2011); y, por otra parte, se compararon las diferencias en la dispersión de los valores de los periodos, respecto una media normalizada, con el uso de la prueba de Levene. Para hacer esto, se dividió el valor de cada periodo entre el valor promedio del grupo, lo que permite normalizar las medias de todos los grupos, es decir, la media para todos fue igual a 1 y, de esta manera, se analizó la varianza de los periodos de cada grupo.

Para evaluar la cinética de las ráfagas de actividad poblacional de los ritmos respiratorios producidos por el preBötC, se integró la señal eléctrica producida por éste. A partir de esta integral se analizó la amplitud, la duración y el tiempo de subida de las ráfagas de actividad respiratoria. La amplitud se cuantificó en el pico máximo de la ráfaga. El tiempo de subida se cuantificó del 10% al 90% de la amplitud máxima. Por último, la duración se midió al 50% de la amplitud máxima de estas ráfagas. En la figura 14 se ilustran los parámetros analizados durante este estudio.

Para analizar los efectos de la SST sobre la actividad unicelular, se evaluó el potencial de membrana de las neuronas respiratorias, así como su frecuencia de disparo, tanto en presencia como en ausencia de SST. Además, se cuantificó la duración, la amplitud y la frecuencia de las ráfagas de potenciales de acción en ambas condiciones.



El efecto de la SST sobre la actividad poblacional tónica del preBötC se cuantificó mediante un análisis clásico de poder espectral (Peña y Alavez-Pérez, 2006; Balleza-Tapia et al., 2010; Peña et al., 2010). Para hacer esto, se analizaron segmentos de 2 segundos utilizando un algoritmo de la transformada rápida de Fourier con el programa Clampfit (Molecular Devices).

Todos los datos se presentan como la media  $\pm$  el error estándar (EE). Las diferencias estadísticas entre los diferentes grupos se determinaron mediante el uso de una prueba *t* de Student (para comparar dos grupos de modo pareado o no pareado), o bien, mediante una prueba ANOVA de una vía, seguida por una prueba *post-hoc* de Tukey o de Dunnett (para comparar tres o más grupos). Para evaluar las diferencias del proceso de autorresucitación entre los diferentes grupos de animales, se usó una prueba Chi-cuadrada. Para todos los casos, el valor de  $p < 0.05$  se consideró como significativamente diferente.

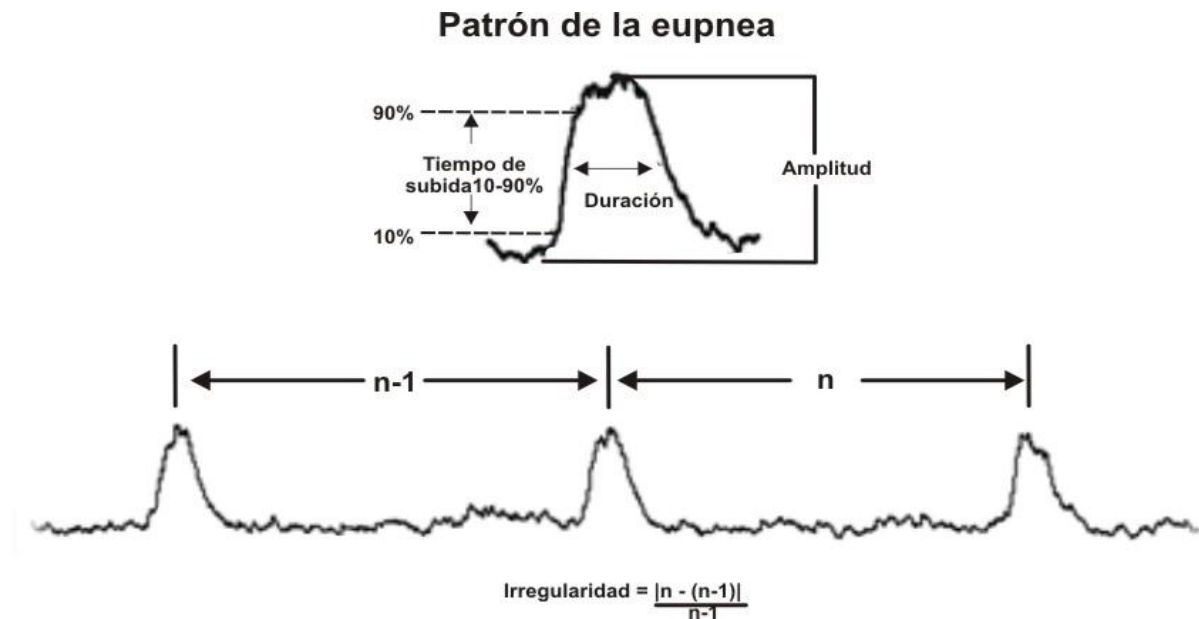


Figura 14. **Parámetros del patrón respiratorio cuantificados en las diferentes condiciones experimentales.** En la parte superior se muestra cómo se cuantificaron el tiempo de subida, la duración media y la amplitud de la cinética de las ráfagas respiratorias. En la parte inferior, se muestra la manera de calcular la irregularidad del ritmo respiratorio.

## Fármacos

Para realizar el trabajo experimental de esta tesis se utilizaron los siguientes fármacos:

- Somatostatina-14 (SST); como agonista de los SSTRs.
- BIM23014C:  $\beta$ -(2-Naftil)-D-Ala-Cis-Tir-D-Trp-Lis-Val-Cis-Thr amida [puente disulfuro: 2-7]). Como agonista específico del receptor tipo 2 de SST.
- Ciclosomatostatina (CSST): Ciclo (7-amino heptanoil-Phe-D-Trp-Lis-Thr [Bzl]). Como antagonista inespecífico de los receptores de SST.
- Nifedipina: 1,4-Dihidro-2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)-3,5-ácido piridino dicarboxílico dimetil éster. Como un bloqueador específico de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L.
- TEA: Cloruro de Tetraetilamonio. Un bloqueador de los canales de  $K^+$ .
- Tolbutamida: 1-Butil-3-(4-metil fenil sulfonil) urea. Un bloqueador de canales de  $K^+$  dependientes de ATP.
- Glibenclamida: 5-Cloro-N-[4-(ciclo hexil ureido sulfonil) fenetil]-2-metoxi benzamida Gliburida N-p-[2-(5-Cloro-2-metoxi benzamido) etil] benzeno sulfonil-N'-ciclohexil urea. Otro bloqueador de canales de  $K^+$  dependientes de ATP.
- Linopirdina: 3-Dihidro -1-fenil-3,3-bis (4-piridinil metil) -2H -indol-2-one DuP 996. Un bloqueador de la corriente M de  $K^+$ .
- XE-991: 10, 10-bis (4-Piridinil metil)-9- (10H) -antracenona. Otro bloqueador de la corriente M de  $K^+$ .
- Apamina. Como bloqueador de los canales de  $K^+$  dependientes de calcio de poca conductancia, los canales SK.
- Paxilina. Como bloqueador de los canales de  $K^+$  dependientes de calcio de alta conductancia, los canales BK.
- Cianamida 154806 (CYN). Como antagonista específico de los receptores tipo 2 de SST.
- 5-Bromo-2-metoxipiridina (5-Br-2-Metox). Un antagonista específico de los receptores tipo 3 de SST.
- Ácido kinurénico: 4-Hidroxiquinolina-2-ácido carboxílico. Antagonista inespecífico de los receptores de glutamato.

- (-) Estricnina. Antagonista de los receptores de glicina.
- Bicuculina. Antagonista de los receptores de GABA.

Todos los fármacos se obtuvieron de Sigma Aldrich (San Luis, Misuri, USA) excepto el XE-991 que se obtuvo de Tocris-Bioscience (Ellisville, Misuri, USA). La SST, el BIM23014C, la CSST, el TEA, la apamine, XE991, la CYN y la estricnina se disolvieron en agua desionizada. La nifedipina, la tolbutamida, la glibenclamida, el EBIO, la paxilina, 5-Bromo-2-metoxipiridina, la bicuculina y el ácido kinurénico se disolvieron en dimetilsulfoxido (DMSO, Sigma, San Luis, Misuri, USA). Por último, la linopirdina se disolvió en etanol. Todos los fármacos se prepararon en soluciones stock concentradas 1000x y se almacenaron a -20 °C hasta que se utilizaron.

## RESULTADOS

### **La somatostatina inhibe la generación de los ritmos respiratorios e incrementa la regularidad de la eupnea *in vitro*.**

El preBötC, aislado *in vitro* y en condiciones de oxigenación normal, genera la eupnea (Fig. 15 A) y, en algunas preparaciones, ésta se alterna con suspiros rítmicos (Fig. 16 A; Lieske et al., 2000; Peña et al., 2004; Zavala–Tecuapetla et al., 2008). Por otra parte, en condiciones hipóxicas el preBötC sufre un proceso de reconfiguración que conduce a la generación de un tercer ritmo respiratorio, denominado boqueo (Fig. 17 B; Lieske et al., 2000). Utilizando la preparación de rebanada de tallo cerebral, que contiene al preBötC, se investigó el efecto de la aplicación de SST exógena sobre la generación de estos tres ritmos respiratorios.

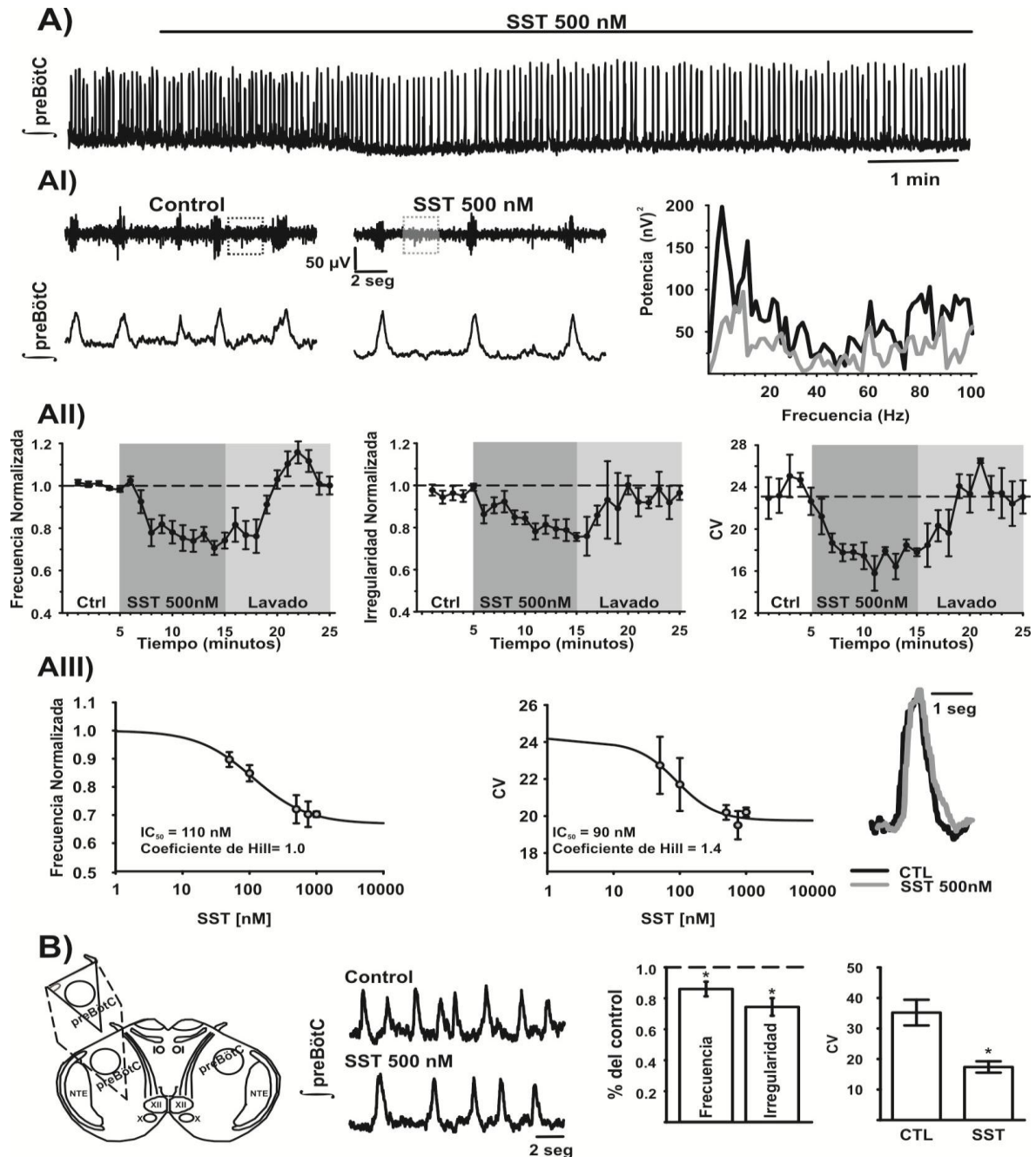
La aplicación de SST en condiciones de normoxia e *in vitro* produce una inhibición generalizada de la actividad del preBötC (Figs. 15 16). Esta inhibición, incluye un decremento de la actividad tónica de este circuito (Fig. 15 AI, trazos representativos), que se refleja en el análisis de la potencia de la actividad eléctrica del preBötC entre las ráfagas inspiratorias, mediante la transformada de Fourier (Fig. 15 AI, gráfica). La inhibición del preBötC por la SST, también se observa como una reducción en la frecuencia de la eupnea al  $75.7 \pm 2.2\%$ , respecto al control, después de 10 min de aplicación continua de 500 nM de SST ( $p < 0.05$ ;  $N = 5$ ; Fig. 15). El curso temporal de la reducción de la frecuencia de la eupnea, producida por 500 nM de SST (Fig. 15 AII, izquierda), muestra que la inhibición alcanza un estado estable después de 10 min, y que este efecto se revierte cuando se lava el fármaco (Fig. 15 AII, izquierda). Al tiempo en que la SST disminuye la frecuencia del ritmo respiratorio, también incrementa su regularidad, lo que se revela como una disminución de la irregularidad de la eupnea al  $76.6 \pm 1.9\%$  del control, después de 10 min de aplicación continua de 500 nM de SST ( $p < 0.05$ ;  $N = 5$ ; Fig. 15 AII, en medio). El decremento de la irregularidad también se observa como una disminución del coeficiente de variación de los periodos (CV) de  $22.6 \pm 1.3$  a  $17.8 \pm 0.4$ , en ausencia y presencia de SST, respectivamente ( $p < 0.05$ ; Fig. 15 A II, derecha). La irregularidad y el CV del ritmo respiratorio, presentaron un curso temporal y una reversibilidad similar a los encontrados en la reducción de la frecuencia por la SST. Además, el

incremento de la regularidad del ritmo producido por la SST también se observa como una disminución en la varianza de los periodos normalizados de 0.06 bajo condiciones control a 0.03 en presencia de SST ( $p < 0.05$ , evaluados con la prueba estadística de Levene).

En este trabajo, también se probaron diferentes concentraciones de SST (desde 50 nM hasta 1  $\mu$ M) y se cuantificaron sus efectos sobre la frecuencia y la irregularidad de la eupnea, con la intención de determinar la concentración inhibidora media ( $IC_{50}$ ) de este péptido. El análisis de estos experimentos, mediante una curva concentración–respuesta y el cálculo de la ecuación de Hill, muestra que la SST disminuye la frecuencia (Fig. 16 AIII, izquierda) y el CV (Fig. 16 AIII, derecha) de la eupnea de una manera dependiente de la concentración. Mediante el ajuste de esta curva, se encontró que la  $IC_{50}$  es de 110 y 90 nM y el coeficiente de Hill de 1.0 y 1.4, para el efecto de la SST sobre la frecuencia y el CV, respectivamente (Fig. 16 AIII). Por otra parte, cuando se evaluó el efecto de la SST sobre los patrones de las ráfagas inspiratorias, se encontró que la SST no modifica ni la amplitud, ni la duración, ni el tiempo de subida cuando se aplica a concentraciones menores de 500 nM (inserto de la Fig. 16 AIII). Sin embargo, cuando se aplicó SST a una concentración de 1  $\mu$ M, la SST incrementa significativamente la amplitud al  $121.4 \pm 3.0$  % del control, ( $p < 0.001$ ), la duración al  $122.0 \pm 8.2$  % del control ( $p < 0.05$ ) y el tiempo de subida al  $140.1 \pm 15.7$  % del control ( $p < 0.05$ ), de éstas ráfagas. Con base en estos resultados, se decidió utilizar una concentración de 500 nM de SST para el resto de los experimentos, con la finalidad de evaluar los efectos de este péptido sobre la ritmicidad del preBötC, en ausencia de cambios en las características cinéticas de las ráfagas inspiratorias.

En la figura 15 A, se muestra que la SST modula la generación de la eupnea, producida por el preBötC. Sin embargo, con estos experimentos no es posible diferenciar entre una acción directa de la SST sobre el preBötC y una posible acción indirecta de la SST sobre otros núcleos neuronales contenidos dentro de la rebanada de tallo cerebral (Fig. 16 B; Peña y Ramirez, 2002; Ptak et al., 2009). Tomando en consideración esto, se extrajeron islas del preBötC provenientes de rebanadas de tallo cerebral y se registró su actividad como se ha reportado antes (Tryba et al., 2008; Fig. 15 B). En estas islas, los efectos de la aplicación de 500 nM de SST fueron idénticos a los observados en la rebanada completa de tallo cerebral. Así, se encontró que la aplicación de SST reduce la frecuencia del ritmo respiratorio al  $83.51 \pm 4.29\%$  del control y también incrementa la regularidad del

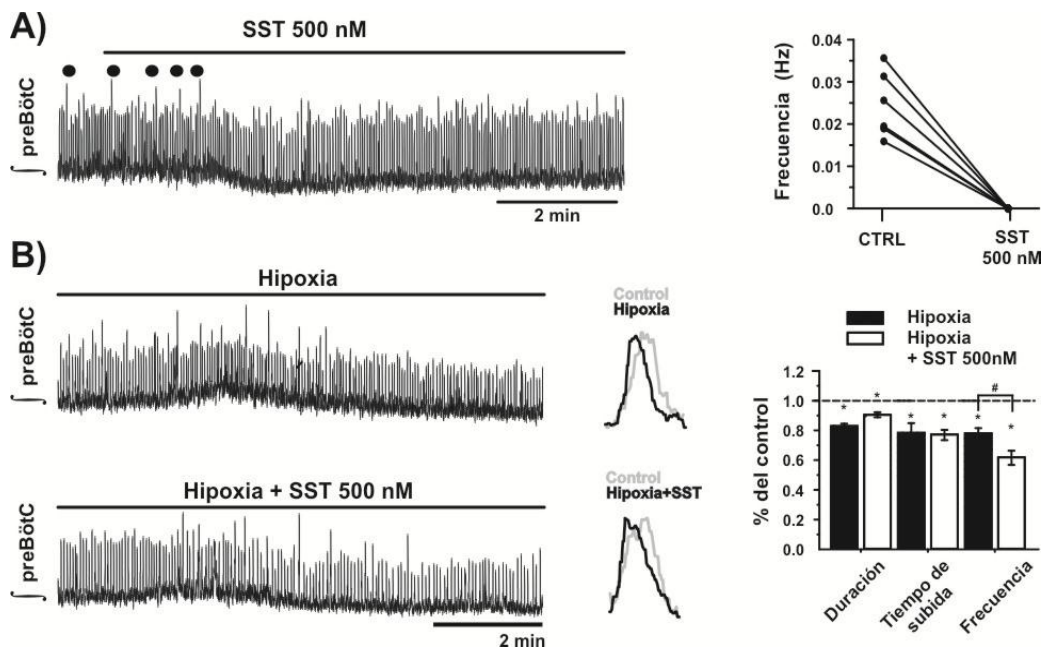
mismo (N = 7, Fig. 16 B, trazos representativos y primer gráfica;  $p < 0.05$ ). Esto último, se cuantificó como una reducción del índice de irregularidad, al  $67.49 \pm 7.15\%$  del control (N = 7;  $p < 0.05$ ), del CV (de  $35.9 \pm 2.9$  en ausencia de SST a  $18.9 \pm 1.6$  en presencia de SST, Fig. 15 B, gráfica de la derecha) y de la varianza de los periodos normalizados de 0.13 en condiciones control a 0.03 en presencia de SST ( $p < 0.05$ ). Estos datos, nos permiten concluir que la SST modula la actividad del preBötC, actuando directamente sobre éste núcleo.



**Figura 15. La somatostatina modula la generación de la eupnea actuando directamente sobre el preBötC.** A) Trazo representativo de la eupnea, obtenido por el registro de la actividad poblacional del preBötC en una rebanada de tallo cerebral, así como la modulación producida por la SST sobre la misma. AI) Registros representativos de la actividad del preBötC como señal cruda (trazos superiores) e integrada (trazos inferiores), en condiciones de normoxia, antes (control) y después de la aplicación de la SST. Los cuadros punteados en cada trazo representan los segmentos utilizados para realizar el análisis de Fourier mostrado en el lado derecho. AII) Cursos temporales de los datos normalizados para la frecuencia (gráfica de la izquierda), la irregularidad (gráfica de en medio) y el coeficiente de variación de los periodos (CV; gráfica de la derecha) de las ráfagas respiratorias durante condiciones control, en presencia de SST y el lavado de la misma. Es importante notar que la SST disminuye, de manera reversible, la frecuencia, la irregularidad y el CV. AIII) Curvas concentración–respuesta de la inhibición de la frecuencia (gráfica de la izquierda) y del CV (gráfica de la derecha) de las ráfagas inspiratorias producida por la SST. Las curvas concentración–respuesta se ajustaron con la ecuación de Hill, que calcula el valor de la  $IC_{50}$  y el coeficiente de Hill. Los valores obtenidos se muestran en cada una de las gráficas. El inserto muestra ráfagas representativas antes (negro) y durante (gris) la aplicación de SST con la intención de mostrar que su patrón es idéntico. B) Representación esquemática de una rebanada transversal de tallo cerebral y los cortes que se realizan para obtener una isla del preBötC. En el panel de en medio, se muestran los registros representativos de la eupnea obtenida de las islas del preBötC (control), así como la modulación de la SST sobre las mismas (SST 500 nM). Los efectos de la SST, sobre la frecuencia y la irregularidad de las ráfagas inspiratorias, se cuantificaron 10 minutos después de la aplicación continua de SST (gráfica de la izquierda). El CV también se calculó y se comparó con su control (gráfica de la derecha). Note que los efectos de la SST son idénticos a los observados en la preparación de la rebanada completa de tallo cerebral. \* indica una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al control. J preBötC, señal integrada del complejo preBötzinger; NTE, núcleo trigémino; X núcleo motor vago; XII, núcleo hipogloso.

Como mencionamos previamente, el preBötC en condiciones de normoxia produce otro ritmo respiratorio además de la eupnea. A este segundo ritmo respiratorio se le denomina suspiro (Lieske et al., 2000). En este estudio, se demuestra que, a diferencia de la modulación tenue de la SST sobre la eupnea, la misma concentración de SST (500 nM) inhibe completamente la generación de los suspiros en las rebanadas completas de tallo cerebral (N = 6, Fig. 16 A; los suspiros se marcan con un punto sobre ellos). Por otra parte, en condiciones de hipoxia, el preBötC se reconfigura y genera un tercer ritmo respiratorio, denominado boqueo (Lieske et al., 2000; Peña et al., 2004). Para estudiar el efecto de la SST sobre la generación de los boqueos, se aplicó 500 nM de SST y se esperó a que el efecto alcanzara un estado de inhibición estable (10 min). Después de esto, se modificaron las condiciones del registro y se indujo la hipoxia con la finalidad de evaluar la reconfiguración de la actividad del preBötC (Fig. 16 B). Como control, se comparó la generación de los boqueos en ausencia de SST (Fig. 16 B, trazo superior) con la generación de los mismos en presencia de este péptido (Fig. 16 B, trazo inferior). Previamente, se reportó que el patrón de las ráfagas inspiratorias cambia por la reconfiguración producida por la hipoxia (Lieske et al., 2000). Estos cambios, se caracterizan por una reducción en la duración de las ráfagas, en el tiempo de subida y en la frecuencia de las mismas (Lieske et al., 2000) (Fig. 16 B, inserto superior). En esta

tesis encontramos que las condiciones hipóxicas reducen estos parámetros al  $83.0 \pm 2.1\%$ , al  $78.4 \pm 6.5\%$ , y al  $78.0 \pm 6.8\%$  del control, respectivamente, en ausencia de SST ( $p < 0.05$ ,  $N = 5$ , Fig. 16 B, gráfica; barras negras). Estas modificaciones de las características de las ráfagas son las que permiten diferenciar a los boqueos de la eupnea (Fig. 16 B, inserto superior). Respecto a la generación de boqueos en las rebanadas bajo condiciones hipóxicas y en presencia de SST, se encontró que se reduce la duración (al  $90.4 \pm 3.4\%$  del control,  $p < 0.05$ ) y el tiempo de subida (al  $77.2 \pm 6.5\%$  del control;  $p < 0.05$ , Fig. 16 B, inserto inferior y gráfica, barras blancas) de las ráfagas inspiratorias generadas por el preBötC. Sin embargo, en presencia de la SST la reducción en la frecuencia de estas ráfagas por la hipoxia es más pronunciada ( $61.9 \pm 9.2\%$ ;  $N = 5$ , Fig. 17 B, gráfica, barras blancas) que en ausencia de SST ( $78.0 \pm 6.8\%$  del control  $p < 0.05$ ,  $N = 5$ ). Estos resultados indican que la SST también puede modular la reconfiguración del preBötC y en consecuencia la generación de boqueos que se presenta en condiciones hipóxicas.



**Figura 16. La somatostatina modula la generación de los suspiros y los boqueos generados por el preBötC.** A) Trazo representativo de la actividad rítmica de una rebanada de tallo cerebral que generó tanto eupnea como suspiros (marcados con círculos negros) y la desaparición de estos últimos por la aplicación de SST. El bloqueo de la generación de suspiros, observado en 6 rebanadas, se presenta de manera individualizada en la gráfica del lado derecho. B) Respuesta del preBötC a las condiciones hipóxicas en una rebanada control (trazo superior) y en una rebanada tratada con SST (trazo inferior). Los insertos en ambos casos muestran ráfagas representativas bajo condiciones de normoxia (eupnea, gris) y en condiciones de hipoxia (boqueo, negro). Las reducciones sobre la duración y el tiempo subida de las ráfagas, se mantienen inalteradas en presencia de la SST. Note que la disminución en la frecuencia de las ráfagas inspiratorias es mayor en las rebanadas tratadas con SST. Los parámetros de las ráfagas y la frecuencia de las mismas se cuantifican en la gráfica de la derecha. \*  $p < 0.05$ , respecto al control. #  $p < 0.05$ , entre los grupos que se indican.



## La SST endógena modula la actividad del preBötC.

Las neuronas del preBötC que están continuamente activas tienen la capacidad de producir SST (Stornetta et al., 2003) por lo que existe la posibilidad de que estas neuronas liberen constantemente SST y que ésta produzca una modulación tónica sobre este circuito neuronal, tal y como ha sido descrito para otros neuromoduladores como la serotonina (Peña y Ramirez, 2002; Ptak et al., 2009) y la sustancia P (Ptak et al., 2009). Con el objetivo de estudiar la posible modulación tónica de la SST, se bloqueó la activación endógena de sus receptores, usando un antagonista inespecífico de estos, la ciclosomatostatina (CSST; 100 y 500 nM; Fig. 17). Bajo estas condiciones, se encontró que la CSST no solamente incrementa la excitabilidad del preBötC (Fig. 17 A) sino que, además, bloquea la modulación sobre este circuito producida por la SST (Fig. 17 B). La aplicación de 100 nM de CSST produce un incremento significativo, tanto en la irregularidad como en la frecuencia de las ráfagas inspiratorias, a valores de  $135.3 \pm 8.2 \%$  y  $129.4 \pm 9.2 \%$  del control, respectivamente (Fig. 17 C, barras blancas;  $N = 5$ ;  $p < 0.05$ ). Además, la aplicación de 500 nM de CSST también incrementa la irregularidad al  $133.4 \pm 14.6 \%$  del control, y la frecuencia al  $119.8 \pm 7.4 \%$  del control (Fig. 17 C, barras blancas-líneas diagonales;  $p < 0.05$ ,  $N = 8$ , Fig. 17 C). El incremento de la irregularidad del ritmo respiratorio, producido por la CSST, también se observó al comparar, ya sea el coeficiente de variación de los periodos, CV (de  $19.89 \pm 1.57$  en control a  $28.37 \pm 1.73$  en presencia de CSST,  $N = 8$ ;  $p < 0.05$ ), o bien, la varianza del mismo, mediante el uso de la prueba de Levene (de 0.03 en control a 0.089 en presencia de CSST;  $N = 8$ ;  $p < 0.05$ ). En lo referente al patrón de las ráfagas inspiratorias, se determinó que la CSST disminuye significativamente su amplitud al  $93.0 \pm 2.5 \%$ , del control, con 100 nM de CSST; y al  $93.2 \pm 1.9 \%$ , del control, con 500 nM de CSST ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, este antagonista no afecta la duración ( $98.8 \pm 3.2 \%$  del control con 100 nM de CSST y  $100.7 \pm 2.0 \%$  del control con 500 nM de CSST), ni el tiempo de subida de estas ráfagas ( $93.0 \pm 5.3 \%$  del control con CSST 100 nM y  $105.5 \pm 3.6 \%$  del control con CSST 500 nM, Fig.17 A, e inserto).

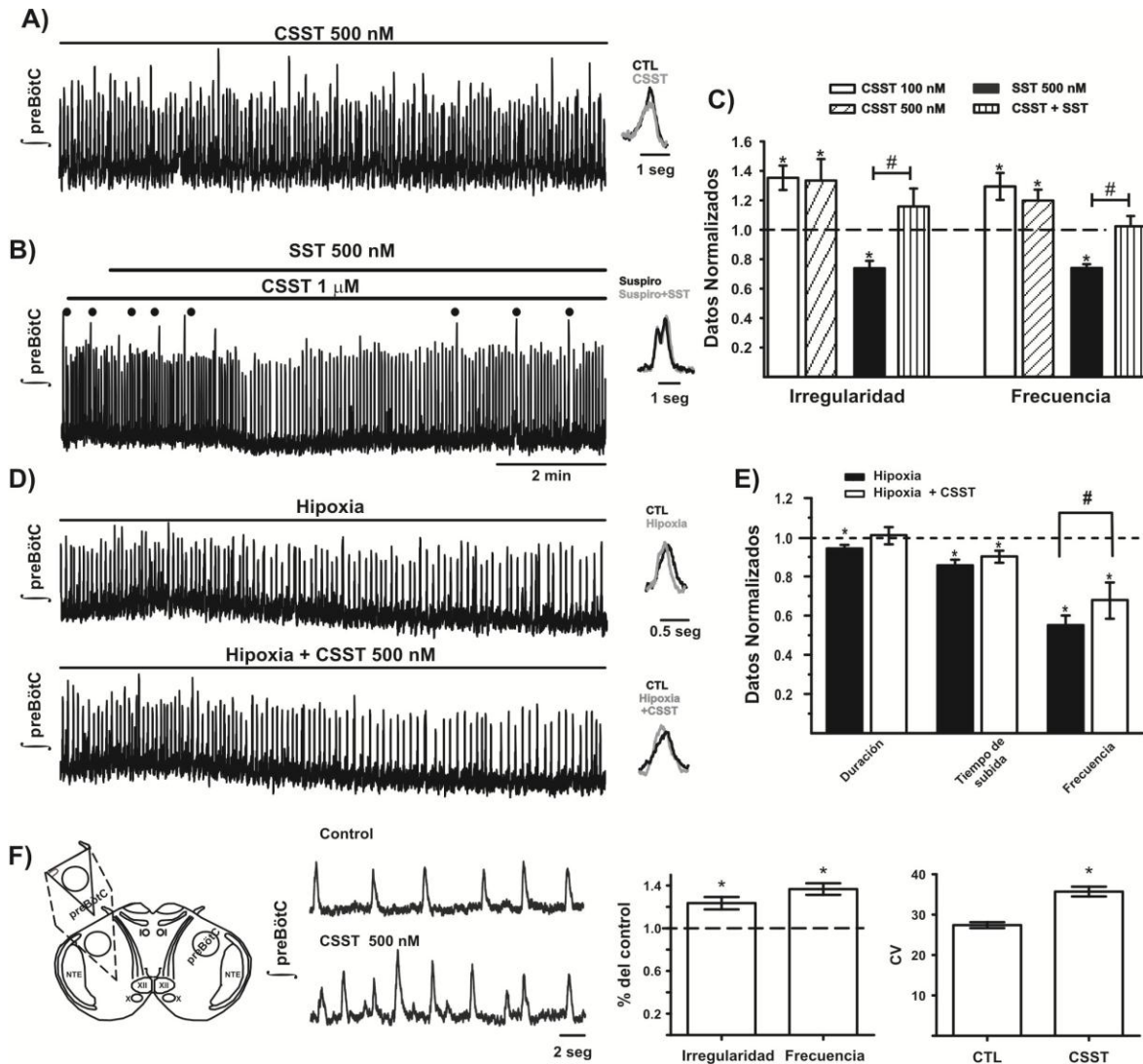
Además de los efectos de la CSST sobre el ritmo respiratorio, también se determinó que, cuando las rebanadas de tallo cerebral se pre-incuban con CSST, se previene la reducción, tanto de la frecuencia como de la irregularidad del ritmo respiratorio producida por la SST. Cuando se aplica SST, en presencia de CSST 500 nM, la frecuencia no se reduce ( $102.4 \pm 6.9 \%$  del control; Fig. 17 B

y C, barras blancas líneas verticales; N = 8;  $p < 0.05$ ). Además, la CSST bloquea la disminución de la irregularidad, inducida por la SST, lo que se cuantificó con el índice de irregularidad, que no cambia significativamente respecto al control ( $115.8 \pm 12.2$  %; Fig. 17 B y C); el análisis de CV, que tampoco cambió ( $25.3 \pm 1.7$  en control vs.  $24.8 \pm 2.8$  en presencia de CSST + SST) y mediante la varianza de los periodos normalizados, que tampoco se modificó ( $0.06$  en condiciones control vs.  $0.06$  en presencia de CSST + SST;  $p > 0.05$ ). Aunado a esto, la CSST también inhibió el bloqueo de la generación de suspiros producido por la SST (Fig. 17 B, ver el inserto).

Por otra parte, también se investigó el efecto del bloqueo de la activación endógena de los SSTRs bajo condiciones hipóxicas (Fig. 17 D). Como se mencionó arriba, la hipoxia disminuye la duración, el tiempo de subida y la frecuencia de las ráfagas respiratorias (Fig. 16). Cuando se preincuba con  $500$  nM de CSST, se previene la reducción en la duración de las ráfagas inspiratorias, producida por la hipoxia ( $101.0 \pm 4.1$  % del control, comparado con  $94.3 \pm 1.8$  % del control en rebanadas no tratadas con CSST; N = 8, Fig. 17 E, observar los insertos). Además, la CSST también atenúa significativamente la reducción de la frecuencia de los boqueos (a  $68.0 \pm 8.9$  % del control, comparado con  $55.1 \pm 4.9$  % del control en rebanadas sin ser tratadas con CSST,  $p < 0.05$ , Fig. 17 D y E), sin afectar la reducción en el tiempo de subida (a  $90.2 \pm 2.9$  % del control comparado a  $85.7 \pm 2.9$  % del control en rebanadas sin el tratamiento con CSST; N = 8, Fig. 17 D y E). En conjunto, estos resultados sugieren que la SST endógena modula constitutivamente la generación de los ritmos respiratorios por el preBötC, tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia (Fig. 17).

Finalmente, con la intención de investigar si la SST endógena modula directamente la generación del ritmo respiratorio por el preBötC, se registró de nueva cuenta la actividad de islas del preBötC (Tryba et al., 2008) y se evaluó el efecto de la CSST sobre las mismas (Fig. 17 F). De manera similar a los efectos producidos en la rebanada completa de tallo cerebral, la aplicación de  $500$  nM de CSST en las islas del preBötC, también incrementa la frecuencia de la eupnea, al  $136.7 \pm 5.40$  % del control (Fig. 17 F, trazos representativos y primer gráfica; N = 6;  $p < 0.05$ ) y la irregularidad del ritmo. Esto último, se cuantificó como un incremento en el índice de irregularidad de la eupnea al  $123.50 \pm 5.80$  %, del control (Fig. 17 F, primer gráfica; N = 6;  $p < 0.05$ ), en el CV (de  $27.40 \pm 0.74$  en control a  $35.73 \pm 1.22$  en presencia de CSST, Fig. 18 F, segunda gráfica) y en la varianza de los periodos normalizados (de  $0.07$  en control a  $0.115$  en presencia de CSST;  $p < 0.05$ ).

Estos experimentos, nos permiten sugerir que la SST se libera constitutivamente en el preBötC y que es capaz de actuar de manera autócrina.



**Figura 17. La SST endógena modula la generación del ritmo inspiratorio por el preBötC *in vitro*.** A) Registro representativo de la eupnea y la modulación sobre ésta producida por el antagonista inespecífico de los receptores de SST, la ciclosomatostatina (CSST, 500 nM). La CSST aumenta la frecuencia y la irregularidad de la eupnea. El inserto representa una rafea bajo condiciones control (negro) sobre una rafea en la presencia de CSST (gris). Nótese que la CSST reduce la amplitud de las rafeas inspiratorias. El incremento en la frecuencia y la irregularidad del ritmo después de la aplicación de CSST, así como el bloqueo de la modulación inducida por la SST, se cuantifican en el panel (C). B) Registro representativo de la eupnea y de los suspiros (marcados por los círculos negros) y el bloqueo de la modulación producida por la SST en presencia de la CSST. Los insertos representan un suspiro bajo condiciones control (negro)

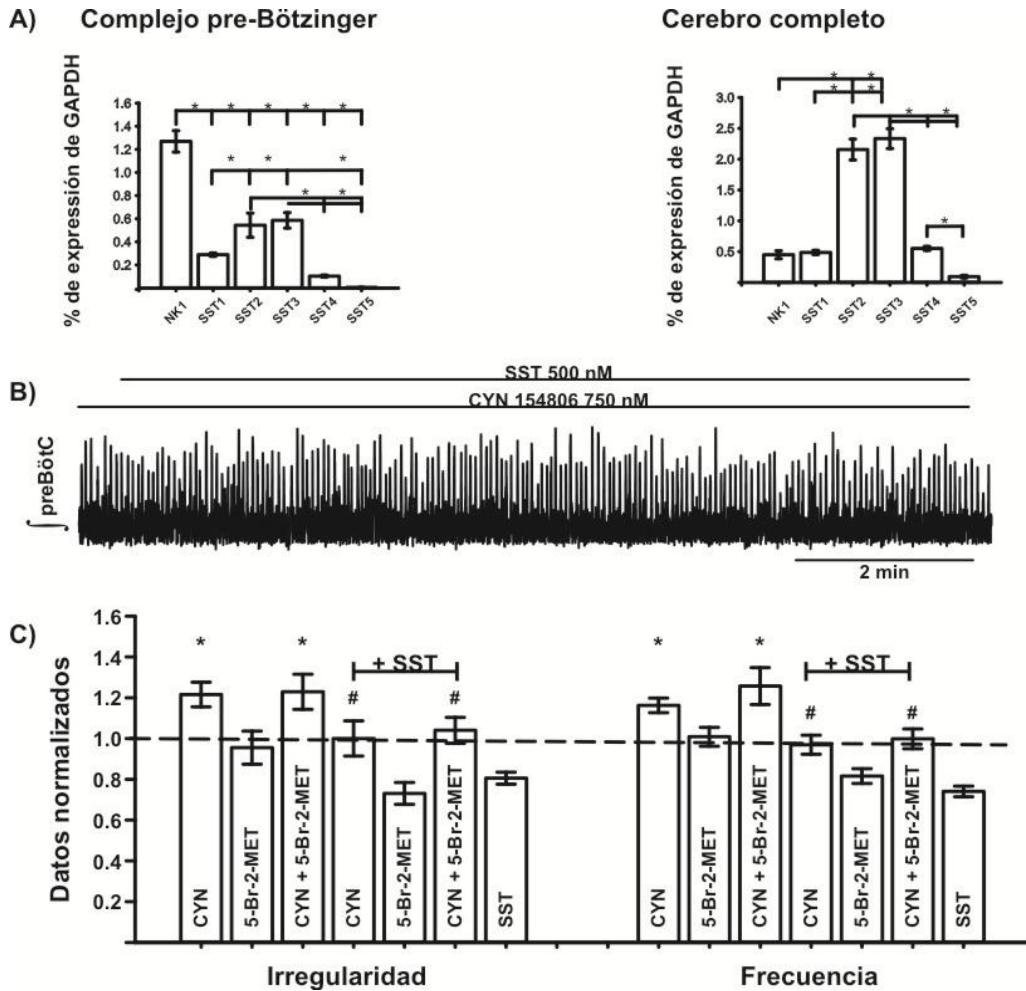
sobrepuesto con un suspiro en presencia de CSST y SST (gris). D) Respuestas representativas de la actividad poblacional del preBötC en condiciones hipóxicas en una rebanada control (trazo superior) y en una rebanada tratada con CSST (trazo inferior). Los insertos en ambos casos muestran ráfagas en normoxia (eupnea, negro) superpuestas con ráfagas en hipoxia (boqueo, gris). La CSST bloquea la reducción de la duración de éstas ráfagas y evita la inhibición en la frecuencia de las mismas en condiciones hipóxicas (indicada por el #). La cuantificación de estos parámetros se muestra en el panel (E). F) Representación esquemática de una rebanada de tallo cerebral y los cortes necesarios para obtener una isla del preBötC (izquierda). Registros representativos de la eupnea obtenidos de una isla del preBötC y su modulación por la CSST (trazos de en medio). El efecto de la CSST sobre la irregularidad y la frecuencia en islas del preBötC se cuantificó después de 10 minutos de aplicación continua de CSST (gráfica de la izquierda). El CV también se cuantificó y se comparó con su valor control (gráfica de la derecha). Note que los efectos de la CSST son idénticos a los observados en la rebanada completa del tallo cerebral. J preBötC, señal integrada del complejo preBötzinger; NTE, núcleo trigémino espinal; X núcleo motor vago; XII, núcleo hipogloso. \* indica una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al control. # indica una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a las rebanadas sin tratamiento.

## La SST modula la actividad del preBötC a través de sus receptores tipo2.

Recientemente se demostró que las neuronas del preBötC expresan el receptor tipo 2 de SST (SSTR2; Gray et al., 2010). Sin embargo, la expresión de otros tipos de receptores para este péptido no se ha investigado en este circuito neuronal, a pesar de la evidencia de que estos se encuentran ampliamente expresados a lo largo de todo el tallo cerebral (Breder et al., 1992; Eugenín et al., 2008; Spary et al., 2008). Con la intención de identificar los tipos de receptores de SST que se expresan en el preBötC, se analizó el ARNm proveniente de este circuito neuronal y se cuantificó la expresión de los 5 tipos de receptores para SST conocidos (Fig. 18 A, izquierda; Olias et al., 2004; Kumar y Grant, 2010). Paralelamente, se analizaron muestras de ARNm de cerebro completo, como un control positivo del funcionamiento correcto de todos los pares de *primers* utilizados. En estos experimentos, encontramos que, conforme a la literatura, las muestras obtenidas del preBötC mostraron una alta expresión de ARNm para el receptor a sustancia P, el receptor NK1R (Gray et al., 2001; Gray et al., 2010; Schwarzacher et al., 2011; Fig. 18 A, izquierda). Además, contrario a lo observado en las muestras del cerebro completo, donde se expresan los 5 receptores de SST (Breder et al., 1992; Spary et al., 2008; Tallent y Qiu, 2008; Epelbaum et al., 2009; Kumar y Grant, 2010) (Fig. 18 A, derecha), en las muestras del preBötC no se encontró expresión del SSTR5 (Fig. 18 A, izquierda). De los receptores para SST que se detectaron en el preBötC (SSTR1-SSTR4), los subtipos 2 y 3 (SSTR2 y SSTR3) son los que se encontraron con mayor expresión dentro de este circuito neuronal (Fig. 18 A, izquierda). Los niveles de expresión de ARNm cuantificados para el preBötC fueron: NK1 > SSTR3 = SSTR2 > SSTR1 = SSTR4, sin detección del SSTR5 (Fig. 18 A,

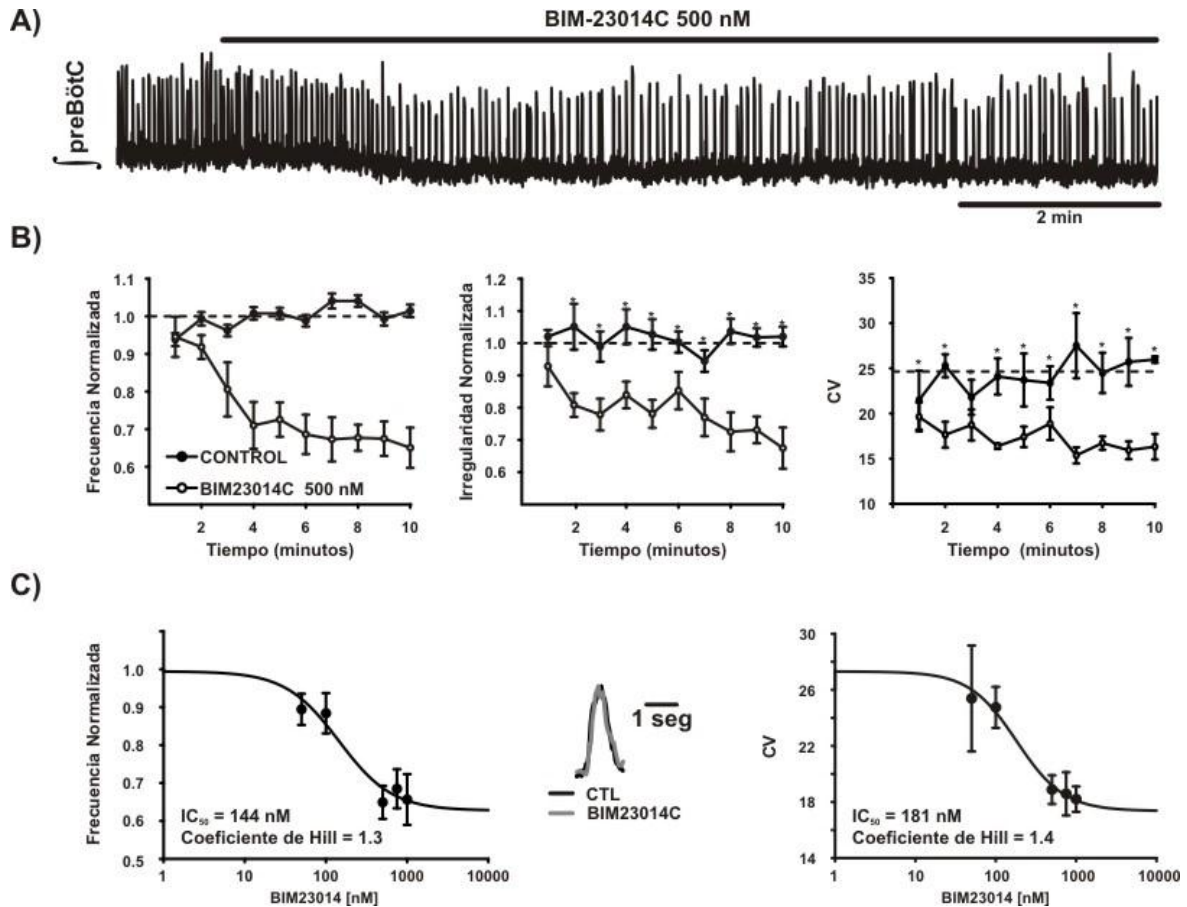
izquierda); y para el cerebro completo: SSTR3 = SSTR2 >> SSTR4 > SSTR1 = NK1 > SSTR5 (Fig. 18 A, derecha).

Tomando en cuenta estos resultados, se estudió si los SSTR2 y/o los SSTR3 están involucrados en la modulación somatostatinérgica del preBötC. Para esto, se evaluó el efecto de antagonistas específicos, para cada uno de estos receptores, ya sea independientemente, o en conjunto, sobre el ritmo respiratorio y se evaluó la capacidad de estos fármacos para evitar la reducción de la irregularidad y la frecuencia del ritmo respiratorio producida por la SST (N = 6, Fig. 18 C). En estas condiciones, se encontró que cuando se bloquean específicamente los SSTR2, con Cianamida 154806 (CYN, 500 nM), se incrementa tanto la irregularidad (al  $121.6 \pm 6.0$  % del control,  $p < 0.05$ ) como la frecuencia (al  $116.2 \pm 3.5$  del control; N = 6;  $p < 0.05$ ; Fig. 18 C) del ritmo respiratorio. Además, el tratamiento con este antagonista bloquea los efectos depresores de la SST sobre la actividad del preBötC. De este modo, cuando se aplica la SST en presencia de CYN, no se reduce la irregularidad ( $100.0 \pm 8.6$  %, del control, N = 7) ni la frecuencia ( $97 \pm 4.6$  %, del control, N = 6) del ritmo respiratorio (Fig. 18 B). Contrario a esto, cuando se bloquearon los SSTR3, con 5-Bromo-2-metoxipiridina (5-Br-2-Met), encontramos que no se modifica la actividad del preBötC y el ritmo respiratorio mantiene su frecuencia ( $100.9 \pm 4.6$ , del control) y su regularidad ( $95.5 \pm 8.1$  %, del control) (Fig. 18 C). Además, este antagonista no bloquea la modulación del preBötC, producida por la SST, de modo que la frecuencia y la irregularidad disminuyeron en cuando se aplicó ésta, en presencia del 5-Br-2-Met, a valores de  $73.1 \pm 5.3$  % y  $81.6 \pm 3.6$  %, del control, respectivamente ( $p < 0.05$ ; Fig. 18 C). Finalmente, cuando se coaplican ambos antagonistas, se producen los mismos resultados que se obtuvieron por el bloqueo de los SSTR2 con CYN. Esto es, un incremento de la frecuencia (al  $125.7 \pm 9.1$  %, del control,  $p < 0.05$ ); y de la irregularidad (al  $122.9 \pm 8.6$  % del control,  $p < 0.05$ ) del ritmo respiratorio. Tomando en cuenta nuestros resultados, se concluye que la neuromodulación del preBötC inducida por la SST es mediada exclusivamente por la activación de los SSTR2.



**Figura 18. La SST modula la generación del ritmo respiratorio a través de sus receptores tipo 2, *in vitro*.** A) Se muestra la cuantificación del ARNm obtenida por la qPCR en distintas muestras. En el panel izquierdo se presentan los datos obtenidos para el preBötC y en el panel derecho los datos obtenidos para el cerebro completo. Los niveles del ARNm para los receptores de SST y el receptor NK1 se expresan como porcentaje de ARNm de la enzima GAPDH. Los SSTR2 y SSTR3 son los transcritos más expresados en ambas muestras. B) Trazo representativo de la eupnea y el bloqueo de su modulación por la SST en presencia del antagonista específico del receptor SSTR2, la cianamida (CYN). C) Cuantificación de los efectos sobre la irregularidad y la frecuencia del ritmo respiratorio producidos por los antagonistas específicos de los SSTR2 y SSTR3, CYN y 5-bromo-2-metoxipiridina (5-Br-2-MET), respectivamente. También se muestran los efectos de estos antagonistas sobre la modulación producida por la SST. Note que el bloqueo de los SSTR2 incrementa tanto la irregularidad como la frecuencia de la eupnea y además elimina la reducción, producida por la SST, de la frecuencia y la irregularidad del ritmo respiratorio. El bloqueo de los SSTR3 no afecta la eupnea ni la inhibición de ésta producida por la SST. \* indica una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al control. # indica una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a las rebanadas tratadas con SST (última barra mostrada para cada parámetro).

Para confirmar que la modulación del preBötC por la SST se produce a través de los SSTR2, se evaluaron los efectos de un agonista específico para estos receptores, el BIM23014C, sobre la generación del ritmo respiratorio (Fig. 19 A). Bajo estas condiciones, se encontró que el BIM23014C 500 nM reduce la frecuencia de la eupnea al  $64.9 \pm 4.4$  % del control (N = 6,  $p < 0.05$ ) (Fig. 19 B, gráfica izquierda) y que esto es dependiente de la concentración (Fig. 19 C). Al igual que con la SST, se observó que la aplicación de BIM23014C también incrementa la regularidad del ritmo respiratorio. Esto último se cuantificó como una disminución en el índice de irregularidad, al  $72.2 \pm 7.1$  % del control (Fig. 19 B, gráfica de en medio N = 6;  $p < 0.05$ ), una reducción en el CV ( $25.7 \pm 0.4$  en control vs.  $16.3 \pm 1.48$  en presencia de BIM23014C,  $p < 0.05$ , N = 6) y una menor varianza de los periodos normalizados (0.06 en control vs. 0.02 con BIM23014C, N = 6;  $p < 0.05$ ). Al analizar los cursos temporales de los efectos de este agonista sobre la frecuencia, la irregularidad y el CV se encontró un patrón similar al observado cuando se aplicó SST (Fig. 19 B). Por último, a través del ajuste de una curva concentración–respuesta de los efectos del BIM23014C sobre la frecuencia (Fig. 19 C, izquierda) y sobre el CV (Fig. 19 C, derecha), se obtuvieron valores de  $IC_{50}$  de 144 y 181 nM y coeficientes de Hill de 1.3 y 1.4, respectivamente. Al igual que cuando se aplicó 500 nM de SST, el agonista de los SSTR2 no modifica los parámetros de las ráfagas inspiratorias. De este modo, la amplitud ( $87.45 \pm 12.0$  % del control), la duración ( $97.9 \pm 5.2$  % del control) y el tiempo de subida ( $100.07 \pm 6.2$  % del control; N = 6) se mantienen inalterados en presencia de 500 nM del BIM23014C (Fig. 19 C, inserto). En conjunto, los resultados previos muestran que los receptores del tipo 2 de SST median la neuromodulación del preBötC, producida por la SST.



**Figura 19. La activación específica de los SSTR2 mimetiza la modulación somatostatinérgica del preBötC.** A) Registro representativo de la eupnea generada por el preBötC en una rebanada de tallo cerebral y su modulación por el agonista específico de los SSTR2, el BIM23014C. B) Cursos temporales de la frecuencia (gráfica de la izquierda), la irregularidad (gráfica de en medio) y el coeficiente de variación de los periodos (CV; gráfica de la derecha) en condiciones control (círculos negros) y en presencia del BIM23014C (círculos blancos). El BIM23014C disminuye la irregularidad y la frecuencia de la eupnea así como el CV. C) Curvas concentración-respuesta de BIM23014 sobre la frecuencia (izquierda) y el CV (derecha). Con los valores de estas curvas se calcularon la IC<sub>50</sub> y el coeficiente de Hill mostrados en cada una de las gráficas. El inserto muestra que las ráfagas en ausencia (negro) y presencia (gris) del BIM23014C 500 nM no presentan cambios en su patrón. \* significa un valor de  $p < 0.05$  con respecto al control, comparados en el mismo momento.

**La aplicación de SST exógena se asocia con la activación de diferentes canales de K<sup>+</sup> en el preBötC.**

Después de determinar que el receptor somatostatinérgico involucrado en la modulación del preBötC es el SSTR2 en este trabajo se investigaron los posibles canales iónicos involucrados en

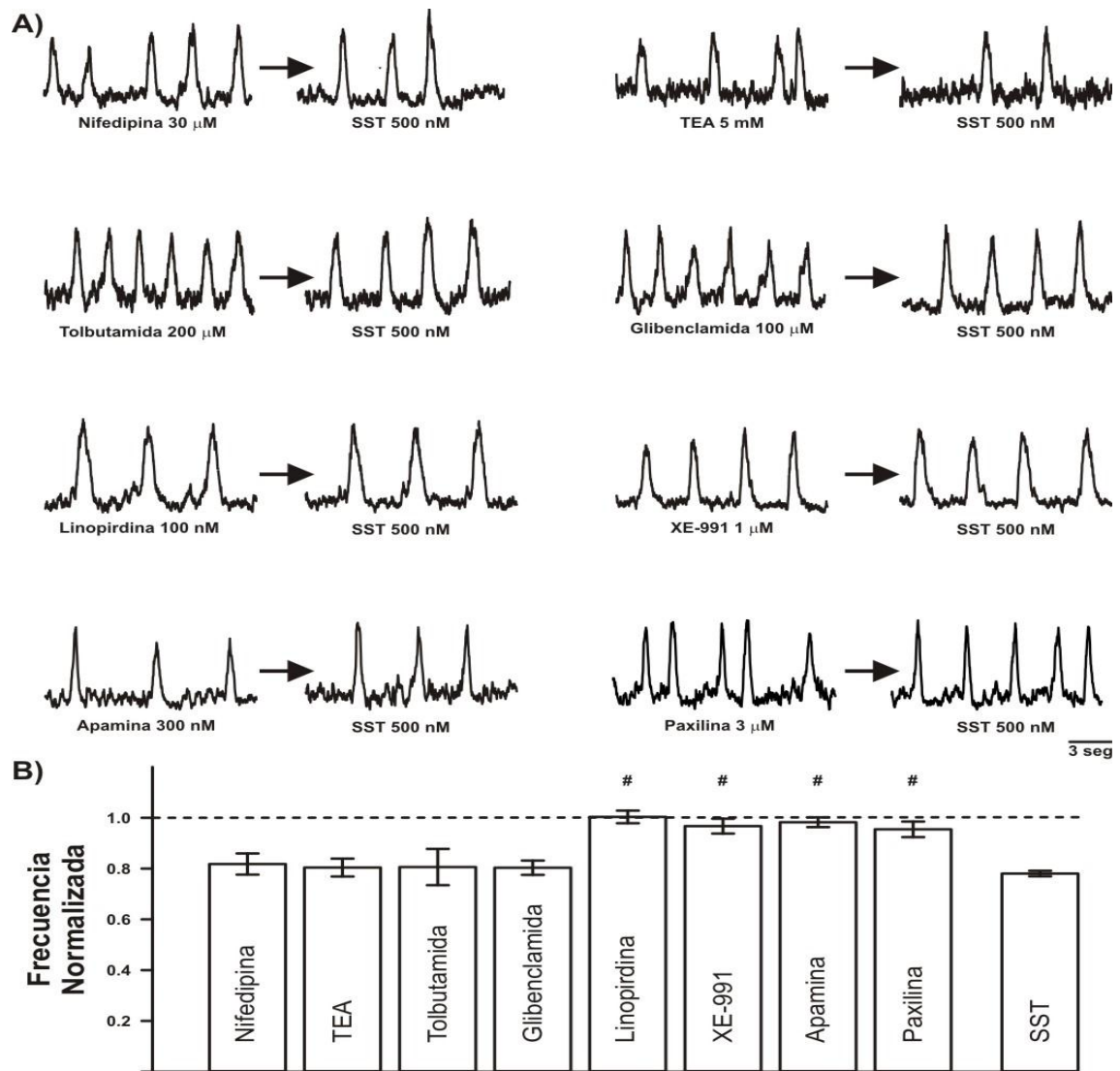


esta modulación. Diversos estudios han reportado que la SST activa diferentes canales de potasio (Moore et al., 1988; Watson y Pittman, 1988; Wang et al., 1989; Schweitzer et al., 1990; White et al., 1991; Shapiro y Hille, 1993; Duerson et al., 1996; Kim et al., 2002; Sun et al., 2002; Meis et al., 2005; Galarraga et al., 2007) e inhibe algunos canales de calcio (Wang et al., 1990; Shapiro y Hille, 1993; Meriney et al., 1994; e Silva y Lewis, 1995; Viana y Hille, 1996; Baratta et al., 2002; Vilchis et al., 2002). Conociendo esto, se investigó qué canales iónicos se podrían activar o inhibir por la SST y así ser los responsables de la modulación de la actividad del preBötC. Para estudiar esto, se registró la actividad poblacional del preBötC en presencia de bloqueadores de diversos canales iónicos, durante 10 minutos. Posteriormente, se aplicó la SST a una concentración de 500 nM y se determinó si ésta continuaba produciendo el efecto depresor caracterizado sobre la frecuencia del ritmo respiratorio (Fig. 20). Para evaluar la posible participación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L del preBötC, se utilizó un bloqueador específico de estos, la nifedipina (30  $\mu\text{M}$ ) (Mironov y Richter, 1998; Triggle, 2006). Bajo estas condiciones, la aplicación de SST todavía reduce la frecuencia del ritmo respiratorio, al  $81.8 \pm 4.2$  % del control (Figura 20). Respecto a los canales de potasio, en primer lugar, se evaluó la posible participación de canales de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje, mediante la aplicación de TEA (5 mM) (Mathie et al., 1998) y se encontró que en presencia de este bloqueador, la SST reduce la frecuencia del ritmo al  $80.6 \pm 3.2$  % del control. Otro tipo de canales de  $\text{K}^+$  que se modulan por la SST son los dependientes de ATP ( $\text{IK}_{\text{ATP}}$ ) (de Weille et al., 1989). Para estudiar la posible participación de estos canales sobre los efectos de la SST, se usaron dos bloqueadores: la tolbutamida (200  $\mu\text{M}$ ) y la glibenclamida (100  $\mu\text{M}$ ) (Mironov et al., 1998). En ambos casos, se observó que la SST también continúa disminuyendo la frecuencia del ritmo respiratorio, al  $80.6 \pm 7.2$  % y al  $80.3 \pm 2.8$  del control, respectivamente (Fig. 20).

En vista de que ni los canales de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje, ni los  $\text{IK}_{\text{ATP}}$ , son los responsables de la reducción de la frecuencia del ritmo respiratorio producida por la SST, se evaluó si otra corriente de  $\text{K}^+$ , que también es modulada por la SST, la corriente M ( $I_{\text{M}}$ ) (Moore et al., 1988; Watson y Pittman, 1988; Schweitzer et al., 1990; Schweitzer et al., 1998; Vilchis et al., 2002), podría estar involucrada en los efectos de la SST sobre el preBötC. Para bloquear la  $I_{\text{M}}$  se utilizaron dos bloqueadores específicos de ésta, la linopirdina (100 nM) y el XE-991 (1  $\mu\text{M}$ ) (Sun y Kapur, 2012). En presencia de cualquiera de estos dos bloqueadores, la aplicación de SST es incapaz de reducir la frecuencia de la actividad respiratoria. De este modo, los valores de la frecuencia se mantienen al

100.3 ± 2.5 % y al 96.7 ± 2.9 % del control, cuando se aplica la SST a rebanadas pre-incubadas con linopirdina y XE-991, respectivamente (Fig. 20 B).

Finalmente, otra familia de canales de K<sup>+</sup> que se activa por la SST, es la de los canales de potasio dependientes de calcio (IK<sub>Ca</sub>) (Duerson et al., 1996; Galarraga et al., 2007). Para evaluar la posible participación de estos canales en la modulación del ritmo respiratorio por la SST, se utilizó apamina (300 nM) y paxilina (3 μM) como bloqueadores de estos (Wang et al., 2006; Hou et al., 2012). Cuando se bloquearon los canales SK, con apamina, se encontró que la frecuencia del ritmo respiratorio no cambió por la aplicación de SST (98.2 ± 1.9 % del control). Por otra parte, el bloqueo de los canales BK, con paxilina, también previene el efecto depresor de la SST sobre el preBötC y mantiene el valor de la frecuencia del ritmo al 95.4 ± 3.1 % del control (Fig. 20). Estos resultados, nos permiten sugerir que la modulación de la actividad del preBötC por la SST está asociada con corrientes de K<sup>+</sup>, como son la I<sub>M</sub> y las corrientes de potasio dependientes de calcio.



**Figura 20. La inhibición de la actividad poblacional del preBötC, producida por la SST, está asociada a la  $I_M$  y a las corrientes de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$ .** A) Registros representativos de la eupnea producida por el preBötC en presencia de varios bloqueadores de canales iónicos antes (previos a la flecha) y después (al término de la flecha) de 10 minutos de la aplicación continua de SST. Note que la SST reduce la generación de la eupnea en presencia de bloqueadores de canales de calcio tipo L (nifedipina), canales de potasio activados por voltaje (TEA) y canales de potasio dependientes de ATP (tolbutamida y glibenclamida). Contrario a esto, la SST no reduce la frecuencia respiratoria en presencia de los bloqueadores de la corriente M (linopirdina y XE-991) o en presencia de los bloqueadores de canales de potasio dependientes de calcio, ya sean SK (apamina) o BK (paxilina). B) Cuantificación de la modulación producida por la SST sobre la frecuencia de la eupnea en presencia de estos bloqueadores. # indica una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) comparados con el efecto producido por la SST (última barra de la gráfica).

## **La somatostatina inhibe la actividad eléctrica de las neuronas del preBötC.**

El preBötC contiene diferentes tipos de neuronas respiratorias que se clasifican según su patrón de disparo (McCrimmon et al., 2000; Thoby-Brisson y Ramirez, 2000; Duffin, 2004; Hayes y Del Negro 2007). Después de estudiar la modulación, a nivel poblacional, del preBötC por la SST se investigó el efecto de ésta a nivel celular, tanto sobre neuronas no-marcapaso como neuronas marcapaso (Fig. 21). Para esto, se hicieron registros electrofisiológicos simultáneos en los que se registró la actividad poblacional y la actividad unitaria de los diferentes tipos neuronales del preBötC (Peña et al., 2004; Zavala–Tecuapetla et al., 2008). El ritmo poblacional, se utilizó para determinar el tipo de neurona respiratoria que se registraba. La respuesta típica de las células respiratorias a la aplicación de SST se ilustra en la parte superior de la figura 21 A. En nuestros experimentos se observó que 39 de 48 neuronas disminuyeron su actividad eléctrica en respuesta a la aplicación de SST. En lo que respecta a las neuronas respiratorias de tipo no-marcapaso, se encontró que su actividad eléctrica se disminuye por la SST, lo que se cuantifica como una hiperpolarización del potencial de membrana en reposo de  $3.9 \pm 0.5$  mV (Fig. 21 A, primer gráfica) y como una disminución de la frecuencia de disparo de sus potenciales de acción (al  $61.4 \pm 4.9$  % del control; Fig. 21 A, segunda gráfica). Sin embargo, esta disminución de la actividad neuronal no se reflejó en un cambio sobre la resistencia de entrada de estas células respiratorias ( $305.9 \pm 34.15$  M $\Omega$  vs.  $321.3 \pm 36.56$  M $\Omega$ ; en ausencia y presencia de SST, respectivamente;  $p > 0.05$ ). Además, se observó que la reducción de la excitabilidad de las neuronas no-marcapaso se asocia con una reducción en la actividad sináptica espontánea (Fig. 21 B). La reducción de la actividad sináptica se evaluó mediante la cuantificación de los potenciales sinápticos espontáneos de las neuronas respiratorias en ausencia y en presencia de SST. Así, se determinó que cuando se aplica la SST, los potenciales sinápticos disminuyen significativamente su frecuencia (al  $56.8 \pm 9.9$  % del control; Fig. 21 B, primer gráfica) y su amplitud (al  $76.3 \pm 7.6$  % del control; Fig. 21 B, segunda gráfica). Estos resultados nos sugieren que los efectos de la SST en el preBötC pueden ocurrir tanto a nivel presináptico como postsináptico (Balleza-Tapia et al., 2010; Peña et al., 2010).

Actualmente, se propone que el preBötC es el circuito generador del ritmo respiratorio y que este ritmo depende de la actividad de neuronas con propiedades marcapaso (Peña et al., 2004; Ramirez et al., 2004). Las neuronas marcapasos se caracterizan por su habilidad de producir

ráfagas ectópicas de potenciales de acción y que, además, mantienen su actividad rítmica en ausencia de transmisión sináptica (Peña et al., 2004; Zavala–Tecuapetla et al., 2008). Con la intención de estudiar la modulación somatostatinérgica de las neuronas marcapaso del preBötC, se registró la actividad eléctrica de éstas, aisladas sinápticamente, tanto en ausencia como en presencia de SST (Fig. 21 C). Bajo estas condiciones, se encontró que la SST reduce la frecuencia de los potenciales de acción de las ráfagas de las neuronas marcapaso, al  $42.5 \pm 14.2$  % del control (N=12; Fig. 21 C) y también hiperpolariza su potencial de membrana en reposo  $3.63 \pm 1.0$  mV. Además, cuando se analizó el efecto de la SST sobre las ráfagas intrínsecas de potenciales de acción de las neuronas marcapaso se observó una disminución significativa de la frecuencia de las mismas al  $34.51 \pm 9.74$  % del control. Sin embargo, esta inhibición no necesariamente refleja una inhibición generalizada de las propiedades intrínsecas marcapaso, debido a que las ráfagas de potenciales de acción que se generan en presencia de SST incrementan su amplitud al  $109 \pm 4.26$  % del control (N=12;  $p < 0.05$ ) y no disminuyen su duración ( $125.2 \pm 30.4$  % del control). Basándonos en estos resultados, sugerimos que la SST inhibe la generación del ritmo respiratorio reduciendo la excitabilidad de las neuronas respiratorias y sus interacciones sinápticas.

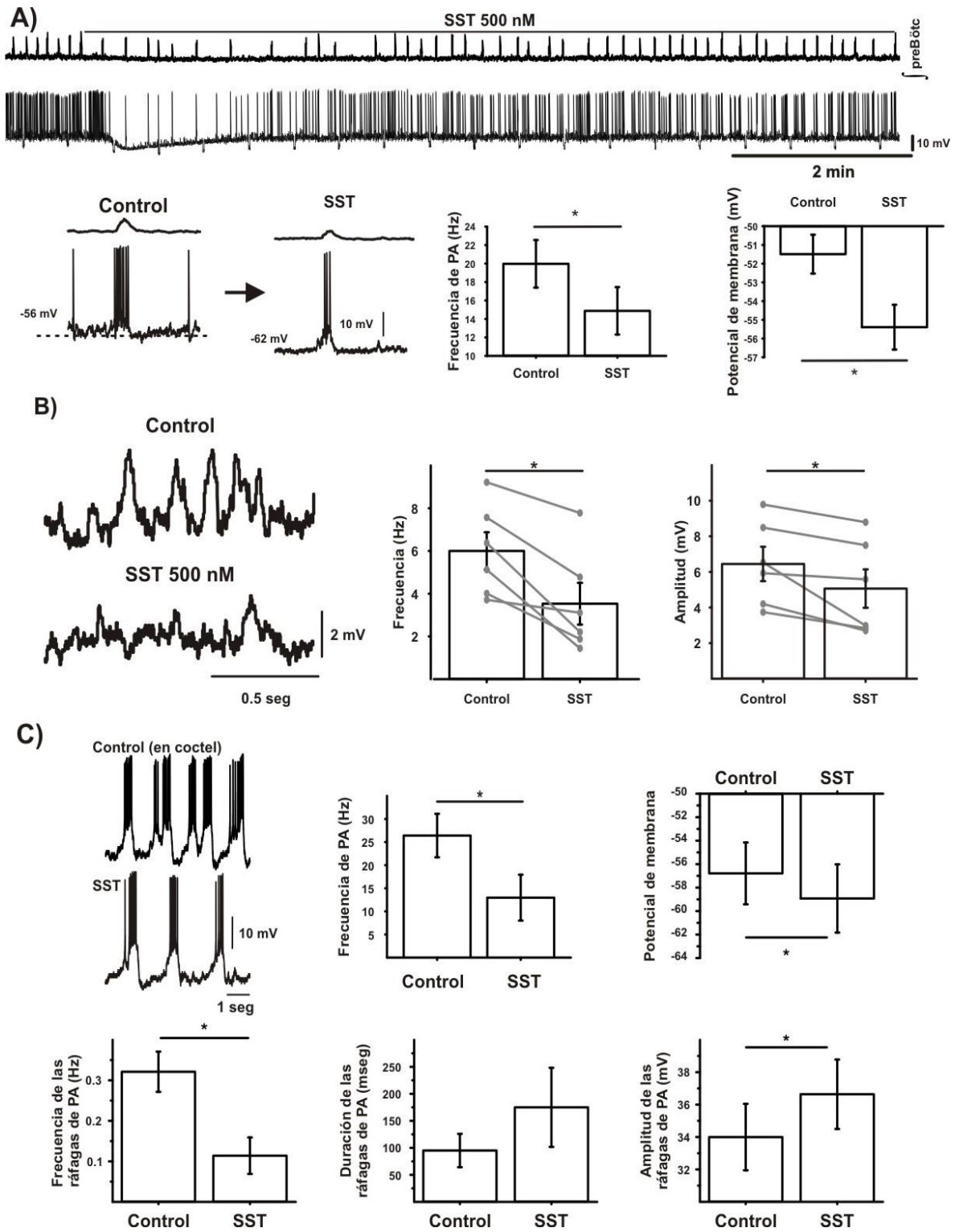


Figura 21. La SST inhibe la frecuencia de disparo, tanto de neuronas no-marcapaso como de neuronas marcapaso del preBötC y sus interacciones sinápticas. A) Se muestran trazos representativos de la modulación producida por la SST sobre una neurona no-marcapaso (trazo inferior) registrada simultáneamente con la actividad poblacional del preBötC (trazo superior). Se presenta el registro expandido de la misma neurona antes (control) y

después de la aplicación de la SST. En las gráficas se representa la cuantificación de los cambios en la frecuencia de los potenciales de acción (gráfica de la izquierda) y en el potencial de membrana (gráfica de la derecha) producidos por la SST sobre células no-marcapaso. B) Trazos representativos de potenciales postsinápticos espontáneos de una célula no-marcapaso, antes (trazo superior) y después de la aplicación de SST (trazo inferior). En las gráficas se muestra la cuantificación de la reducción de la frecuencia (izquierda) y la amplitud (derecha) de estos potenciales en presencia de SST. C) Trazos representativos de ráfagas intrínsecas de potenciales de acción de neuronas marcapaso aisladas sinápticamente (en presencia de un coctel de antagonistas de receptores a glutamato, GABA y glicina, trazo superior), antes (trazo superior) y después de la aplicación de la SST (trazo inferior). Las gráficas muestran la cuantificación de la frecuencia de los potenciales de acción (gráfica superior izquierda), de la frecuencia de las ráfagas de potenciales de acción (gráfica inferior izquierda) y de la amplitud de estas ráfagas (gráfica inferior derecha) en presencia de SST. También se muestra que la SST hiperpolariza el potencial de membrana de las células marcapaso (gráfica superior derecha) y tiende a incrementar la duración de las ráfagas (gráfica inferior de en medio). \* indica un valor de  $p < 0.05$  comparado con la condición control.

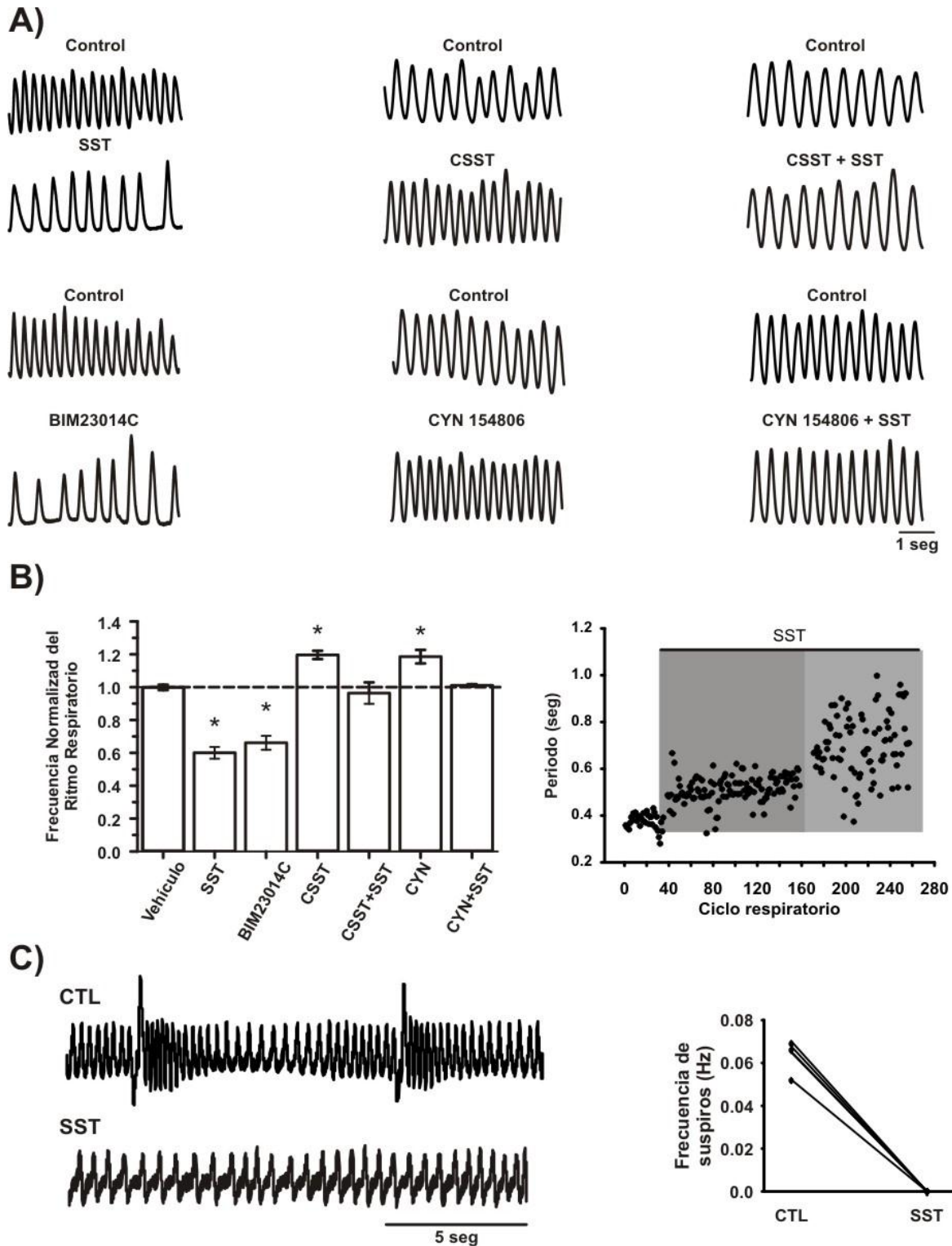
### **La somatostatina inhibe la respiración *in vivo*.**

Una vez que se determinó que la SST modula directamente al preBötC *in vitro*, en la parte final de este trabajo se decidió investigar si estos efectos de la SST correlacionan con sus efectos sobre la generación de la respiración, *in vivo* (Fig. 22). Para estudiar esto, se evaluó la frecuencia respiratoria de ratones neonatos, mediante registros pletismográficos, tanto en condiciones control (líquido cefalorraquídeo), como en presencia de SST, o bien, sus agonistas y antagonistas. Estos fármacos se aplicaron mediante una micro-inyección, intracisternal (Fig. 22 A; Yoneda et al., 1991; Martínez et al., 1995; Martínez et al., 2000; Peña y Aguilera, 2007; Peña et al., 2008; Zavala-Tecuapetla et al., 2008). De manera consistente con los resultados obtenidos *in vitro*, la inyección de SST, reduce la frecuencia (al  $60 \pm 3.6$  % del control, Fig. 22 B; N = 11;  $p < 0.0001$ ) y la irregularidad ( $55.69 \pm 4.95$  % del control, Fig. 22 B; N = 11;  $p < 0.0001$ ) de la respiración. Además, se observó que el agonista específico de los SSTR2, el BIM23014C, mimetiza los efectos de la SST y reduce tanto la frecuencia como la irregularidad de la respiración, a valores del  $66.1 \pm 4.2$  % y  $50.57 \pm 6.6$ %, del control, respectivamente (Fig. 22 B; N = 7;  $p < 0.001$ ). Por otra parte, el bloqueo inespecífico de los SSTRs (SSTR1–SSTR5), con CSST, o bien, el bloqueo específico de los SSTR2, con cianamida 154806, incrementan significativamente la frecuencia respiratoria, al  $119.6 \pm 2.5$  % del control, y al  $118.6 \pm 4.1$  % del control, respectivamente (Fig. 22 B; N = 6;  $p < 0.05$ ). En estas condiciones, el aumento de la frecuencia también se acompañó de un incremento en la irregularidad, al  $130 \pm 8.7$  cuando se aplicó CSST, y al  $125.3 \pm 7.9$  % cuando se aplicó CYN. Además, se observó que los efectos de la SST, sobre la frecuencia y la irregularidad, se bloquean cuando se coaplica con

el antagonista inespecífico de los SSTRs (CSST), o bien, con el antagonista selectivo de los SSTR2, la cianamida 154806 (CYN). Cuando se coaplicó la CSST con la SST, la frecuencia se mantuvo en valores del  $96.4 \pm 6.5$  % del control (N = 5) y la irregularidad al  $103.1 \pm 6.9$  %, del control. Por otra parte, la coaplicación de CYN y SST mantiene la frecuencia en valores del  $101.1 \pm 0.6$  % del control (N = 5) y la irregularidad en valores del  $98.84 \pm 7.1$  %.

En un estudio previo, en el que se utilizó la preparación *en bloc*, se reportó que la SST reduce la frecuencia respiratoria a través de un “enlentecimiento cuántico”, es decir, que los valores de los periodos entre cada ciclo respiratorio de las condiciones control se incrementaron a manera de múltiplos enteros cuando se aplicó la SST (Gray et al., 2010). Este tipo de enlentecimiento cuántico de la respiración, también se ha observado cuando se aplican de algunos opioides en el cerebro (Gray et al., 1999; Mellen et al., 2003). Conociendo estos antecedentes, aquí se realizó un análisis más detallado del efecto de la SST sobre la temporalidad de la respiración, con el objetivo de determinar si la SST reduce la frecuencia respiratoria de forma cuántica, bajo condiciones *in vivo*. Para evaluar esto, se cuantificaron los periodos de cada uno de los ciclos respiratorios, bajo condiciones control y durante la inyección de SST. Al realizar este análisis, se encontró que el efecto inhibitorio de la SST (que se refleja como un incremento en el periodo de los ciclos respiratorios) se presenta en forma de incrementos “escalonados” de los periodos. Esto se observó en 9 de 11 ratones tratados con SST (Fig. 22 B, gráfica derecha). Finalmente, en lo que respecta a la generación de los suspiros, *in vivo* (Fig. 22 C, trazos de la izquierda), se observó que la inyección de SST inhibe completamente la generación de éstos (N = 4; Fig. 22 C, gráfica derecha).



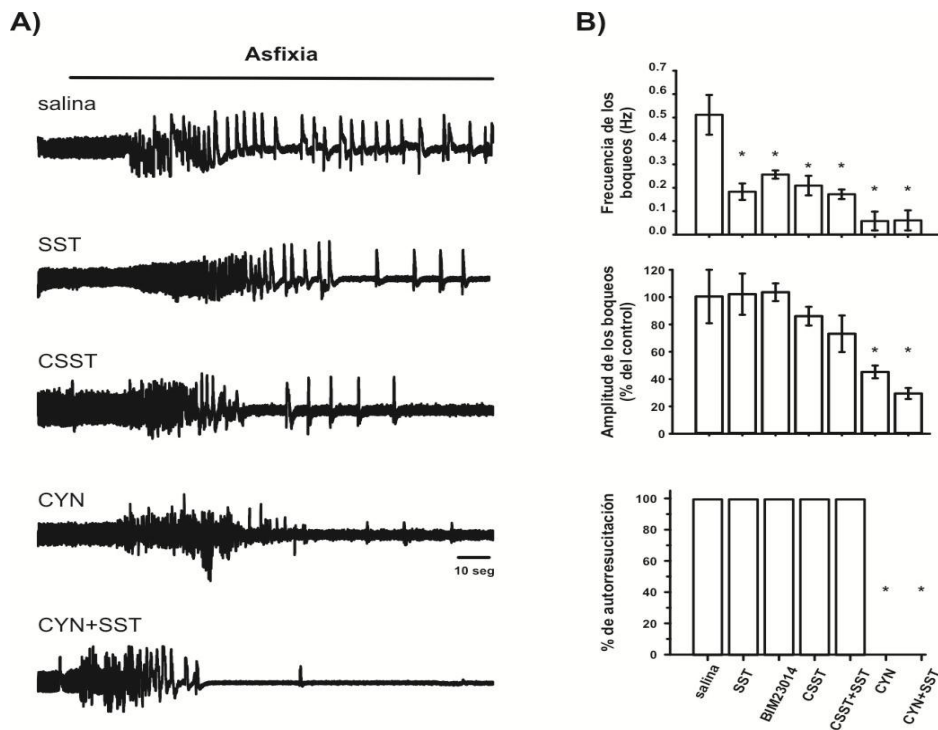


**Figura 22. La SST induce un enlentecimiento “tipo-cuántico” de la respiración a través de la activación de los SSTR2. A)** Registros pletimográficos representativos de la respiración antes (control) y después de la inyección intracisternal de agonistas y antagonistas de los SSTRs. La SST, al igual que el agonista de los SSTR2 (BIM23014C), reduce la frecuencia respiratoria mientras que el bloqueo de la activación de los SSTR2 endógenos incrementa la

respiración (CYN) y evita los efectos de la SST sobre la misma (CYN154806 + CSST). B) La gráfica de la izquierda muestra la cuantificación de la frecuencia respiratoria de los experimentos mostrados en el panel A. La gráfica de la derecha muestra un curso temporal representativo del enlentecimiento “tipo-cuántico” producido por la SST. Ésta, induce un incremento en el periodo de la respiración de un modo escalonado. C) Registro pletismográfico representativo de ratones que generaron suspiros (trazo superior) y la inhibición de éstos producida por la SST (trazo inferior). El bloqueo de la generación de estos suspiros se representa en la gráfica de la derecha, observado en 4 de 4 ratones que generaron suspiros. \* indica una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a los animales tratados con solución salina (vehículo).

Finalmente, en esta tesis se investigó el efecto de la SST sobre la generación de los boqueos *in vivo* y también sobre el proceso de autorresucitación, que se genera cuando se restablecen las condiciones de normoxia, después de un periodo hipóxico prolongado (Fig. 12; Fewell et al., 2000; Gozal et al., 2002). Para estudiar esto, los animales se sometieron a condiciones de asfixia, sustituyendo el aire normal con una mezcla de nitrógeno (95% N<sub>2</sub>; 5% CO<sub>2</sub>) durante aproximadamente tres minutos (Peña y Aguilera, 2007; Zavala–Tecuapetla et al., 2008). Después de esto se restablecieron las condiciones de aireación normal y se evaluó el proceso de autorresucitación (Peña y Aguilera, 2007; Zavala–Tecuapetla et al., 2008). La autorresucitación se consideró exitosa cuando los animales recuperaron, totalmente, la capacidad de respirar con normalidad. Como se muestra en la figura 23 A, la respuesta respiratoria a la hipoxia es bifásica y consiste de una aceleración inicial de la eupnea que se continúa por una depresión secundaria que dirige a la generación de los boqueos y eventualmente, a la apnea hipóxica (Peña y Aguilera, 2007; Peña et al., 2008; Zavala–Tecuapetla et al., 2008). En nuestros experimentos, se observó que, después de restablecer las condiciones de oxigenación normal, se induce el proceso de autorresucitación, a través de la generación de boqueos (Fig. 7B; Gozal et al., 2002; Peña y Aguilera, 2007; Zavala–Tecuapetla et al., 2008; Peña, 2009). Bajo estas condiciones, encontramos que, tanto la activación como el bloqueo del sistema somatostatínérgico, afectan la generación de los boqueos, reduciendo la frecuencia de estos (Fig. 23 B, gráfica de arriba). Por un lado, cuando se activa el sistema somatostatínérgico, mediante la aplicación de SST (N = 11) o del agonista de los SSTR2, el BIM23014C (N = 7), se reduce la frecuencia de la respiración a valores del  $35.82 \pm 7.44$  %, y del  $50.16 \pm 3.4$  % del control, respectivamente. Por otra parte, cuando se bloquea el sistema somatostatínérgico, con el antagonista inespecífico, CSST (N = 6), o con el antagonista específico de los SSTR2, CYN154806 (N = 6), se reduce la frecuencia de los boqueos a valores de  $40.93 \pm 8.16$  % y  $11.34 \pm 7.86$ % del control, respectivamente (Fig. 23 B, gráfica superior;  $p < 0.05$ ).

Por último, con respecto al proceso de autorresucitación, se encontró, de manera interesante, que al antagonizar específicamente los SSTR2 (aplicando CYN) se elimina completamente la capacidad de autorresucitar de los ratones (Fig. 23 B, gráfica inferior, N = 11,  $p < 0.0001$ ). Esta incapacidad de los ratones para autorresucitar se correlaciona con una disminución en la amplitud de los boqueos, al  $44.81 \pm 4.64 \%$ , del control (Fig. 23 B, gráfica de en medio). Contrario a esto, cuando se agonizan los SSTRs (con SST o con BIM23014C) o cuando se antagonizan, inespecíficamente con CSST, ni la amplitud de los boqueos ni el proceso de autorresucitación se ven afectados, de modo que los animales vuelven a respirar normalmente después de haber sido sometidos al periodo de asfixia (Fig. 23 B). Estos resultados sugieren que la generación de los boqueos es modulada *in vivo* y que la activación endógena de los SSTR2 es esencial para realizar el proceso de autorresucitación.



**Figura 23. La SST modula la generación de los boqueos y la autorresucitación de ratones neonatos.** A) Registros representativos de la respuesta respiratoria a la hipoxia en animales control (inyectados con solución salina) y en ratones inyectados con agonistas y antagonistas de los SSTRs. Nótese que la amplitud de los boqueos disminuye por la presencia del antagonista específico de los SSTR2, CYN. B) Cuantificación de la frecuencia y amplitud de los boqueos. También se muestra el porcentaje de autorresucitación de los ratones después ser sometidos a un periodo de asfixia. Note que, tanto la activación como el bloqueo de los receptores de la SST, reducen la frecuencia de los boqueos (gráfica superior). Sin embargo, solamente el bloqueo específico de los SSTR2 reduce la amplitud de los boqueos (gráfica de en medio) y esto se correlaciona con un proceso de autorresucitación fallido (gráfica inferior; CYN y CYN + SST). \* indica una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) respecto a los animales control (salina).

## DISCUSIÓN

En esta tesis se demostró que la SST modula directamente la actividad de las células que conforman al circuito generador del ritmo respiratorio, el preBötC, y que esta modulación es esencial para la generación adecuada de los diferentes patrones respiratorios generados *in vitro*, así como para la regulación de la respiración *in vivo*. Además, se demostró que la SST endógena del preBötC regula constitutivamente la generación del ritmo respiratorio, tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*. La SST ejerce sus acciones moduladoras a través de la activación específica de sus receptores tipo 2 lo que se asocia con la activación de distintos canales iónicos de K<sup>+</sup>, como la corriente M y los canales de potasio dependientes de calcio. La activación de estos canales de K<sup>+</sup> produce una reducción de la actividad eléctrica de las neuronas del preBötC y de la actividad sináptica de este circuito neuronal lo que conlleva a una reducción de la frecuencia y la irregularidad del ritmo respiratorio. Finalmente, bajo condiciones *in vivo*, se encontró que la regulación de la respiración por la SST es fundamental para la sobrevivencia de los animales, pues cuando se bloquean los receptores SSTR2 se reduce la generación de los boqueos y se evita el proceso de autorresucitación.

### **Efectos de la SST sobre la actividad del preBötC y la generación de la eupnea.**

La modulación somatostatínérgica de la respiración es un proceso complejo que involucra la regulación de componentes periféricos y centrales (e Silva y Lewis, 1995; Llona et al., 2004; Llona y Eugén, 2005; Kaczynska y Szereda-Przestaszewska, 2010). Se ha reportado que la inyección intravenosa de SST disminuye la tasa respiratoria y el volumen corriente y que esta regulación ocurre a diferentes niveles, tanto centrales como periféricos (Kalia et al., 1984; Yamamoto et al., 1988; Chen et al., 1990; Llona et al., 2004; Gray et al., 2010). De hecho, se sabe que la SST puede actuar a través de las vías aferentes de los cuerpos carotídeos, ya que las células de éstos presentan receptores a SST (Kaczynska y Szereda-Przestaszewska, 2010). Además, los pulmones de ratas presentan una alta expresión tanto del SSTR4 (Schloos et al., 1997; Fehlmann et al., 2000) como de la SST (Balaguer et al., 1992). Algunos autores sugieren que los efectos de la aplicación

sistémica de SST involucra solo efectos periféricos debido a que tiene un periodo de vida media muy corto (Banks et al., 1990) por lo que difícilmente podría alcanzar a ejercer un efecto a nivel central.

Por otra parte, también se ha reportado que la SST produce efectos sobre la respiración actuando a nivel del SNC (Kalia et al., 1984; Yamamoto et al., 1988; Chen et al., 1990; Llona et al., 2004; Gray et al., 2010). En estudios en los que se inyectó la SST en la cisterna magna de ratas anestesiadas, se observó que este péptido produce apneas, después de aproximadamente 5 a 7 min de haber sido aplicada (Kalia et al., 1984). En otros trabajos, se ha reportado que la aplicación local de SST sobre los núcleos *paragigangocellularis* y *reticularis* de la médula ventrolateral reduce la frecuencia respiratoria (Yamamoto et al., 1988; Chen et al., 1990). Además, esta aplicación de SST sobre estos núcleos puede producir episodios de apnea, tanto en ratas (Chen et al., 1990) como en gatos anestesiados (Yamamoto et al., 1988). En nuestro trabajo, también se aplicó SST intracisternalmente a ratones neonatos y se evaluaron los efectos de ésta sobre la respiración, tanto en condiciones de normoxia como de asfixia, y se observó que la SST deprime la frecuencia de los la eupnea y los boqueos (Figs. 22 y 23; Ramírez-Jarquín et al., 2012). Sin embargo, en nuestros experimentos no observamos que la aplicación intracisternal de somatostatina generara periodos de apneas. Estas diferencias entre nuestros resultados y los de otros trabajos, podrían tener distintas explicaciones. Por un lado, debido a las diferentes concentraciones de SST utilizadas en los estudios previos y el nuestro debido a que en este trabajo se administraron concentraciones menores a las reportadas previamente (Kalia et al., 1984; Yamamoto et al., 1988; Chen et al., 1990). Por otra parte, aquí se inyectó la SST a animales despiertos (Ramírez-Jarquín et al., 2012) mientras que en los demás trabajos se aplicó a animales anestesiados (Kalia et al., 1984; Yamamoto et al., 1988; Chen et al., 1990). Esto último podría favorecer la generación de apneas debido a que los anestésicos utilizados en esos estudios (Kalia et al., 1984; Yamamoto et al., 1988; Chen et al., 1990) producen un efecto depresor sobre la frecuencia respiratoria (Scherthaner et al., 2011). En lo que respecta a los efectos de la SST a nivel central, una de las principales contribuciones de nuestro estudio recae en haber demostrado, de manera farmacológica, que la SST inhibe la respiración a través de la activación de su receptor tipo 2 en el preBötC (Figs. 18 y 19). En esta tesis, se observó que la participación de estos receptores es fundamental para la generación de la respiración (Fig. 18) y, más aún, para que se produzca una generación adecuada del proceso de autorresucitación (Fig. 19) (Ramírez-Jarquín et al., 2012). Esto último, se determinó cuando se bloqueó específicamente a los

SSTR2 y observar que los animales expuestos a un periodo de asfixia no fueron capaces de producir un proceso de autorresucitación adecuado, por lo que no sobrevivieron después de la hipoxia (Fig. 19) (Ramírez-Jarquín et al., 2012).

Además de los estudios en donde se inyectó la SST en la cisterna magna (Kalia et al., 1984; Yamamoto et al., 1988; Chen et al., 1990), también existen algunos reportes en los que, mediante el uso de preparaciones *en bloc* (que contienen al tallo cerebral y la médula espinal), se ha demostrado que al aplicar localmente la SST, en forma de *bolus*, se disminuye tanto la amplitud como la frecuencia de la actividad respiratoria registrada en la cervical 4 (C4, que inerva al nervio frénico) y que estos efectos son dependientes de la concentración de SST utilizada (Llona et al., 2004). Por otra parte, utilizando la misma preparación, se reportó que la aplicación de SST en el líquido cefalorraquídeo, disminuye la frecuencia respiratoria, registrada también en la C4, de manera cuántica (Gray et al., 2010). Finalmente, en un estudio realizado por Pantaleo y cols., (2011) se reportó que la aplicación de SST sobre el preBötC de conejos modifica la frecuencia de la respiración (Pantaleo et al., 2011). Es ese trabajo, Pantaleo y cols., (2011) también sugieren que la SST endógena de este circuito neuronal puede modular la generación de la respiración (Pantaleo et al., 2011). Tomando en cuenta estos hallazgos, en esta tesis se propuso que la SST podría modular la generación del ritmo respiratorio a través de una acción directa sobre el preBötC de ratones (Gray et al., 2010; Pantaleo et al., 2011). Así, en este trabajo se proporcionan pruebas directas que apoyan esta propuesta al demostrar que la aplicación de SST y de CSST, disminuye e incrementa respectivamente, la generación de los diferentes ritmos respiratorios en rebanadas de tallo cerebral, que contienen al preBötC y a otros núcleos respiratorios (Figs. 15-17) (Ramírez-Jarquín et al., 2012). Además, aquí también se demuestra que la SST actúa directamente sobre las neuronas del preBötC, ya que la aplicación de ésta sobre preparaciones de "islas" del preBötC (Fig. 15) causa un efecto idéntico al observado en las rebanadas completas del tallo cerebral (Ramírez-Jarquín et al., 2012). Las islas del preBötC, que contienen casi exclusivamente a las neuronas del preBötC, eliminan la posible participación de otros núcleos neuronales en la modulación de la SST sobre la generación del ritmo respiratorio (Tryba et al., 2008; Ben-Mabrouk y Tryba, 2010) lo que nos permite sugerir que este péptido actúa directamente sobre el preBötC.

A pesar de que en nuestro trabajo se demuestra que SST ejerce sus efectos directamente sobre el preBötC, no se debe excluir el hecho de que este péptido también ejerce sus efectos a nivel sistémico, actuando sobre diferentes núcleos neuronales, o bien, sobre componentes periféricos (Lieske et al., 2000; Ptak et al., 2009). Por ejemplo, se ha reportado que la SST modula la respiración si se aplica localmente sobre el complejo Böttinger (CB), un núcleo neuronal adyacente al preBötC (Burke et al., 2010; Pantaleo et al., 2011). La aplicación de SST sobre el CB incrementa los periodos de la inspiración y, al mismo tiempo, reduce los periodos de la espiración, produciendo de este modo un patrón de apneusis (periodos inspiratorios prolongados; Burke et al., 2010). Además, la aplicación bilateral de SST sobre el CB produce una disminución de la frecuencia respiratoria (Pantaleo et al., 2011). Esta reducción de la frecuencia respiratoria, se acompañó de una disminución del tiempo de subida de la actividad del nervio frénico aunque su amplitud no se afectó (Pantaleo et al., 2011). Por otra parte, en diversos trabajos se ha reportado que la SST modifica la respiración actuando sobre diferentes grupos de motoneuronas respiratorias (Oomura y Mizuno, 1986; Breder et al., 1992; Señaris et al., 1995). Por ejemplo, las motoneuronas del núcleo dorsal del nervio vago se hiperpolarizan cuando se les aplica SST (Oomura y Mizuno, 1986). Aunado a esto, Señaris y cols., (1995) determinaron, mediante técnicas de hibridación *in situ*, que algunas motoneuronas de la espina dorsal y de otros núcleos del tallo cerebral expresan el SSTR3, lo que sugiere una regulación de la actividad motora mediada por la SST (Señaris et al., 1995). Estos efectos inhibidores de la SST sobre motoneuronas podrían explicar el por qué este péptido disminuye la amplitud de la señal de la salida inspiratoria, registrada en el nervio frénico (Llona et al., 2004), mientras que la amplitud del comando inspiratorio, generado directamente por el preBötC, no se ve afectada por la SST (Fig. 15; Ramírez-Jarquín, et al., 2012).

Finalmente, en un trabajo reciente, se demostró que la aplicación de SST, directamente sobre el preBötC de conejos, también modifica la generación de la eupnea (Pantaleo et al., 2011). Estos autores, además, sugirieron que la SST endógena de este núcleo puede modular su actividad (Pantaleo et al., 2011). En su trabajo Pantaleo y cols., (2011) reportaron que la aplicación de SST y de CSST sobre el preBötC, incrementa y reduce, respectivamente, la frecuencia del ritmo respiratorio (Pantaleo et al., 2011). Estos resultados, son contrarios a los observados en la mayoría de los trabajos anteriores en donde se ha reportado un efecto depresor de la SST sobre la respiración (Kalia et al., 1984; Yamamoto et al., 1988; Chen et al., 1990; Llona et al., 2004; Gray et

al., 2010), de la misma manera en que se observó en nuestra investigación (Figs. 15 y 22) (Ramírez-Jarquín et al., 2012).

### **Efectos de la SST sobre el preBötC y la generación de los suspiros.**

Bajo condiciones de oxigenación normal, el preBötC genera un segundo ritmo respiratorio. A este ritmo, se le denomina suspiro (Lieske et al., 2000). En este trabajo, se observó que la SST también modula la generación de los suspiros. Este péptido evita completamente la generación de los suspiros, tanto en condiciones *in vitro* (Fig. 16) como *in vivo* (Fig. 22) (Ramírez-Jarquín et al., 2012). Sin embargo, este hallazgo, se debe interpretar con cautela y no asumir que los suspiros son exclusivamente inhibidos por la SST. Es importante tomar en cuenta que los mecanismos del preBötC involucrados en la generación de los suspiros son altamente sensibles a una reducción en la excitabilidad neuronal (Peña y Ramirez, 2002; Telgkamp et al., 2002; Peña et al., 2004; Lieske y Ramirez, 2006; Zavala-Tecuapetla et al., 2008). En diversos estudios se ha reportado que varias condiciones experimentales, que reducen la excitabilidad del preBötC, evitan la generación de los suspiros sin afectar la generación de la eupnea (Peña y Ramirez, 2002; Peña et al., 2004; Telgkamp et al., 2002; Lieske y Ramirez, 2006; Zavala-Tecuapetla et al., 2008). Estas condiciones experimentales, incluyen el bloqueo de los receptores de serotonina (5-HT), específicamente los receptores tipo 2A (5-HT<sub>2A</sub>; Peña y Ramirez, 2002), el bloqueo de la corriente persistente de Na<sup>+</sup> (Peña et al., 2004), el bloqueo de la corriente catiónica activada por Ca<sup>2+</sup> (Peña et al., 2004), el bloqueo de los receptores a sustancia P (Telgkamp et al., 2002), el bloqueo de los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo P/Q (Lieske y Ramirez, 2006), la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato (Lieske y Ramirez, 2006) y también la activación de corrientes de K<sup>+</sup> dependientes de Ca<sup>2+</sup>, específicamente las corrientes de baja conductancia (SK; Zavala-Tecuapetla et al., 2008). Por lo tanto, la inhibición de los suspiros producida por la SST que se observó en este trabajo no implica que este ritmo sea exclusivamente dependiente de la SST. Debido a esto, sería de gran interés determinar los mecanismos específicos por los que se generan los suspiros y estudiar la modulación de éstos por los diferentes neurotransmisores y neuromoduladores con la intención de comprender el papel de cada uno de éstos en la reconfiguración del preBötC necesaria para generar los diferentes ritmos respiratorios.



## **Efectos de la SST sobre el preBötC y la generación de los boqueos.**

Por otra parte, cuando el preBötC se encuentra en condiciones hipóxicas sufre un proceso de reconfiguración y esto conlleva a la generación de un tercer ritmo respiratorio, los boqueos (Lieske et al., 2000). En la figura 16 de esta tesis, se muestra que, en condiciones *in vitro*, la SST también modula el proceso de reconfiguración del preBötC, que se produce bajo condiciones hipóxicas. Todavía más, en experimentos realizados *in vivo* (Fig.23) se observó que la regulación somatostatinérgica es fundamental para llevar a cabo un proceso adecuado de autorresucitación en los animales tratados con condiciones de asfixia. Nuestros resultados *in vitro* indican que tanto la activación como el bloqueo de los SSTRs modifican la reconfiguración del preBötC, disminuyendo o incrementando, respectivamente, la frecuencia de los boqueos (Fig. 16). En estudios previos se ha observado que la SST, aplicada a nivel sistémico, mediante una inyección intravenosa, modula la respuesta respiratoria en condiciones hipóxicas (Härfstrand et al., 1984; Maxwell et al., 1986; Filuk et al., 1988; Chen et al., 1990). Este efecto depresor de la SST sobre la respiración, se ha observado tanto en ratas anestesiadas (Härfstrand et al., 1984; Chen et al., 1990), como en humanos (Maxwell et al., 1986; Filuk et al., 1988). A pesar de que todos estos estudios muestran que la SST modula la actividad respiratoria en condiciones de hipoxia, tanto *in vitro* como *in vivo*, hasta la fecha, no se había determinado el sitio específico de acción de la SST, lo que deja abierta la pregunta de si ésta podría actuar a nivel de SNC directamente sobre el circuito generador del ritmo respiratorio, el preBötC. De aquí, la importancia de nuestro estudio, ya que en éste se muestra evidencia de que la modulación somatostatinérgica del ritmo respiratorio también sucede a nivel del SNC e involucra una acción directa sobre las neuronas del preBötC (Fig. 15). Además, como mencionamos antes, también se demuestra que la SST participa en la reconfiguración que el preBötC realiza cuando se encuentra en condiciones de hipoxia (Fig. 17). Hasta donde sabemos, esta tesis es uno de los primeros reportes en donde se demuestra que la SST puede modular la generación de los boqueos actuando directamente sobre el preBötC. A pesar de esto, como ya hemos comentado, no es posible descartar la participación de la modulación por SST de otros posibles sitios de acción, ya sea a niveles centrales, como el núcleo paragigantocelular, el núcleo hipoglósico, e incluso el complejo Bötzinger (Härfstrand et al., 1984; Kalia et al., 1984; Härfstrand et al. 1985; Yamamoto et al., 1988; Llona et al., 2004; Gray et al., 2010; Pantaleo et al., 2011); o bien, a niveles periféricos, como los cuerpos carotídeos en los que se ha reportado la presencia de SST (Kameda, 1989; Kummer et al.,

1989) y en donde se ha observado que éste péptido puede deprimir la actividad respiratoria actuando sobre estos (Kaczynska y Szereda-Przestaszewska, 2010).

Cuando se evaluó la participación de la SST sobre la regulación de la respiración *in vivo* (Fig. 23), se determinó que el bloqueo específico de los SSTR2 reduce la amplitud de los boqueos y que, además, esto se conjunta con una inhibición del proceso de autorresucitación en el 100% de los casos analizados (Fig. 23; Ramírez–Jarquín et al., 2012). Estos hallazgos sugieren que la modulación somatostatinérgica de la respiración es mediada a través de los SSTR2 y que es indispensable para la generación normal de los boqueos *in vivo*, y que además es fundamental para producir un proceso de autorresucitación exitoso en ratones neonatos (Fig. 23) (Ramírez–Jarquín et al., 2012). A pesar de la importancia de los SSTR2 en la regulación de la respiración, demostrada en este trabajo, es importante mencionar que actualmente existen ratones *knock-out* tanto para la SST (Zeyda et al., 2001; Cammalleri et al., 2006) como para sus receptores, específicamente los SSTR2 (Zheng et al., 1997; Dutar et al., 2002) y que todos estos animales, aunque no expresan el SSTR2, presentan un fenotipo normal y no tienen alteraciones en la generación de la respiración bajo condiciones de oxigenación normal (Zheng et al., 1997; Zeyda et al., 2001; Dutar et al., 2002; Cammalleri et al., 2006). Sin embargo, es importante mencionar que esta ausencia de anomalías en la generación de la respiración de estos animales *knock-out*, posiblemente se deba a cambios compensatorios, como ya se ha reportado previamente en otros ratones *knock-out* para receptores de moduladores, como la sustancia P (Herpfer et al., 2005) o para el neuromodulador, como por ejemplo el neuropéptido Y (Higuchi et al., 2008). Hasta donde tenemos conocimiento, no existen estudios aún que evalúen el efecto de las condiciones hipóxicas sobre la respiración, o incluso sobre el proceso de autorresucitación, de estos ratones *knock-out* del SSTR2. Con base a esto se propone que sería de gran importancia retar a estos animales con condiciones de estrés respiratorio, es decir, condiciones hipóxicas o hipercápnicas, con el objetivo de explorar la generación y/o modulación del ritmo respiratorio, bajo estas condiciones y determinar si estos ratones son capaces de generar, de manera normal, los boqueos y consecuentemente el proceso de autorresucitación (Fig. 23), o bien, identificar los posibles mecanismos compensatorios inducidos por la ausencia de SST y del SSTR2. Además, sería de gran importancia realizar estudios *in vitro* sobre la modulación somatostatinérgica en rebanadas de tallo cerebral de los ratones *knock-out* para SST

y para SSTR2, para evaluar la respuesta del preBötC de éstos, ante diferentes condiciones de oxigenación y determinar las similitudes y diferencias con lo observado en nuestro trabajo.

A partir de los resultados de nuestro trabajo se determinó que, como sucede para otros neuromoduladores como la adenosina, la sustancia P y la serotonina (Mironov et al., 1999; Peña y Ramirez, 2002; Telgkamp et al., 2002), la SST endógena ejerce un efecto constitutivo sobre la generación de los ritmos respiratorios (Fig. 17; Ramírez–Jarquín et al., 2012). En relación a esto, sugerimos que este péptido podría actuar como un estabilizador a la baja de la actividad del preBötC. Una diferencia importante entre la SST y los otros neuromoduladores que también ejercen un efecto basal sobre el ritmo respiratorio es que la primera se produce por neuronas localizadas dentro del mismo preBötC por lo que se sugiere que ésta puede actuar de manera autócrina (Figs. 15 y 17; Ramírez–Jarquín et al., 2012). Esto último, se demostró en nuestro estudio al aislar completamente al preBötC en preparaciones de islas de este núcleo y, observar bajo estas condiciones que la activación (Fig. 15) y la inhibición (Fig. 17) del sistema somatostatinérgico, decrementa e incrementa, respectivamente, la frecuencia del ritmo respiratorio (Ramírez–Jarquín et al., 2012). Además, en esta tesis se demostró que el decremento de la frecuencia respiratoria, provocado por la SST, se correlaciona con un incremento de la regularidad del ritmo respiratorio (Fig. 15; Ramírez–Jarquín et al., 2012), lo que nos permite sugerir que la SST es de gran importancia para modular tanto la generación como la regularidad del ritmo respiratorio. A partir de esto se sugiere que la modulación somatostatinérgica podría constituir un mecanismo protector para la generación de la respiración. Por ejemplo, cuando el preBötC se encuentre en condiciones que podrían sobreexcitar los componentes neuronales de este circuito neuronal, la SST se podría coliberar con el glutamato y de este modo evitar un estado de sobreexcitación del circuito producido por el glutamato liberado de las neuronas del mismo. En conjunto, estas observaciones dejan abierta la posibilidad de investigar las diferentes condiciones de sobreexcitabilidad en las que la SST podría participar como un estabilizador del ritmo respiratorio y de este modo ayudar al mantenimiento de éste, tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia.

## **La SST ejerce sus efectos a través de la activación específica de los SSTR2.**

Una contribución más de nuestro trabajo, es haber demostrado que la modulación somatostatinérgica de la actividad del preBötC se produce a través de la activación específica de los SSTR2 (Figs. 18 y 19). La participación de estos receptores se confirmó al observar que cuando se aplica un agonista (BIM23014C), o bien un antagonista (Cianamida 154806), específicos de éstos, se disminuye o se incrementa, respectivamente, la frecuencia del ritmo respiratorio, tanto *in vitro* (Figs. 18 y 19) como *in vivo* (Figs. 21 y 22). Estos resultados son consistentes con los reportados previamente en la bibliografía, ya que el SSTR2 es el tipo de receptor para SST, más abundante en el SNC de murinos (Videau et al., 2003). Aunado a esto, en un estudio realizado por Gray y cols. (2010) se reportó, mediante el uso de técnicas de inmunocitoquímica, que las neuronas del preBötC de ratones expresan el receptor tipo 2 de la SST (Gray et al., 2010). Los resultados obtenidos en nuestra investigación corroboran de manera farmacológica (Figs. 18 y 19) y funcional (Figs. 22 y 23; Ramírez–Jarquín et al., 2012), los hallazgos reportados por Gray y cols., (2010), demostrando que la SST se une a sus SSTR2 en las células del preBötC. Es importante mencionar que en nuestro trabajo se utilizó la técnica semi-cuantitativa de la PCR en tiempo real, con la intención de determinar los diferentes niveles de expresión de los SSTRs y se observó que la cantidad de ARNm del SSTR3 es prácticamente la misma que la cantidad del ARNm del SSTR2 en el preBötC (Fig. 18). Sin embargo, nuestros resultados indican que el SSTR3 no parece participar en la regulación somatostatinérgica de la generación del ritmo respiratorio, tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* (Fig. 18; Ramírez–Jarquín et al., 2012) debido a que la aplicación de un antagonista específico de los SSTR3 no modificó la actividad del preBötC y tampoco inhibió la reducción, producida por la SST, de la frecuencia y la irregularidad del ritmo (Fig. 18) (Ramírez–Jarquín et al., 2012). Respecto a esto, es importante recalcar que los niveles de expresión del ARNm no siempre coinciden con la cantidad de proteína expresada (Pisarek et al., 2011). Recientemente, en un estudio realizado por Pisarek y cols., (2011), en adenomas adrenocorticales, se reportó que los niveles de ARNm y los niveles de proteína para el SSTR2 presentan una correlación del 100 % (Pisarek et al., 2011). Sin embargo, en el mismo estudio se reportó que para el caso de los SSTR3 solamente había un 37.5 % de correlación entre los niveles de su ARNm y los niveles de expresión de su proteína (Pisarek et al., 2011). El reporte de Pisarek y cols., (2011) junto con los resultados obtenidos de esta tesis demuestran una vez más, que la detección del ARNm mediante técnicas de PCR no es suficiente

prueba experimental para determinar la expresión proteica, de modo que es necesario realizar estudios con técnicas complementarias para confirmar la expresión de proteínas y así determinar la correlación entre los niveles de ARNm y de proteína. En este estudio no se evaluó la cantidad de proteína de los diferentes SSTRs, sin embargo, es importante recalcar que aquí se presenta la primera demostración farmacológica de que la SST actúa directamente sobre las neuronas del preBötC y que ésta ejerce sus efectos a través de la activación de los SSTR2 (Figs. 18, 19, 22 y 23), como se había sugerido previamente por hallazgos inmunohistoquímicos (Gray et al., 2010). Esta activación tiene como consecuencia la modulación de la generación de los diferentes ritmos respiratorios producidos por el preBötC, bajo diferentes condiciones de oxigenación (Ramírez-Jarquín et al., 2012). Aunque en nuestro trabajo se revela que los SSTR2 son de gran importancia para la generación de la respiración, se debe de tomar en cuenta que el ARNm del preBötC se extrajo del tejido total de este circuito neuronal. En consecuencia, nuestros resultados no permiten identificar si la expresión de los SSTRs se presenta en algún tipo neuronal específico del preBötC (expiratorias, inspiratorias no-marcapaso, o inspiratorias marcapaso). Tomando en consideración esto, se propone que se podría realizar una caracterización de los diferentes receptores de SST presentes en los tipos neuronales del preBötC, lo que se podría realizar mediante experimentos de qPCR de célula única.

### **La modulación del preBötC producida por la SST se asocia con la activación de diferentes corrientes de potasio.**

En esta tesis también se estudió el efecto de la SST a nivel unicelular y se demostró que la modulación somatostatinérgica de la generación del ritmo respiratorio es mediada por una disminución de la actividad neuronal (Fig. 21) y de la actividad sináptica del preBötC, tanto a niveles presinápticos como postsinápticos (Fig. 21). A partir de nuestros registros electrofisiológicos se muestra que la SST hiperpolariza el potencial de membrana en reposo de las neuronas respiratorias y que este efecto se acompañó de una reducción en la frecuencia de disparo de las mismas (Fig. 21 A). Sin embargo, solamente el 81 % de las neuronas registradas respondieron de esta manera a la aplicación de la SST. El resto de las neuronas registradas no modificaron su actividad eléctrica en presencia de este péptido. Es importante mencionar que esta heterogeneidad en la respuesta de las

neuronas, a la aplicación de somatostatina, también ha sido reportada en otros núcleos neuronales como la sustancia gelatinosa (Kim et al., 2002), el núcleo tálamo-reticular (Sun et al., 2002) y en el septo medial (Bassant et al., 2005; Yin et al., 2009). La ausencia de respuesta, por parte de las neuronas del preBötC, a la aplicación de la SST, se podría explicar por diferentes causas. Una posibilidad es que, a pesar de que las neuronas del preBötC expresan el SSTR2 (Gray et al., 2010; Ramírez-Jarquín et al., 2012), como se mencionó previamente, se desconoce si la totalidad de las neuronas de este circuito neuronal expresan SSTRs, por lo que existe la posibilidad de que algunas de las células del preBötC no expresen receptores para SST y, por lo tanto, éstas no presenten respuesta a la aplicación de la SST. Otra posibilidad para explicar la ausencia de respuesta neuronal a la SST, podría ser que ésta no se difunda bien a través de toda la preparación, que tiene un grosor total de 700  $\mu\text{m}$  y, por lo tanto no alcance una célula blanco en donde actuar.

Por otra parte, los efectos de la SST, observados aquí, sobre el potencial de membrana y la disminución de la frecuencia de disparo también se han reportado antes en células de la sustancia gelatinosa (Kim et al., 2002), neuronas del estriado (Galarraga et al., 2007), neuronas del septo medial (Bassant et al., 2005), neuronas del núcleo tálamo reticular (Sun et al., 2002) y en neuronas de la amígdala lateral (Meis et al., 2005). En todos estos estudios, se determinó que la SST reduce la actividad celular a través de la activación de diferentes corrientes de potasio que están involucradas en el mantenimiento del potencial de membrana, como son la corriente M, la corriente de fuga de potasio y las corrientes de potasio dependientes de calcio (Moore et al., 1988; Watson y Pittman, 1988; Schweitzer et al., 1990; Duerson et al., 1996; Schweitzer et al., 1998; Vilchis et al., 2002; Galarraga et al., 2007). Como mencionamos previamente, la disminución de la actividad eléctrica neuronal, producida por la SST, se debe a que ésta puede bloquear corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (Golard et al., 1993; Golard y Siegelbaum, 1993; Shapiro y Hille, 1993; Patel et al., 1994; Shapiro et al., 1994; Viana y Hille, 1996; Boehm y Betz, 1997; Grant et al., 2004b; Lahlou et al., 2004; Viollet et al., 2008; Kumar y Grant 2010;), o bien, activar corrientes de  $\text{K}^+$  (Mihara et al., 1987; Moore et al., 1988; Watson y Pittman, 1988; de Weille et al., 1989; Wang et al., 1989; Schweitzer et al., 1990; Raynor et al., 1991; Karschin et al., 1994; Karschin, 1995; Duerson et al., 1996; Schweitzer et al., 1998; Akopian et al., 2000; Kim et al., 2002; Vilchis et al., 2002; Meis et al., 2005; Galarraga et al., 2007). En este trabajo, se determinó que la SST no modifica las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L de las neuronas del preBötC (Fig. 20). Sin embargo, se observó que este péptido podría disminuir la

actividad neuronal del preBötC a través de la activación de dos diferentes corrientes iónicas de potasio, como son la corriente M ( $I_M$ ) y las corrientes dependientes de calcio ( $IK_{Ca}$ ). La activación de estos canales iónicos por la SST se ha reportado en neuronas piramidales del hipocampo donde se observó que se activa  $I_M$  ante la aplicación de SST exógena y, en consecuencia, el potencial de membrana en reposo se hiperpolariza y la frecuencia de disparo de estas células se reduce (Moore et al., 1988; Watson y Pittman, 1988; Schweitzer et al., 1990; Tallent y Siggins, 1997; Schweitzer et al., 1998; Qiu et al., 2008). Por otra parte, la activación de corrientes de potasio dependientes de calcio, producida por la SST, también se ha observado en diferentes tipos celulares (White et al., 1991; Duerson et al., 1996; Galarraga et al., 2007; Perry y Sandle, 2009). En un estudio realizado en células tumorales de la pituitaria de mamíferos se observó que la SST activa específicamente los canales BK (White et al., 1991; Duerson et al., 1996). Otro tipo celular en que también se reportó la activación de canales BK es en las neuronas espinosas del estriado (Galarraga et al., 2007). Por otra parte, también las células de colon responden activando canales BK ante la aplicación de SST (Perry y Sandle, 2009). En este trabajo se muestra que la regulación de la SST sobre el preBötC se relaciona con la activación de la  $I_M$  y los canales  $IK_{Ca}$  (Fig. 20). Además, aquí también se muestra de manera farmacológica, que la SST podría activar estos canales a través de su unión con el SSTR2 dentro del circuito generador del ritmo respiratorio (Ramírez-Jarquín et al., 2012), como se ha observado previamente en otros núcleos neuronales como la sustancia gelatinosa y el núcleo reticular del tálamo (Sun et al., 2002; Bassant et al., 2005; Yin et al., 2009).

La activación de la  $I_M$  y de las corrientes de potasio dependientes de calcio reduce la excitabilidad neuronal (Storm, 1990; Marrion, 1997; Hossy et al., 2011). La  $I_M$  es una corriente persistente de potasio que atenúa las entradas excitadoras y reduce la frecuencia de disparo neuronal en presencia de un proceso de despolarización constante (Storm, 1990; Marrion, 1997). Por otra parte, los canales de potasio dependientes de calcio participan en la repolarización del potencial de membrana, después de producirse un potencial de acción (Edgerton y Reinhart, 2003). Los canales de potasio dependientes de calcio, de alta conductancia, los BK, están involucrados en la repolarización del potencial de membrana después de potenciales de acción individuales y los canales de potasio dependientes de calcio de baja conductancia o SK, son responsables en parte de la repolarización del potencial de membrana en respuesta a potenciales de acción disparados de manera repetitiva (Edgerton y Reinhart, 2003; Hossy et al., 2011). Los resultados obtenidos en

nuestro estudio sugieren que la aplicación de SST exógena podría activar las corrientes  $I_M$ , BK y SK (Fig. 20) de las células del preBötC lo que modula la excitabilidad de este circuito neuronal y, como consecuencia, la generación de los distintos ritmos respiratorios. Sin embargo, estos resultados se deben interpretar cuidadosamente, debido a que nuestros experimentos en que se utilizaron los diferentes bloqueadores de canales iónicos, fueron registros electrofisiológicos multiunitarios, por lo que se registró la actividad poblacional de este circuito neuronal. Debido a esto, no es posible determinar específicamente qué tipos neuronales del preBötC son los que modifican su actividad eléctrica en presencia de la SST por lo que queda abierta la posibilidad de que la activación de algún canal de potasio por SST podría correlacionar con algún tipo neuronal específico del preBötC. De aquí, que sería de gran interés realizar registros electrofisiológicos unicelulares en el preBötC, mediante el uso de la técnica del “patch-clamp” para determinar si, mediante el uso de bloqueadores de las corrientes  $I_M$ , BK y SK, se previene la disminución de la actividad celular producida por la SST. Además, esto permitiría caracterizar la participación de los diferentes tipos neuronales del preBötC en la modulación somatostatinérgica.

Por otra parte, la  $I_M$  se denomina así porque su activación depende de receptores colinérgicos, específicamente aquellos que son agonizados por la muscarina. Es posible que la activación de la  $I_M$  por la aplicación de SST en el preBötC observada en este trabajo (Fig. 20) no sea directamente mediada por la SST sino a través de un efecto indirecto mediado por acetilcolina. Esto se sugiere debido a que se ha reportado que la SST induce la liberación de acetilcolina en neuronas del estriado (Rakovska et al., 2003), del giro dentado (Nakata et al., 1996), de la corteza e hipocampo (Mancillas et al., 1986; Matsuoka et al., 1991). Esta acetilcolina liberada podría unirse a sus receptores muscarínicos del tipo M3 que se sabe están en las neuronas del preBötC (Shao y Feldman, 2000; 2005) y con esto se podría activar la  $I_M$ . Por otra parte, en neuronas del hipocampo se ha reportado que la SST también puede incrementar la activación de receptores NMDA (Pittaluga et al., 2000) con lo que se incrementarían las concentraciones intracelulares de  $Ca^{2+}$  de las neuronas del preBötC y esto podría contribuir a la activación de los canales BK y SK.



## La SST deprime la transmisión sináptica del preBötC.

Se ha reportado que la SST, además de modificar las propiedades intrínsecas de las neuronas, también ejerce acciones como neuromodulador sobre la actividad sináptica de diferentes redes neuronales (Vezzani y Hoyer, 1999; Baraban y Tallent, 2004; Tallent y Qiu, 2008; Viollet et al., 2008). La disminución de la actividad sináptica por la SST, se ha estudiado en diferentes zonas del SNC como la amígdala, la corteza, el estriado y el hipotálamo (Baraban y Tallent, 2004; Vezzani y Hoyer, 1999; Tallent y Qiu, 2008; Viollet et al., 2008). En estos circuitos neuronales, tanto el GABA como la SST, se coliberan por las neuronas y esto sirve para reducir la actividad neuronal, por lo que estos moduladores son de gran importancia para prevenir la hiperexcitabilidad de las células de estos circuitos (Vezzani y Hoyer, 1999; Baraban y Tallent, 2004; Tallent y Qiu, 2008). Sin embargo, este escenario es totalmente diferente en el preBötC en donde se reportó que la SST se libera por neuronas glutamatérgicas del mismo núcleo (Stornetta et al., 2003). Por otra parte, los experimentos realizados en esta tesis muestran que la SST modula constitutivamente la actividad del preBötC (Fig. 17), lo que se observó recientemente en un estudio realizado en conejos en condiciones *in vivo* (Pantaleo et al., 2011). Además, se sabe que las vesículas que contienen SST se liberan ante estimulaciones de alta frecuencia (Vezzani y Hoyer, 1999). Conociendo esto, se sugiere que la SST, como modulador del preBötC, podría tener un efecto opuesto al producido por el cotransmisor (glutamato) y que, de este modo, las neuronas respiratorias excitadoras liberarían SST para evitar una sobreexcitación de ésta red neuronal con el objetivo de mantener una generación adecuada del ritmo respiratorio. Ésta hipótesis se puede robustecer por otras observaciones: por un lado, se reportó que los ratones *knock-out* para SST son propensos a una hiperexcitación neuronal (Buckmaster et al., 2002); y, por otra parte, se observó que ratones *knock-out* para el SSTR2 presentan una respuesta glutamatérgica (AMPA y NMDA) exacerbada (Dutar et al., 2002). En nuestra investigación se encontró que cuando se bloquea la participación de la SST endógena del preBötC el ritmo respiratorio incrementa su frecuencia y su irregularidad (Fig. 17), lo que recalca la importancia fundamental de la SST (Fig. 17) y también de los SSTR2 (Fig. 18) para modular la generación del ritmo respiratorio.

En esta tesis también se encontró que la SST reduce la actividad sináptica del circuito generador del ritmo respiratorio (Fig. 21 B). Este efecto depresor, se observó como una disminución

en la generación de los potenciales sinápticos espontáneos de las neuronas respiratorias (Fig. 21B). En presencia de la SST, tanto la frecuencia como la amplitud de los potenciales sinápticos espontáneos se disminuyeron. Estos datos sugieren que la SST afecta de forma presináptica y postsináptica la actividad del preBötC, lo que también se ha reportado previamente en otros núcleos neuronales (Boehm y Betz, 1997; Tallent y Siggins, 1997; Leresche et al., 2000; Sun et al., 2002; Vilchis et al., 2002; Grilli et al., 2004; Cammalleri et al., 2006; Momiyama y Zaborszky, 2006; López-Huerta et al., 2008; Balleza-Tapia et al., 2010; Peña et al., 2010). Algunos núcleos neuronales en donde se ha observado una reducción de la actividad presináptica, producida por la SST, incluyen al núcleo tálamo reticular (Leresche et al., 2000; Sun et al., 2002), el estriado (López-Huerta et al., 2008; 2012), el hipocampo (Boehm y Betz, 1997; Tallent y Siggins, 1997), la corteza cerebral (Grilli et al., 2004) y el cerebro anterior (Momiyama y Zaborszky, 2006). Por otra parte, el efecto inhibitorio post-sináptico de la SST se ha reportado en células del estriado (Vilchis et al., 2002), del hipocampo (Cammalleri et al., 2006) y del cerebro anterior (Momiyama y Zaborszky, 2006). Además, se sabe que la SST deprime tanto la transmisión sináptica excitadora como la inhibitoria y que este efecto se puede producir a través de la activación de autorreceptores SSTR2 (Grilli et al., 2004). Esto mismo podría suceder en el preBötC ya que en este trabajo se observó que la SST no modula la actividad del circuito generador del ritmo respiratorio cuando se bloquean los SSTR2 (Figs. 18 y 19) (Ramírez-Jarquín et al., 2012). En nuestros experimentos no se aislaron farmacológicamente los diferentes tipos de transmisión sináptica por lo que sería de gran interés caracterizar el efecto de la SST sobre la transmisión sináptica y determinar si este péptido ejerce sus acciones sobre la transmisión excitadora, inhibitoria o sobre ambas. Ante este panorama una posibilidad es que la SST inhiba la transmisión excitadora ya que, como se mencionó previamente, las células del preBötC producen la SST y son glutamatérgicas, por lo que es posible que la SST reduzca la transmisión glutamatérgica, de manera postsináptica en el preBötC, ya que se ha reportado que el SSTR2 es altamente expresado en las post.sinapsis de diversos circuitos neuronales (Piwko et al., 1996; Schulz et al., 2000; Ramirez et al., 2002; Galarraga et al., 2007). Por otra parte, la SST también podría inhibir la transmisión sináptica de manera presináptica, mediante la activación de autorreceptores del tipo 2 de SST ya que se ha reportado que los autorreceptores SSTR2 se encuentran presentes en las presinapsis de terminales nerviosas de la corteza cerebral (Grilli et al., 2004).

## **Relación entre la somatostatina y el síndrome de muerte súbita del lactante.**

Dentro de los problemas de salud relacionados con el proceso de la respiración, el síndrome de muerte súbita del lactante (SMSL) también conocido como muerte de cuna o muerte blanca es una de las causas más comunes de muerte infantil entre la primera semana de nacido y el año de edad (Martínez et al., 2007). Los niños que sufren de este síndrome mueren inesperadamente mientras están dormidos sin una causa aparente (Martínez et al., 2007).

En nuestro país, en el periodo comprendido entre 1998 y 2002, se reportó un promedio anual de 245 muertes a causa del SMSL con una tasa de 0.09/1000 nacidos vivos (Martínez et al., 2007). La causa de este síndrome se desconoce, aunque en algunos estudios se sugiere que la apnea que conlleva al SMSL podría originarse por dormir boca abajo (Martínez et al., 2007), por una maduración tardía del tallo cerebral (Takashima et al., 1994), por un alto índice de apoptosis en el cerebro (Waters et al., 1999), e incluso por un fallo del sistema serotoninérgico, a nivel del tallo cerebral (Peña y Ramirez, 2002; Weese-Mayer et al., 2003a; Weese-Mayer et al., 2003b; Paterson et al., 2006; Tryba et al., 2006). Sin embargo, como ya se mencionó, parece ser que el factor de riesgo primordial para el SMSL se asocia con fallas en la generación de los boqueos y por lo tanto en el proceso de autorresucitación (Poets et al., 1999; Sridhar et al., 2003; Peña y García, 2006). Esto, debido a que los boqueos son esenciales para realizar el proceso de autorresucitación que se genera después de un periodo prolongado de hipoxia (Peña y Ramirez, 2005; Peña y Aguilera, 2007; Ramirez et al., 2007). Por lo tanto, es de gran importancia estudiar los mecanismos involucrados en la generación de este ritmo respiratorio, con la finalidad de desarrollar o proponer estrategias que ayuden a generar y mantener la actividad respiratoria bajo condiciones hipóxicas y, de este modo, evitar la apnea hipóxica que conlleva a la muerte de los infantes.

Por otra parte, se ha reportado que la SST también podría tener relevancia en la generación del SMSL. En algunos estudios *post-mortem*, realizados en infantes que fallecieron por el SMSL, se ha sugerido que, algunas modificaciones del sistema somatostatinérgico están asociadas con este síndrome (Takashima et al., 1994; Carpentier et al., 1998; Lavezzi y Maturri, 2008; Lavezzi et al., 2010). En uno de estos estudios, se demostró que los niños que murieron por el SMSL presentan mayores niveles de SST en el núcleo hipogloso (uno de los núcleos neuronales involucrados con la respiración), en comparación con niños que no murieron por esta causa (Lavezzi et al., 2010).

Además del incremento en los niveles de la SST en niños que perecieron por éste síndrome, también se ha reportado un número mayor de sitios de unión de ésta a lo largo del tallo cerebral (Carpentier et al., 1998). Las fallas del sistema somatostatinérgico asociadas al SMSL, se podrían deber a problemas relacionados con la maduración del tallo cerebral ya que se ha reportado que las neuronas respiratorias, localizadas en el tallo cerebral, deben de presentar ciertos cambios entre el periodo prenatal y el periodo postnatal para alcanzar un desarrollo adecuado de esta zona del SNC (Takashima et al., 1994). Estos problemas de maduración del tallo cerebral, también podrían afectar directamente al circuito generador del ritmo respiratorio, el preBötC, ya que se ha observado que existe una reducción en los niveles de expresión de la SST en las células del preBötC de en niños que murieron por el SMSL (Lavezzi y Maturri, 2008). En resumen, alteraciones del tallo cerebral que resulten en un incremento del sistema somatostatinérgico, ya sea incrementando los niveles de SST, o bien de sus receptores, podrían evitar la capacidad para generar los boqueos y, en consecuencia, inhibir el proceso de autorresucitación de neonatos. Los datos obtenidos en nuestro estudio, podrían tener una relevancia clínica debido a que se observó que la SST modula la generación del ritmo respiratorio tanto en condiciones de normoxia (Fig. 15) como de hipoxia (Fig. 16) en condiciones *in vitro* (Ramírez-Jarquín et al., 2012). Más aún, bajo condiciones *in vivo*, la aplicación intracisternal de SST también modifica la generación de la respiración disminuyendo su frecuencia (Figs. 22 y 23) (Ramírez-Jarquín et al., 2012). Como se mencionó, algunos de los problemas del sistema somatostatinérgico en el tallo cerebral se han encontrado presentes en el preBötC de infantes que murieron por el SMSL (Carpentier et al., 1998, Carpentier et al., 1999; Lavezzi y Maturri, 2008; Chigr et al., 1992; Lavezzi et al., 2004a; Lavezzi et al., 2004b). Sin embargo, hasta el momento, no se ha realizado una caracterización de qué tipos de receptores podrían ser los responsables de la regulación somatostatinérgica de la respiración. Aquí se generó una primera aproximación de esto y se sugiere que los receptores tipo 2 de somatostatina son esenciales para generar adecuadamente la respiración en condiciones de normoxia y de hipoxia. Además, la participación de los SSTR2 es fundamental para realizar el proceso de autorresucitación ya que cuando se bloquean se produce una incapacidad en los animales para autorresucitar (Fig. 23; Ramírez-Jarquín et al., 2012). Sin embargo, es importante recordar que existen algunos ratones *knock-out* para este tipo de receptor en particular (Zheng et al., 1997; Dutar et al., 2002) y que, hasta donde sabemos, no se han realizado estudios sobre estos animales expuestos a condiciones hipóxicas para evaluar el proceso de la autorresucitación. De aquí, que sería importante determinar las respuestas del preBötC de

estos ratones *knock-out* a distintas condiciones de oxigenación, tanto *in vitro* como *in vivo*, con la intención de verificar si el SSTR2 es esencial para la generación del proceso de autorresucitación, como se sugiere en nuestro trabajo (Fig. 23; Ramírez–Jarquín et al., 2012).

Finalmente, en este trabajo se encontró que la SST reduce la frecuencia respiratoria, lo que se observa como un aumento en los periodos de los ciclos respiratorios (Fig. 22). Además, se observó que este efecto, se presenta de una manera “escalonada” (Fig. 22), pero esto no ocurre de forma cuántica, es decir, en múltiplos exactos de los periodos de la condición control, como se había reportado previamente en la preparación *en bloc* (Gray et al., 2010). Respecto a esto, podemos decir que nuestros hallazgos son similares, aunque no idénticos, a los reportados por Gray y cols., 2010 (Gray et al., 2010) y que estas diferencias, se podrían deber al tipo de preparación utilizada ya que en este trabajo se registró la frecuencia respiratoria bajo condiciones *in vivo*, mientras que Gray y cols., (2010) lo hicieron en condiciones *in vitro*, utilizando la preparación *en bloc*, que contiene al tallo cerebral y la médula espinal (Gray et al., 2010). Nuestros resultados, en conjunto con lo reportado previamente, sugieren que sería de gran relevancia realizar investigación sobre el SMSL haciendo énfasis en la participación de los receptores tipo 2 de SST sobre la generación de los boqueos y sobre el proceso de autorresucitación. Todo esto, con la intención de buscar estrategias farmacológicas que permitan prevenir el cese de la generación de los boqueos, o bien, inducir su generación.

## CONCLUSIONES

- ✓ En esta tesis se demuestra que la SST modula la generación de los ritmos respiratorios producidos por el preBötC: eupnea, suspiros y boqueos, mediante un efecto directo sobre este núcleo neuronal. Esta modulación se refleja mediante una disminución en la frecuencia del ritmo respiratorio, acompañada de un incremento en la regularidad del mismo.
- ✓ La SST endógena modula, constitutivamente, la generación del ritmo respiratorio. Dicha modulación se observa cuando, al bloquear los SSTRs, el ritmo respiratorio incrementa su frecuencia e irregularidad.
- ✓ El efecto modulador de la SST parece ser directamente sobre el circuito generador del ritmo respiratorio ya que los efectos de la SST sobre el ritmo se mantienen en la preparación de islas de rebanadas del preBötC.
- ✓ La modulación de la SST sobre el preBötC se genera por la activación de los SSTR2, que son altamente expresados en este núcleo neuronal. La participación de los SSTR2 se demuestra ya que al usar un agonista y un antagonista, específicos de estos, se reduce e incrementa, respectivamente, la frecuencia y la irregularidad del ritmo respiratorio.
- ✓ En el preBötC, la modulación somatostatinérgica se asocia con diversos canales iónicos como son la  $I_M$  y canales  $IK_{Ca}$ . La participación de estos canales, se demuestra al bloquearlos y observar que se previene la modulación, producida por la SST, sobre el ritmo respiratorio.
- ✓ A nivel celular, la SST disminuye la actividad de las neuronas del preBötC. La SST genera una hiperpolarización del potencial de membrana en reposo y reduce la frecuencia de disparo de estas células.
- ✓ La SST inhibe la transmisión sináptica del preBötC tanto de manera presináptica como postsináptica. Los cambios en la transmisión sináptica por la SST se reflejan como una reducción de la frecuencia y la amplitud de los potenciales sinápticos.
- ✓ La neuromodulación de la SST es esencial para la generación del ritmo respiratorio y, más aún, para el proceso de la autorresucitación. Esto, se refleja en una incapacidad de los

animales para generar boqueos y autorresucitar después de un periodo de apnea hipóxica, cuando se bloquea el receptor tipo 2 de SST.

- ✓ Los hallazgos de este trabajo podrían contribuir a la comprensión del SMSL, que está relacionado con una interrupción en la generación de los boqueos y la autorresucitación, así como con un incremento en los niveles de SST y los sitios de unión a ésta en el preBötC.

## REFERENCIAS

- Abdala AP, Rybak IA, Smith JC, Zoccal DB, Machado BH, St.-John, WM, Paton, JF(2009) Multiple pontomedullary mechanisms of respiratory rhythmogenesis. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 168(1–2): 19–25
- Akopian A, Johnson J, Gabriel R, Brecha N, Witkovsky P (2000) Somatostatin modulates voltage-gated K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> currents in rod and cone photoreceptors of the salamander retina. *J Neurosci* 20: 929-936.
- Alheid GF, Milsom WK, McCrimmon DR (2004) Pontine influences on breathing: an overview. *Respir Physiol Neurobiol* 143: 105-114.
- Allot A, Mindorff (2010) *Biology*. Oxford. 2 nd. edition. New York. p. 242.
- Aronin N, Cooper PE, Lorenz LJ, Bird ED, Sagar SM, Leeman SE, Martin JB (1983) Somatostatin is increased in the basal ganglia in Huntington disease. *Ann Neurol* 13: 519-526.
- Bachevalier J, Meunier M (1989) Cerebral ischemia: are the memory deficits associated with hippocampal cell loss? *Hippocampus*. 6: 553–560.
- Baekey DM, Molkov YI, Paton JF, Rybak IA, Dick TE (2010) Effect of baroreceptor stimulation on the respiratory pattern: insights into respiratory-sympathetic interactions. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 174: 135–145.
- Balaguer L, Romano J, Ruiz-Pesini P (1992) Localization of serotonin, cholecystokinin and somatostatin immunoreactivity in the lower respiratory tract of embryonic, foetal and postnatal sheep. *Histol Histopathol.* 7(4):703-8.
- Ballanyi K, Onimaru H, Homma I (1999) Respiratory network function in the isolated brainstem-spinal cord of newborn rats. *Prog. Neurobiol.* 59: 583–634.
- Ballanyi K, Volker A, Richter DW (1994) Anoxia induced functional inactivation of neonatal respiratory neurones in vitro. *Neuroreport* 6: 165–168.
- Balleza-Tapia H, Huanosta-Gutiérrez A, Márquez-Ramos A, Arias N, Peña F (2010) Amyloid beta oligomers decrease hippocampal spontaneous network activity in an age-dependent manner. *Current Alzheimer research* 7:453-462.
- Banks WA, Schally AV, Barrera CM, Fasold MB, Durham DA, Csernus VJ, Groot K, Kastin AJ (1990) Permeability of the murine blood-brain barrier to some octapeptide analogs of somatostatin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(17):6762-6.
- Baraban SC, Tallent MK (2004) Interneuron Diversity series: Interneuronal neuropeptides--endogenous regulators of neuronal excitability. *Trends Neurosci* 27:135-142.
- Baratta MV, Lamp T, Tallent MK (2002) Somatostatin depresses long-term potentiation and Ca<sup>2+</sup> signaling in mouse dentate gyrus. *J Neurophysiol* 88:3078-3086.
- Barrett KE, Brook HL, Boitano S, Barman S (2010) *Ganong's Review of Medical Physiology*. 23rd. edition. McGraw Hill Medical. USA: 599-607.
- Bassant MH, Simon A, Poindessous-Jazat F, Csaba Z, Epelbaum J, Dournaud P (2005) Medial septal GABAergic neurons express the somatostatin sst2A receptor: functional consequences on unit firing and hippocampal theta. *J Neurosci* 25:2032-2041.
- Beal MF, Mazurek MF, Ellison DW, Swartz KJ, McGarvey U, Bird ED, Martin JB (1988) Somatostatin and neuropeptide Y concentrations in pathologically graded cases of Huntington's disease. *Ann Neurol* 23:562-569.



- Bell GI, Yasuda K, Kong H, Law SF, Raynor K, Reisine T (1995) Molecular biology of somatostatin receptors. *Ciba Found Symp* 190:65-79.
- Belousov AB, Godfraind JM, Krnjevic K (1995) Internal Ca<sup>2+</sup> stores involved in anoxic responses of rat hippocampal neurons. *J. Physiol.* 486: 547–556.
- Ben-Mabrouk F, Tryba AK (2010) Substance P modulation of TRPC3/7 channels improves respiratory rhythm regularity and ICAN-dependent pacemaker activity. *Eur J Neurosci* 31:1219-1232.
- Bianchi AL, Denavit-Saubié M, Champagnat J (1995) Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiol Rev* 75:1-45.
- Boehm S, Betz H (1997) Somatostatin inhibits excitatory transmission at rat hippocampal synapses via presynaptic receptors. *J Neurosci* 17:4066-4075.
- Bonham AC (1995) Neurotransmitters in the CNS control of breathing. *Respir Physiol* 101:219-230.
- Brady ST, Siegel GJ, Albers RW; Price DL (2012) *Basic Neurochemistry. Principles of molecular, cellular and medical neurobiology.* United Kingdom: Academic Press.
- Brailowsky S, García O (1999) Ethanol, GABA and epilepsy. *Arch Med Res.* 30 (1): 3-9.
- Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R (1973) Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179:77-79.
- Breder CD, Yamada Y, Yasuda K, Seino S, Saper CB, Bell GI (1992) Differential expression of somatostatin receptor subtypes in brain. *J Neurosci* 12:3920-3934.
- Buckmaster PS, Otero-Corchón V, Rubinstein M, Low MJ (2002) Heightened seizure severity in somatostatin knockout mice. *Epilepsy research* 48:43-56.
- Burke PG, Abbott SB, McMullan S, Goodchild AK, Pilowsky PM (2010) Somatostatin selectively ablates post-inspiratory activity after injection into the Bötzing complex. *Neuroscience* 167:528-539.
- Büsselberg D, Bischoff AM, Paton JF, Richter DW (2001) Reorganisation of respiratory network activity after loss of glycinergic inhibition. *Pflügers Arch.* 441: 444–449.
- Butera RJ Jr, Rinzel J, Smith JC (1999a) Models of respiratory rhythm generation in the pre-Botzinger complex. I. Bursting pacemaker neurons. *J. Neurophysiol.* 82: 382–397
- Butera RJ Jr, Rinzel J, Smith JC (1999b) Models of respiratory rhythm generation in the pre-Botzinger complex. II. Populations of coupled pacemaker neurons. *J. Neurophysiol.* 82: 398–415.
- Cammalleri M, Cervia D, Dal Monte M, Martini D, Langenegger D, Fehlmann D, Feuerbach D, Pavan B, Hoyer D, Bagnoli P (2006) Compensatory changes in the hippocampus of somatostatin knockout mice: upregulation of somatostatin receptor 2 and its function in the control of bursting activity and synaptic transmission. *Eur J Neurosci* 23:2404-2422.
- Campanucci VA, Fearon IM, Nurse CA (2003) A novel O<sub>2</sub>-sensing mechanism in rat glossopharyngeal neurones mediated by a halothane-inhibitable background K<sup>+</sup> conductance. *J. Physiol.* 548: 731–743.
- Carpentier V, Vaudry H, Laquerrière A, Leroux P (1999) Somatostatin binding sites in the white matter of the developing human brainstem: inverse relationship with the myelination process. *Neurosci Lett* 264:49-52.
- Carpentier V, Vaudry H, Mallet E, Laquerrière A, Leroux P (1998) Increased density of somatostatin binding sites in respiratory nuclei of the brainstem in sudden infant death syndrome. *Neuroscience* 86:159-166.

- Carroll MS, Ramirez JM (2012) The cycle-by-cycle assembly of respiratory network activity is dynamic and stochastic. *J Neurophysiol.* 2012 Sep 19. [Epub ahead of print]
- Centonze D, Saulle E, Pisani A, Bernardi G, Calabresi P (2001) Adenosine-mediated inhibition of striatal GABAergic synaptic transmission during in vitro ischaemia. *Brain* 124: 1855–1865.
- Chen ZB, Hedner T, Hedner J (1990) Local application of somatostatin in the rat ventrolateral brain medulla induces apnea. *J Appl Physiol* 69:2233-2238.
- Chigr F, Jordan D, Najimi M, Denoroy L, Sarrieau A, de Broca A, Rostene W, Epelbaum J, Kopp N (1992) Quantitative autoradiographic study of somatostatin and neurotensin binding sites in medulla oblongata of SIDS. *Neurochem Int.* (1):113-8.
- Coelho JE, de Mendonca A, Ribeiro JA (2000) Presynaptic inhibitory receptors mediate the depression of synaptic transmission upon hypoxia in rat hippocampal slices. *Brain Res.* 869, 158–165.
- Connelly CA, Dobbins EG, Feldman JL (1992) Pre-Bötzinger complex in cats: respiratory neuronal discharge patterns. *Brain Res* 590(1-2):337-40.
- Craft S, Asthana S, Newcomer JW, Wilkinson CW, Matos IT, Baker LD, Cherrier M, Lofgreen C, Latendresse S, Petrova A, Plymate S, Raskind M, Grimwood K, Veith RC (1999) Enhancement of memory in Alzheimer disease with insulin and somatostatin, but not glucose. *Arch Gen Psychiatry* 56:1135-1140.
- Csaba Z, Dournaud P (2001) Cellular biology of somatostatin receptors. *Neuropeptides* 35:1-23.
- Cummins TR, Jiang C, Haddad GG (1993) Human neocortical excitability is decreased during anoxia via sodium channel modulation. *J. Clin. Invest.* 91: 608–615.
- Davis KL, Mohs RC, Marin DB, Purohit DP, Perl DP, Lantz M, Austin G, Haroutunian V (1999) Neuropeptide abnormalities in patients with early Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry* 56:981-987.
- de Weille JR, Schmid-Antomarchi H, Fosset M, Lazdunski M (1989) Regulation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in insulinoma cells: activation by somatostatin and protein kinase C and the role of cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2971-2975.
- Del Negro CA, Morgado-Valle C, Hayes JA, Mackay DD, Pace RW, Crowder EA, Feldman JL (2005) Sodium and calcium current-mediated pacemaker neurons and respiratory rhythm generation. *J Neurosci* 25:446-453.
- DeNoble VJ, Hepler DJ, Barto RA (1989) Cysteamine-induced depletion of somatostatin produces differential cognitive deficits in rats. *Brain Res* 482:42-48.
- Deshpande SB, Jha A (2004) Aglycemia and ischemia depress monosynaptic and polysynaptic reflexes in neonatal rat spinal cord in vitro by involving different types of 5-hydroxytryptamine receptors. *Neurosci. Lett.* 372: 167–172.
- Duerson K, White RE, Jiang F, Schonbrunn A, Armstrong DL (1996) Somatostatin stimulates BKCa channels in rat pituitary tumor cells through lipoxygenase metabolites of arachidonic acid. *Neuropharmacology* 35:949-961.
- Duffin J (2004) Functional organization of respiratory neurones: a brief review of current questions and speculations. *Exp Physiol* 89:517-529.
- Dutar P, Vaillend C, Viollet C, Billard JM, Potier B, Carlo AS, Ungerer A, Epelbaum J (2002) Spatial learning and synaptic hippocampal plasticity in type 2 somatostatin receptor knock-out mice. *Neuroscience* 112:455-466.
- e Silva MJ, Lewis DL (1995) L- and N-type Ca<sup>2+</sup> channels in adult rat carotid body chemoreceptor type I cells. *J Physiol* 489 ( Pt 3):689-699.

- Edgerton JR, Reinhart PH (2003) Distinct contributions of small and large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels to rat Purkinje neuron function. *J Physiol.* 548(Pt 1):53-69. Epub 2003 Feb 7.
- Elian M, Rudolf ND (1991) EEG and respiration in Rett syndrome. *Acta Neurol Scand.* 83 (2): 123-8.
- Elsen FP, Ramirez JM (1998) Calcium currents of rhythmic neurons recorded in the isolated respiratory network of neonatal mice. *J Neurosci* 18:10652-10662.
- England SJ, Melton JE, Douse MA, Duffin J (1995) Activity of respiratory neurons during hypoxia in the chemodenervated cat. *J. Appl. Physiol.* 78: 856–861.
- Epelbaum J, Dournaud P, Fodor M, Viollet C (1994) The neurobiology of somatostatin. *Crit Rev Neurobiol.* (1-2):25-44.
- Epelbaum J, Guillou JL, Gastambide F, Hoyer D, Duron E, Viollet C (2009) Somatostatin, Alzheimer's disease and cognition: an old story coming of age? *Progress in neurobiology* 89:153-161.
- Erdemli G, Crunelli V (1998) Response of thalamocortical neurons to hypoxia: a wholecell patch-clamp study. *J Neurosci.* 18: 5212–5224.
- Erdemli G, Xu YZ, Krnjevic K (1998) Potassium conductance causing hyperpolarization of CA1 hippocampal neurons during hypoxia. *J. Neurophysiol.* 80: 2378–2390.
- Erickson JT, Sposato BC (2009) Autoresuscitation responses to hypoxia-induced apnea are delayed in newborn 5-HT-deficient Pet-1 homozygous mice. *J Appl Physiol.* 106(6):1785-92.
- Eugenín J, Bravo EU, Coddou C, Gray PA, Llona I (2008) Somatostatin induces quantal slowing of fictive respiration in mouse neonates *Soc Neurosci Abs* 476.1/PP15
- Eve DJ, Nisbet AP, Kingsbury AE, Temlett J, Marsden CD, Foster OJ (1997) Selective increase in somatostatin mRNA expression in human basal ganglia in Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 50:59-70.
- Ezure K (1990) Synaptic connections between medullary respiratory neurons and considerations on the genesis of respiratory rhythm. *Progress in neurobiology* 35:429-450.
- Ezure K, Tanaka I, Saito Y (2003) Activity of brainstem respiratory neurones just before the expiration-inspiration transition in the rat. *J Physiol* 547:629-640.
- Fehlmann D, Langenegger D, Schuepbach E, Siehler S, Feuerbach D, Hoyer D (2000) Distribution and characterisation of somatostatin receptor mRNA and binding sites in the brain and periphery. *J Physiol Paris.* 94(3-4):265-81.
- Feldman JL (1995) Neurobiology of breathing control. Where to look and what to look for. *Adv Exp Med Biol.* 393:3-5.
- Feldman JL, Del Negro CA (2006) Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. *Nat Rev Neurosci* 7:232-242.
- Feldman JL, Gray PA (2000) Sighs and gasps in a dish. *Nat Neurosci* 3:531-532.
- Feldman JL, Mitchell GS, Nattie EE (2003) Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. *Annu Rev Neurosci* 26:239-266.
- Feldman JL, Smith JC, Ellenberger HH, Connelly CA, Liu GS, Greer JJ, Lindsay AD, Otto MR (1990) Neurogenesis of respiratory rhythm and pattern: emerging concepts. *The American journal of physiology* 259:R879-886.

- Feldman JL, Smith JC, Liu G (1991) Respiratory pattern generation in mammals: in vitro en bloc analyses. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1: 590–594
- Fewell JE, Smith FG, Ng VK, Wong VH, Wang Y (2000) Postnatal age influences the ability of rats to autoresuscitate from hypoxic-induced apnea. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R39-46.
- Filuk RB, Berezanski DJ, Anthonisen NR (1988) Depression of hypoxic ventilatory response in humans by somatostatin. *J Appl Physiol* 65:1050-1054.
- Fleidervish IA, Gebhardt C, Astman N, Gutnick MJ, Heinemann U (2001) Enhanced spontaneous transmitter release is the earliest consequence of neocortical hypoxia that can explain the disruption of normal circuit function. *J. Neurosci.* 21: 4600–4608.
- Fowler JC, Gervitz LM, Hamilton ME, Walker JA (2003) Systemic hypoxia and the depression of synaptic transmission in rat hippocampus after carotid artery occlusion. *J. Physiol.* 550: 961–972.
- Frenguelli BG, Llaudet E, Dale N (2003) High-resolution real-time recording with microelectrode biosensors reveals novel aspects of adenosine release during hypoxia in rat hippocampal slices. *J. Neurochem.* 86: 1506–1515.
- Funk GD, Feldman JL (1995) Generation of respiratory rhythm and pattern in mammals: insights from developmental studies. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5: 778–785
- Funke F, Dutschmann M, Müller M (2007) Imaging of respiratory-related population activity with single-cell resolution. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C508-516.
- Galarraga E, Vilchis C, Tkatch T, Salgado H, Tecuapetla F, Pérez-Roselló T, Pérez-García E, Hernández-Echeagaray E, Surmeier DJ, Bargas J (2007) Somatostatinergic modulation of firing pattern and calcium-activated potassium currents in medium spiny neostriatal neurons. *Neuroscience* 146:537-554.
- Garcia AJ 3rd, Zanella S, Koch H, Doi A, Ramirez JM (2011) Chapter 3--networks within networks: the neuronal control of breathing. *Prog Brain Res.* 188:31-50.
- Gershan WM, Jacobi MS, Thach BT (1990) Maturation of cardiorespiratory interactions in spontaneous recovery from hypoxic apnea (autoresuscitation). *Pediatr Res* 28: 87–93.
- Gershan WM, Jacobi MS, Thach BT (1992) Mechanisms underlying induced autoresuscitation failure in BALB/c and SWR mice. *J Appl Physiol* 72: 677–685.
- Gervitz LM, Davies DG, Omidvar K, Fowler JC (2003) The effect of acute hypoxemia and hypotension on adenosine-mediated depression of evoked hippocampal synaptic transmission. *Exp. Neurol.* 182: 507–517.
- Gervitz LM, Lutherer LO, Davies DG, Pirch JH, Fowler JC (2001) Adenosine induces initial hypoxic-ischemic depression of synaptic transmission in the rat hippocampus in vivo. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280: R639–R645.
- Gnaiger E (2001) Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. *Respir. Physiol.* 128: 277–297.
- Golard A, Role LW, Siegelbaum SA (1993) Protein kinase C blocks somatostatin-induced modulation of calcium current in chick sympathetic neurons. *J Neurophysiol* 70:1639-1643.
- Golard A, Siegelbaum SA (1993) Kinetic basis for the voltage-dependent inhibition of N-type calcium current by somatostatin and norepinephrine in chick sympathetic neurons. *J Neurosci* 13:3884-3894.

- Gozal D, Gozal E, Reeves SR, Lipton AJ (2002) Gasping and autoresuscitation in the developing rat: effect of antecedent intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* 92:1141-1144.
- Grant M, Patel RC, Kumar U (2004) The role of subtype-specific ligand binding and the C-tail domain in dimer formation of human somatostatin receptors. *J Biol Chem* 279:38636–38643
- Gray PA, Hayes JA, Ling GY, Llona I, Tupal S, Picardo MC, Ross SE, Hirata T, Corbin JG, Eugenin J, Del Negro CA (2010) Developmental origin of preBötzinger complex respiratory neurons. *J Neurosci* 30:14883-14895.
- Gray PA, Janczewski WA, Mellen N, McCrimmon DR, Feldman JL (2001) Normal breathing requires preBötzinger complex neurokinin-1 receptor-expressing neurons. *Nat Neurosci* 4:927-930.
- Gray PA, Reikling JC, Bocchiaro CM, Feldman JL (1999) Modulation of respiratory frequency by peptidergic input to rhythmogenic neurons in the preBotzinger complex. *Science* 286:1566 –1568.
- Greer JJ, Carter JE (1995) Effects of cyanide on the neural mechanisms controlling breathing in the neonatal rat in vitro. *Neurotoxicology* 16, 211–215.
- Greer JJ, Smith JC, Feldman JL (1991) Role of excitatory amino acids in the generation and transmission of respiratory drive in neonatal rat brainstem-spinal cord in vitro. *J. Physiol. (London)*. 437: 727–749.
- Grilli M, Raiteri L, Pittaluga A (2004) Somatostatin inhibits glutamate release from mouse cerebrocortical nerve endings through presynaptic sst2 receptors linked to the adenylyl cyclase-protein kinase A pathway. *Neuropharmacology* 46:388-396.
- Guyton AC, Hall JE (2006) *Textbook of medical physiology*. USA: Elsevier saunders
- Haddad GG, Jiang C (1993) O<sub>2</sub> deprivation in the central nervous system: on mechanisms of neuronal response, differential sensitivity and injury. *Progress in neurobiology* 40:277-318.
- Haji A, Takeda R, Okazaki M (2000) Neuropharmacology of control of respiratory rhythm and pattern in mature mammals. *Pharmacol Ther* 86:277-304.
- Haller M, Mironov SL, Karschin A, Richter DW (2001) Dynamic activation of K(ATP) channels in rhythmically active neurons. *J. Physiol.* 537, 69–81.
- Hammarstrom AK, Gage PW (1998) Inhibition of oxidative metabolism increases persistent sodium current in rat CA1 hippocampal neurons. *J Physiol.* 510: 735–741.
- Hammarstrom AK, Gage PW (2000) Oxygen-sensing persistent sodium channels in rat hippocampus. *J. Physiol.* 529: 107–118.
- Hammarstrom AK, Gage PW (2002) Hypoxia and persistent sodium current. *Eur. Biophys J.* 31: 323–330.
- Hammond C, Crepel V, Gozlan H, Ben-Ari Y (1994) Anoxic LTP sheds light on the multiple facets of NMDA receptors. *Trends Neurosci.* 17: 497–503.
- Härfstrand A, Fuxe K, Kalia M, Agnati LF (1985) Somatostatin induced apnoea: prevention by central and peripheral administration of the opiate receptor blocking agent naloxone. *Acta physiologica Scandinavica* 125:91-95.
- Härfstrand A, Kalia M, Fuxe K, Kaijser L, Agnati LF (1984) Somatostatin-induced apnea: interaction with hypoxia and hypercapnea in the rat. *Neurosci Lett* 50:37-42.

- Haroutunian V, Mantin R, Campbell GA, Tsuboyama GK, Davis KL (1987) Cysteamine-induced depletion of central somatostatin-like immunoactivity: effects on behavior, learning, memory and brain neurochemistry. *Brain Res* 403:234-242.
- Harper RM, Gozal D, Bandler R, Spriggs D, Lee J, Alger J (1998) Regional brain activation in humans during respiratory and blood pressure challenges. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 25:483-486.
- Harper RM, Kinney HC, Fleming PJ, Thach BT (2000) Sleep influences on homeostatic functions: implications for sudden infant death syndrome. *Respir Physiol* 119:123-132.
- Hayes JA, Del Negro CA (2007) Neurokinin receptor-expressing pre-bötzing complex neurons in neonatal mice studied in vitro. *J Neurophysiol* 97:4215-4224.
- Hellweg R, von Arnim CA, Buchner M, Huber R, Riepe MW (2003) Neuroprotection and neuronal dysfunction upon repetitive inhibition of oxidative phosphorylation. *Exp. Neurol.* 183: 346–354.
- Hentschel S, Lewerenz A, Nieber K (2003) Activation of A(3) receptors by endogenous adenosine inhibits synaptic transmission during hypoxia in rat cortical neurons. *Restor. Neurol. Neurosci.* 21: 55–63.
- Herpfer I, Hunt SP, Stanford SC (2005) A comparison of neurokinin 1 receptor knock-out (NK1<sup>-/-</sup>) and wildtype mice: exploratory behaviour and extracellular noradrenaline concentration in the cerebral cortex of anaesthetised subjects. *Neuropharmacology* 48:706-719.
- Higuchi H, Niki T, Shiiya T (2008) Feeding behavior and gene expression of appetite-related neuropeptides in mice lacking for neuropeptide Y Y5 receptor subclass. *World J Gastroenterol* 14:6312-6317.
- Hilaire G, Duron B (1999) Maturation of the mammalian respiratory system. *Physiol Rev* 79:325-360.
- Hilaire G, Monteau R, Gauthier P, Rega P, Morin D (1990) Functional significance of the dorsal respiratory group in adult and newborn rats: in vivo and in vitro studies. *Neurosci Lett* 111:133-138.
- Hilaire G, Pásaro R (2003) Genesis and control of the respiratory rhythm in adult mammals. *News Physiol Sci* 18:23-28.
- HJ, Heinemann U (1992) Hypoxia-induced functional alterations in adult rat neocortex. *J Neurophysiol.* 67: 798–811.
- Horn EM, Waldrop TG (2000) Hypoxic augmentation of fast-inactivating and persistent sodium currents in rat caudal hypothalamic neurons. *J. Neurophysiol.* 84: 2572–2581.
- Hosy E, Piochon C, Teuling E, Rinaldo L, Hansel C (2011) SK2 channel expression and function in cerebellar Purkinje cells. *J Physiol.* 2011 Jul 15;589(Pt 14):3433-40. Epub 2011 Apr 26.
- Hou GQ, Pan X, Liao CS, Wang SH, Li DF (2012) SK channels modulate the excitability and firing precision of projection neurons in the robust nucleus of the arcopallium in adult male zebra finches. *Neurosci Bull.* 28(3):271-81.
- Hoyer D, Pérez J, Schoeffer P, Langenegger D, Schüpbach E, Kaupmann K, Lübbert H, Bruns C, Reubi JC (1995) Pharmacological identity between somatostatin SS-2 binding sites and SSTR-1 receptors. *Eur J Pharmacol* 289:151-161.
- Hui DS, Choy DK, Ko FW, Li TS, Lai CK (2000) Obstructive sleep apnoea syndrome: treatment update. *Hong Kong Med J.* 6(2): 209-17.
- Hunt CE (1992) The cardiorespiratory control hypothesis for sudden infant death syndrome. *Clin Perinatol* 19:757-771.

- Janczewski WA, Feldman JL (2006) Distinct rhythm generators for inspiration and expiration in the juvenile rat. *J Physiol* 570:407-420.
- Jha A, Deshpande SB (2003) Aglycemia and ischemia depress spinal synaptic transmission via inhibitory systems involving NMDA receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 481: 189–196.
- Jiang C, Haddad GG (1994) A direct mechanism for sensing low oxygen levels by central neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 7198–7201.
- Jiang N, Furue H, Katafuchi T, Yoshimura M (2003) Somatostatin directly inhibits substantia gelatinosa neurons in adult rat spinal dorsal horn in vitro. *Neurosci. Res.* 47: 97-107.
- Johansson O, Hökfelt T, Elde RP (1984) Immunohistochemical distribution of somatostatin-like immunoreactivity in the central nervous system of the adult rat. *Neuroscience* 13:265-339.
- Johnson SM, Koshiya N, Smith JC (2001) Isolation of the kernel for respiratory rhythm generation in a novel preparation: the pre-Bötzinger complex "island". *J Neurophysiol* 85:1772-1776.
- Johnson SM, Smith JC, Funk GD, Feldman JL (1994) Pacemaker behavior of respiratory neurons in medullary slices from neonatal rat. *J Neurophysiol* 72: 2598-2608.
- Jordan D (2001) Central nervous pathways and control of the airways. *Respir Physiol* 125:67-81.
- Kaczynska K, Szereda-Przestaszewska M (2010) Depressive cardio-respiratory effects of somatostatin in anaesthetized rats. *Respir Physiol Neurobiol* 170:273-278.
- Kalia M, Fuxe K, Agnati LF, Hökfelt T, Härfstrand A (1984) Somatostatin produces apnea and is localized in medullary respiratory nuclei: a possible role in apneic syndromes. *Brain Res* 296:339-344.
- Kameda Y (1989) Distribution of CGRP-, somatostatin-, galanin-, VIP-, and substance P-immunoreactive nerve fibers in the chicken carotid body. *Cell and tissue research* 257:623-629.
- Karschin A (1995) Molecular single-cell analysis identifies somatostatin type 1 (sst1) receptors to block inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels in rat brain oligodendrocytes. *Neuroreport* 7:121-124.
- Karschin A, Wischmeyer E, Davidson N, Lester HA (1994) Fast inhibition of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels by multiple neurotransmitter receptors in oligodendroglia. *Eur J Neurosci* 6:1756-1764.
- Kasa P, Rakonczay Z, Gulya K (1997) The cholinergic system in Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 52:511–535.
- Katchman AN, Hershkowitz N (1993) Adenosine antagonists prevent hypoxia induced depression of excitatory but not inhibitory synaptic currents. *Neurosci Lett.* 159: 123–126.
- Kawaguchi Y, Kondo S (2002) Parvalbumin, somatostatin and cholecystokinin as chemical markers for specific GABAergic interneuron types in the rat frontal cortex. *J Neurocytol* 31:277-287.
- Kawai Y, Qi J, Comer AM, Gibbons H, Win J, Lipski J (1999) Effects of cyanide and hypoxia on membrane currents in neurones acutely dissociated from the rostral ventrolateral medulla of the rat. *Brain Res.* 830:246–257.
- Kerr AM (1992) A review of the respiratory disorder in the Rett syndrome. *Brain Dev.* 14 Suppl: S43-5.
- Kim SJ, Chung WH, Rhim H, Eun SY, Jung SJ, Kim J (2002) Postsynaptic action mechanism of somatostatin on the membrane excitability in spinal substantia gelatinosa neurons of juvenile rats. *Neuroscience* 114:1139-1148.

- Kinney HC, Thach BT (2009) The sudden infant death syndrome. *N Engl J Med.* 361(8):795-805.
- Kleuss C, Hescheler J, Ewel C, Rosenthal W, Schultz G, Wittig B (1991) Assignment of G-protein subtypes to specific receptors inducing inhibition of calcium currents. *Nature* 353:43-48.
- Kleuss C, Scherübl H, Hescheler J, Schultz G, Wittig B (1992) Different beta-subunits determine G-protein interaction with transmembrane receptors. *Nature* 358:424-426.
- Koch BD, Schonbrunn A (1984) The somatostatin receptor is directly coupled to adenylate cyclase in GH4C1 pituitary cell membranes. *Endocrinology* 114:1784-1790.
- Koizumi H, Smith JC (2008) Persistent Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>-dominated leak currents contribute to respiratory rhythm generation in the pre-Bötzinger complex in vitro. *J Neurosci* 28:1773-1785.
- Koshiya N, Smith JC (1999) Neuronal pacemaker for breathing visualized in vitro. *Nature* 400: 360–363
- Kulik A, Trapp S, Ballanyi K (2000) Ischemia but not anoxia evokes vesicular and Ca(2+)-independent glutamate release in the dorsal vagal complex in vitro. *J. Neurophysiol.* 83: 2905–2915.
- Kumar U, Grant M (2010) Somatostatin and somatostatin receptors. *Results Probl Cell Differ* 50:137-184.
- Kummer W, Gibbins IL, Heym C (1989) Peptidergic innervation of arterial chemoreceptors. *Archives of histology and cytology* 52 Suppl:361-364.
- Lahlou H, Guillermet J, Hortala M, Vernejoul F, Pyronnet S, Bousquet C, Susini C (2004) Molecular signaling of somatostatin receptors. *Ann N Y Acad Sci* 1014:121-131.
- Lai J, Shao XM, Pan RW, Dy E, Huang CH, Feldman JL (2001) RT-PCR reveals muscarinic acetylcholine receptor mRNA in the pre-Bötzinger complex. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281:L1420-1424.
- Lammers CH, Schweitzer P, Facchinetti P, Arrang JM, Madamba SG, Siggins GR, Piomelli D (1996) Arachidonate 5-lipoxygenase and its activating protein: prominent hippocampal expression and role in somatostatin signaling. *J Neurochem* 66:147-152.
- Lavezzi AM, Corna M, Mingrone R, Matturri L (2010) Study of the human hypoglossal nucleus: normal development and morpho-functional alterations in sudden unexplained late fetal and infant death. *Brain & development* 32:275-284.
- Lavezzi AM, Matturri L (2008) Functional neuroanatomy of the human pre-Bötzinger complex with particular reference to sudden unexplained perinatal and infant death. *Neuropathology* 28:10-16.
- Lavezzi AM, Ottaviani G, Matturri L (2004a) Role of somatostatin and apoptosis in breathing control in sudden perinatal and infant unexplained death. *Clin Neuropathol* 23:304-310.
- Lavezzi AM, Ottaviani G, Matturri L (2004b) Involvement of somatostatin in breathing control before and after birth, and in perinatal and infant sudden unexplained death. *Folia Neuropathol* 42:59-65.
- Leibstein AG, Dermietzel R, Willenberg IM, Pauschert R (1985) Mapping of different neuropeptides in the lower brainstem of the rat: with special reference to the ventral surface. *J Auton Nerv Syst* 14:299-313.
- Leresche N, Asproдини E, Emri Z, Cope DW, Crunelli V (2000) Somatostatin inhibits GABAergic transmission in the sensory thalamus via presynaptic receptors. *Neuroscience* 98:513-522.
- Lieske SP, Ramirez JM (2006) Pattern-specific synaptic mechanisms in a multifunctional network. I. Effects of alterations in synapse strength. *J Neurophysiol* 95:1323-1333.



- Lieske SP, Thoby-Brisson M, Ramirez JM (2001) Reconfiguration of the central respiratory network under normoxic and hypoxic conditions. *Adv. Exp. Med. Biol.* 499:171–178.
- Lieske SP, Thoby-Brisson M, Telgkamp P, Ramirez JM (2000) Reconfiguration of the neural network controlling multiple breathing patterns: eupnea, sighs and gasps. *Nat Neurosci* 3:600-607.
- Lin W, McKinney K, Liu L, Lakhani S, Jennes L (2003) Distribution of vesicular glutamate transporter-2 messenger ribonucleic Acid and protein in the septum-hypothalamus of the rat. *Endocrinology* 144: 662–670.
- Liu H, Moczydlowski E, Haddad GG (1999) O<sub>2</sub> deprivation inhibits Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels via cytosolic factors in mice neocortical neurons. *J. Clin. Invest.* 104:577–588.
- Llona I, Ampuero E, Eugenin JL (2004) Somatostatin inhibition of fictive respiration is modulated by pH. *Brain Res* 1026:136-142.
- Llona I, Eugenin J (2005) Central actions of somatostatin in the generation and control of breathing. *Biol Res* 38:347-352.
- Llona I, Fariás P, Eugenin JL (2001) Presence of somatostatin immunoreactive neurons in the brainstem of neonatal mouse. *Soc Neurosci: Abs* 27.
- López-Huerta VG, Blanco-Hernández E, Bargas J, Galarraga E (2012) Presynaptic modulation by somatostatin in the rat neostriatum is altered in a model of parkinsonism. *J Neurophysiol.* 108(4):1032-43.
- López-Huerta VG, Tecuapetla F, Guzman JN, Bargas J, Galarraga E (2008) Presynaptic modulation by somatostatin in the neostriatum. *Neurochem Res* 33:1452-1458.
- Lukyanetz EA, Shkryl VM, Kravchuk OV, Kostyuk PG (2003a) Action of hypoxia on different types of calcium channels in hippocampal neurons. *Biochim. Biophys. Acta.* 1618: 33–38.
- Lukyanetz EA, Shkryl VM, Kravchuk OV, Kostyuk PG (2003b) Effect of hypoxia on calcium channels depends on extracellular calcium in CA1 hippocampal neurons. *Brain Res.* 980: 128–134.
- Mancillas JR, Siggins GR, Bloom FE (1998) Somatostatin selectively enhances acetylcholine-induced excitations in rat hippocampus and cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (19):7518-21.
- Marrion NV (1997) Control of M-current. *Annu Rev Physiol.* 1997;59:483-504.
- Martínez MA, Matías DR, Rodríguez SR (2007) Síndrome de Muerte Súbita del Lactante, actualidades. *Vacunación Hoy* 15:3-18.
- Martínez V, Coy DH, Taché Y (1995) Influence of intracisternal injection of somatostatin analog receptor subtypes 2, 3 and 5 on gastric acid secretion in conscious rats. *Neurosci Lett* 186:79-82.
- Martínez V, Rivier J, Coy D, Taché Y (2000) Intracisternal injection of somatostatin receptor 5-preferring agonists induces a vagal cholinergic stimulation of gastric emptying in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 293:1099-1105.
- Mathie A, Wooltorton JR, Watkins CS (1998) Voltage-activated potassium channels in mammalian neurons and their block by novel pharmacological agents. *Gen Pharmacol.* 30(1):13-24.
- Matsuoka N, Kaneko S, Satoh M (1991) Somatostatin augments long-term potentiation of the mossy fiber-CA3 system in guinea-pig hippocampal slices. *Brain Res.* 553(2):188-94.
- Maxová H, Vizek M (2001) Biphasic ventilatory response to hypoxia in unanesthetized rats. *Physiol Res* 50:91-96.

- Maxwell DL, Chahal P, Nolop KB, Hughes JM (1986) Somatostatin inhibits the ventilatory response to hypoxia in humans. *J Appl Physiol* 60:997-1002.
- Mazza E Jr, Edelman NH, Neubauer JA (2000) Hypoxic excitation in neurons cultured from the rostral ventrolateral medulla of the neonatal rat. *J. Appl. Physiol.* 88: 2319–2329.
- McCrimmon DR, Dekin MS, Mitchell GS (1995) Glutamate, GABA and serotonin in ventilatory control. In: Dempsey JA, Pack AI (Eds.), *Lung Biology in Health and Disease Regulation of Breathing: Central Nervous Control*, Vol 79. Marcel-Dekker, New York, pp. 151–218.
- McCrimmon DR, Ramirez JM, Alford S, Zuperku EJ (2000) Unraveling the mechanism for respiratory rhythm generation. *Bioessays* 22:6-9.
- McDonald AJ, Mascagni F (2002) Immunohistochemical characterization of somatostatin containing interneurons in the rat basolateral amygdala. *Brain Res* 943:237-244.
- McKay LC, Janczewski WA, Feldman JL (2005) Sleep-disordered breathing after targeted ablation of preBötzing complex neurons. *Nat Neurosci* 8:1142-1144.
- Meis S, Sosulina L, Schulz S, Höllt V, Pape HC (2005) Mechanisms of somatostatin-evoked responses in neurons of the rat lateral amygdala. *Eur J Neurosci* 21:755-762.
- Mellen NM, Janczewski WA, Bocchiaro CM, Feldman JL (2003) Opioid-induced quantal slowing reveals dual networks for respiratory rhythm generation. *Neuron* 37:821-826.
- Meriney SD, Gray DB, Pilar GR (1994) Somatostatin-induced inhibition of neuronal Ca<sup>2+</sup> current modulated by cGMP-dependent protein kinase. *Nature* 369:336-339.
- Messier ML, Li A, Nattie EE (2004) Inhibition of medullary raphe serotonergic neurons has age-dependent effects on the CO<sub>2</sub> response in newborn piglets. *J Appl Physiol* 96:1909-1919.
- Meyerhof W (1998) The elucidation of somatostatin receptor functions: a current view. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 133:55-108.
- Mihara S, North RA, Surprenant A (1987) Somatostatin increases an inwardly rectifying potassium conductance in guinea-pig submucous plexus neurones. *J Physiol* 390:335-355.
- Mironov SL, Langohr K, Haller M, Richter DW (1998) Hypoxia activates ATP-dependent potassium channels in inspiratory neurones of neonatal mice. *J Physiol.* 509 (Pt 3):755-66.
- Mironov SL, Langohr K, Richter DW (1999) A1 adenosine receptors modulate respiratory activity of the neonatal mouse via the cAMP-mediated signaling pathway. *J Neurophysiol* 81:247-255.
- Mironov SL, Langohr K, Richter DW (2000) Hyperpolarization-activated current, I<sub>h</sub>, in inspiratory brainstem neurons and its inhibition by hypoxia. *Eur. J. Neurosci.* 12:520–526.
- Mironov SL, Richter DW (1998) L-type Ca<sup>2+</sup> channels in inspiratory neurones of mice and their modulation by hypoxia. *J Physiol.* 512: 75–87.
- Mironov SL, Richter DW (1999) Cytoskeleton mediates inhibition of the fast Na<sup>+</sup> current in respiratory brainstem neurons during hypoxia. *Eur J Neurosci.* 11:1831–1834.
- Mironov SL, Richter DW (2000) Intracellular signalling pathways modulate K (ATP) channels in inspiratory brainstem neurones and their hypoxic activation: involvement of metabotropic receptors, G-proteins and cytoskeleton. *Brain Res.* 853: 60–67.

- Momiyama T, Zaborszky L (2006) Somatostatin presynaptically inhibits both GABA and glutamate release onto rat basal forebrain cholinergic neurons. *J Neurophysiol* 96:686-694.
- Moore SD, Madamba SG, Joels M, Siggins GR (1988) Somatostatin augments the M-current in hippocampal neurons. *Science* 239:278-280.
- Morgado-Valle C, Baca SM, Feldman JL (2010) Glycinergic pacemaker neurons in preBötzinger complex of neonatal mouse. *J Neurosci.* 30(10):3634-9.
- Morin D, Hennequin S, Monteau R, Hilaire G (1990) Serotonergic influences on central respiratory activity: an in vitro study in the newborn rat. *Brain Res.* 1990 535(2): 281-7.
- Mueller RA, Lundberg DB, Breese GR, Hedner J, Hedner T, Jonason J (1982) The neuropharmacology of respiratory control. *Pharmacol Rev* 34:255-285.
- Nakata A, Saito H, Nishiyama N (1996) Facilitatory role of somatostatin via muscarinic cholinergic system in the generation of long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vivo. *Brain Res.* 723(1-2):135-40.
- Nattie EE (2001) Central chemosensitivity, sleep, and wakefulness. *Respir Physiol* 129:257-268.
- Neubauer JA, Melton JE, Edelman NH (1990) Modulation of respiration during brain hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 68: 441–451.
- Nowicky AV, Duchon MR (1998) Changes in  $[Ca^{2+}]_i$  and membrane currents during impaired mitochondrial metabolism in dissociated rat hippocampal neurons. *J. Physiol.* 507: 131–145.
- Núñez-Abades PA, Pásaro R, Bianchi AL (1992) Study of the topographical distribution of different populations of motoneurons within rat's nucleus ambiguus, by means of four different fluorochromes. *Neurosci Lett* 135:103-107.
- O'Reilly JP, Cummins TR, Haddad GG (1997) Oxygen deprivation inhibits  $Na^+$  current in rat hippocampal neurons via protein kinase C. *J. Physiol.* 503: 479–488
- Okada Y, Chen Z, Kuwana S (2001) Cytoarchitecture of central chemoreceptors in the mammalian ventral medulla. *Respir Physiol* 129:13-23.
- Okazaki M, Takeda R, Haji A, Yamazaki H (2001) Glutamic acid decarboxylase-immunoreactivity of bulbar respiratory neurons identified by intracellular recording and labeling in rats. *Brain Res* 914:34-47.
- Olias G, Viollet C, Kusserow H, Epelbaum J, Meyerhof W (2004) Regulation and function of somatostatin receptors. *J Neurochem* 89:1057-1091.
- Olson AL, Zwillich C (2005) The obesity hypoventilation syndrome. *Am J Med.* 118 (9): 948-56.
- Onimaru H, Arata A, Homma I (1988) Primary respiratory rhythm generator in the medulla of brainstem-spinal cord preparation from newborn rat. *Brain Res* 445:314-324.
- Onimaru H, Homma I (2003) A novel functional neuron group for respiratory rhythm generation in the ventral medulla. *J Neurosci* 23:1478-1486.
- Oomura Y, Mizuno Y (1986) Effect of somatostatin on the vagal motor neuron in the rat. *Brain Res Bull* 17:397-401.
- Orem J, Trotter RH (1993) Medullary respiratory neuronal activity during augmented breaths in intact unanesthetized cats. *J Appl Physiol* 74:761-769.

- Pantaleo T, Mutolo D, Cinelli E, Bongiani F (2011) Respiratory responses to somatostatin microinjections into the Bötzing complex and the pre-Bötzing complex of the rabbit. *Neurosci Lett* 498:26-30.
- Park YK, Jung SJ, Yoo JE, Kwak J, Lim W, Kim J (2003) Effect of acute hypoxia on ATP-sensitive potassium currents in substantia gelatinosa neurons of juvenile rats. *Pflugers Arch.* 446: 600–606.
- Pascual O, Morin-Surun MP, Barna B, Denavit-Saubie M, Pequignot JM, Champagnat J (2002) Progesterone reverses the neuronal responses to hypoxia in rat nucleus tractus solitarius in vitro. *J. Physiol.* 544: 511–520.
- Patel YC (1999) Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol* 20:157-198.
- Patel YC, Greenwood MT, Warszynska A et al (1994) All five cloned human somatostatin receptors (hSSTR1–5) are functionally coupled to adenylyl cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* 198:605–612
- Paterson DS, Trachtenberg FL, Thompson EG, Belliveau RA, Beggs AH, Darnall R, Chadwick AE, Krous HF, Kinney HC (2006) Multiple serotonergic brainstem abnormalities in sudden infant death syndrome. *JAMA* 296:2124-2132.
- Paton JF, Abdala APL, Koizumi H, Smith JC, St-John W (2006). *Nature Neurosci.* 9: 311-313.
- Pearson T, Frenguelli BG (2004) Adrenoceptor subtype-specific acceleration of the hypoxic depression of excitatory synaptic transmission in area CA1 of the rat hippocampus. *Eur J Neurosci.* 2004 (6):1555-65.
- Pedersen ME, Dorrington KL, Robbins PA (1999) Effects of somatostatin on the control of breathing in humans. *J Physiol* 521 Pt 1:289-297.
- Peineau S, Potier B, Petit F, Dournaud P, Epelbaum J, Gardette R (2003) AMPA-sst2 somatostatin receptor interaction in rat hypothalamus requires activation of NMDA and/or metabotropic glutamate receptors and depends on intracellular calcium. *J. Physiol.* 546: 101–117.
- Peña F (2008) Contribution of pacemaker neurons to respiratory rhythms generation in vitro. *Adv Exp Med Biol* 605:114-118.
- Peña F (2009) Neuronal network properties underlying the generation of gasping. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 36:1218-1228.
- Peña F, Aguilera MA (2007) Effects of riluzole and flufenamic acid on eupnea and gasping of neonatal mice in vivo. *Neurosci Lett* 415:288-293.
- Peña F, Alavez-Pérez N (2006) Epileptiform activity induced by pharmacologic reduction of M-current in the developing hippocampus in vitro. *Epilepsia* 47:47-54.
- Peña F, García O (2006) Breathing generation and potential pharmacotherapeutic approaches to central respiratory disorders. *Curr Med Chem* 13:2681-2693.
- Peña F, Meza-Andrade R, Pérez-Zayas V, González-Marín MC (2008) Gasping generation in developing Swiss-Webster mice in vitro and in vivo. *Neurochem Res* 33:1492-1500.
- Peña F, Ordaz B, Balleza-Tapia H, Bernal-Pedraza R, Márquez-Ramos A, Carmona-Aparicio L, Giordano M (2010) Beta-amyloid protein (25-35) disrupts hippocampal network activity: role of Fyn-kinase. *Hippocampus* 20:78-96.
- Peña F, Parkis MA, Tryba AK, Ramirez JM (2004) Differential contribution of pacemaker properties to the generation of respiratory rhythms during normoxia and hypoxia. *Neuron* 43:105-117.
- Peña F, Ramirez JM (2002) Endogenous activation of serotonin-2A receptors is required for respiratory rhythm generation in vitro. *J Neurosci* 22:11055-11064.

- Peña F, Ramirez JM (2004) Substance P mediated modulation of pacemaker properties in the mammalian respiratory network. *J. Neurosci.* 24:7549–7556.
- Peña F, Ramirez JM (2005) Hypoxia-induced changes in neuronal network properties. *Mol Neurobiol* 32:251-283.
- Perry MD, Sandle GI (2009) Regulation of colonic apical potassium (BK) channels by cAMP and somatostatin. *American journal of physiology* 297:G159-167.
- Pierrefiche O, Bischoff AM, Richter DW, Spyer KM (1997) Hypoxic response of hypoglossal motoneurons in the in vivo cat. *J. Physiol.* 505:785–795.
- Pisarek H, Krupinski R, Kubiak R, Borkowska E, Pawlikowski M, Winczyk K (2011) Differential expression of somatostatin receptor subtype-related genes and proteins in non-functioning and functioning adrenal cortex adenomas. *Mol Med Report* 4:963-969.
- Pittaluga A, Bonfanti A, Raiteri M (2000) Somatostatin potentiates NMDA receptor function via activation of InsP(3) receptors and PKC leading to removal of the Mg(2+) block without depolarization. *Br J Pharmacol.* 130(3):557-66.
- Piwko C, Thoss VS, Probst A, Hoyer D (1996) Localization and pharmacological characterization of somatostatin recognition sites in the human cerebellum. *Neuropharmacology.* 35(6):713-23.
- Plant LD, Kemp PJ, Peers C, Henderson Z, Pearson HA (2002) Hypoxic depolarization of cerebellar granule neurons by specific inhibition of TASK-1. *Stroke* 33:2324–2328.
- Poets CF, Meny RG, Chobanian MR, Bonofiglio RE (1999) Gasping and other cardiorespiratory patterns during sudden infant deaths. *Pediatric research* 45:350-354.
- Porkka-Heiskanen T, Strecker RE, Thakkar M, Bjorkum AA, Greene RW, McCarley RW (1997) Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness. *Science* 276:1265–1268.
- Pradayrol L, Jörnvall H, Mutt V, Ribet A (1980) N-terminally extended somatostatin: the primary structure of somatostatin-28. *FEBS Lett* 109:55-58.
- Ptak K, Yamanishi T, Aungst J, Milesu LS, Zhang R, Richerson GB, Smith JC (2009) Raphe neurons stimulate respiratory circuit activity by multiple mechanisms via endogenously released serotonin and substance P. *J Neurosci* 29:3720-3737.
- Putnam RW (2001) Intracellular pH regulation of neurons in chemosensitive and nonchemosensitive areas of brain slices. *Respir Physiol* 129:37-56.
- Qiu C, Zeyda T, Johnson B, Hochgeschwender U, de Lecea L, Tallent MK (2008) Somatostatin receptor subtype 4 couples to the M-current to regulate seizures. *J Neurosci* 28:3567-3576.
- Rakovska A, Javitt D, Raichev P, Ang R, Balla A, Aspromonte J, Vizi S (2002) Physiological release of striatal acetylcholine (in vivo): effect of somatostatin on dopaminergic-cholinergic interaction. *Brain Res Bull.* 61(5):529-36.
- Ramírez JL, Mouchantaf R, Kumar U, Otero Corchon V, Rubinstein M, Low MJ, Patel YC (2002) Brain somatostatin receptors are up-regulated in somatostatin-deficient mice. *Mol Endocrinol.* 16(8):1951-63.
- Ramirez JM, Folkow LP, Blix AS (2007) Hypoxia tolerance in mammals and birds: from the wilderness to the clinic. *Annu Rev Physiol* 69:113-143.

- Ramirez JM, Koch H, Garcia AJ 3rd, Doi A, Zanella S (2011) The role of spiking and bursting pacemakers in the neuronal control of breathing. *J Biol Phys.* (3):241-61. Epub 2011 Mar 22.
- Ramirez JM, Lieske SP (2003) Commentary on the definition of eupnea and gasping. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 139:113–119.
- Ramirez JM, Quellmalz UJ, Richter DW (1996) Postnatal changes in the mammalian respiratory network as revealed by the transverse brainstem slice of mice. *J. Physiol.* 491:799–812.
- Ramirez JM, Quellmalz UJ, Wilken B, Richter DW (1998a) The hypoxic response of neurones within the in vitro mammalian respiratory network. *J Physiol* 507 (Pt 2):571-582.
- Ramirez JM, Richter DW (1996) The neuronal mechanisms of respiratory rhythm generation. *Curr Opin Neurobiol* 6:817-825.
- Ramirez JM, Schwarzacher SW, Pierrefiche O, Olivera BM, Richter DW (1998b) Selective lesioning of the cat pre-Bötzing complex in vivo eliminates breathing but not gasping. *J Physiol* 507 (Pt 3):895-907.
- Ramirez JM, Telgkamp P, Elsen FP, Quellmalz UJ, Richter DW (1997) Respiratory rhythm generation in mammals: synaptic and membrane properties. *Respir Physiol* 110:71-85.
- Ramirez JM, Tryba AK, Peña F (2004) Pacemaker neurons and neuronal networks: an integrative view. *Curr Opin Neurobiol* 14:665-674.
- Ramírez-Jarquín JO, Lara-Hernández S, López-Guerrero JJ, Aguilera MA, Rivera-Angulo AJ, Sampieri A, Vaca L, Ordaz B, Peña-Ortega F (2012) Somatostatin modulates generation of inspiratory rhythms and determines asphyxia survival. *Peptides.* 34(2):360-72. Epub 2012 Feb 24.
- Raynor K, Lucki I, Reisine T (1993) Somatostatin receptors in the nucleus accumbens selectively mediate the stimulatory effect of somatostatin on locomotor activity in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 265:67-73.
- Raynor K, Wang HL, Dichter M, Reisine T (1991) Subtypes of brain somatostatin receptors couple to multiple cellular effector systems. *Mol Pharmacol* 40:248-253.
- Reichlin S (1983a) Somatostatin (second of two parts). *N Engl J Med* 309:1556-1563.
- Reichlin S (1983b) Somatostatin. *N Engl J Med* 309:1495-1501.
- Reisine T, Bell GI (1995a) Molecular properties of somatostatin receptors. *Neuroscience* 67:777-790.
- Reisine T, Bell GI (1995b) Molecular biology of somatostatin receptors. *Endocr Rev* 16:427-442.
- Reikling JC, Feldman JL (1998) PreBötzing complex and pacemaker neurons: hypothesized site and kernel for respiratory rhythm generation. *Annu Rev Physiol* 60:385-405.
- Ren J, Ding X, Greer JJ (2011) PreBotzinger complex neurokinin-1 receptor-expressing neurons mediate opioid-induced respiratory depression. *J Neurosci.* 31(4):1292-301.
- Ribalet B, Eddlestone GT (1995) Characterization of the G protein coupling of a somatostatin receptor to the K<sup>+</sup>-ATP channel in insulin-secreting mammalian HIT and RIN cell lines. *J Physiol* 485 ( Pt 1):73-86.
- Richter DW (1996) Neural Regulation of Respiration: Rhythmogenesis and Afferent Control. *Comprehensive Human Physiology: From Cellular Mechanism to Integration* (Greger R., Windhorst U, eds): pp. 2079–2095, Springer-Verlag
- Richter DW, Ballanyi K, Schwarzacher S (1992) Mechanisms of respiratory rhythm generation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2: 788–793

- Richter DW, Bischoff A, Anders K, Bellingham M, Windhorst U (1991) Response of the medullary respiratory network of the cat to hypoxia. *J. Physiol.* 443: 231–256.
- Richter DW, Bischoff A, Anders K, Bellingham M, Windhorst U (1991) Response of the medullary respiratory network of the cat to hypoxia. *J Physiol* 443:231-256.
- Richter DW, Mironov SL, Büsselberg D, Lalley PM, Bischoff AM, Wilken B (2000) Respiratory rhythm generation: Plasticity of a neuronal network. *Neuroscientist* 6: 181-198.
- Richter DW, Schmidt-Garcon P, Pierrefiche O, Bischoff AM, Lalley PM (1999) Neurotransmitters and neuromodulators controlling the hypoxic respiratory response in anaesthetized cats. *J. Physiol.* 514:567–578.
- Richter DW, Spyer KM (2001) Studying rhythmogenesis of breathing: comparison of in vivo and in vitro models. *Trends Neurosci* 24:464-472.
- Robbins RJ, Brines ML, Kim JH, Adrian T, de Lanerolle N, Welsh S, Spencer DD (1991) A selective loss of somatostatin in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 29:325-332.
- Rosen AS, Morris ME (1993) Anoxic depression of excitatory and inhibitory postsynaptic potentials in rat neocortical slices. *J. Neurophysiol.* 69:109–117.
- Rossen R, Kabat H, Anderson JP (1943) Acute arrest of cerebral circulation in man. *Arch. Neurol. Psych.* 50: 510–528.
- Rubin JE, Hayes JA, Mendenhall JL, Del Negro CA (2009) Calcium-activated nonspecific cation current and synaptic depression promote network-dependent burst oscillations. *Proc. Natl. Acad. SciUSA* 106(8): 2939–2944.
- Ruigrok TJ (1997) Cerebellar nuclei: the olivary connection. *Progress in brain research* 114:167-192.
- Saha S, Henderson Z, Batten TF (2002) Somatostatin immunoreactivity in axon terminals in rat nucleus tractus solitarius arising from central nucleus of amygdala: coexistence with GABA and postsynaptic expression of sst2A receptor. *Journal of chemical neuroanatomy* 24:1-13.
- Schernthaner A, Lendl CE, Hartmann K, Pragst I, Preissel AK, Henke J (2011) Medetomidine/midazolam/ketamine anaesthesia in ferrets: effects on cardiorespiratory parameters and evaluation of plasma drug concentrations. *Vet Anaesth Analg.* 38(5):439-50.
- Schettini G (1991) Brain somatostatin: receptor-coupled transducing mechanisms and role in cognitive functions. *Pharmacol Res* 23:203-215.
- Schloos J, Raulf F, Hoyer D, Bruns C (1997) Identification and pharmacological characterization of somatostatin receptors in rat lung. *Br J Pharmacol.* 121(5):963-71.
- Schreff M, Schulz S, Handel M, Keilhoff G, Braun H, Pereira G, Klutzny M, Schmidt H, Wolf G, Höllt V (2000). Distribution, targeting, and internalization of the sst4 somatostatin receptor in rat brain. *J. Neurosci.* 20:3785–3797.
- Schulz S, Händel M, Schreff M, Schmidt H, Höllt V (2000) Localization of five somatostatin receptors in the rat central nervous system using subtype-specific antibodies. *J Physiol Paris* 94:259-264.
- Schulz S, Händel M, Schreff M, Schmidt H, Höllt V (2000) Localization of five somatostatin receptors in the rat central nervous system using subtype-specific antibodies. *J Physiol Paris.* 94(3-4):259-64.
- Schwarzacher SW, Rüb U, Deller T (2011) Neuroanatomical characteristics of the human pre-Bötzinger complex and its involvement in neurodegenerative brainstem diseases. *Brain* 134:24-35.

- Schwarzacher SW, Smith JC, Richter DW (1995) Pre-Bötzinger complex in the cat. *J Neurophysiol* 73(4):1452-61.
- Schweitzer P, Madamba S, Champagnat J, Siggins GR (1993) Somatostatin inhibition of hippocampal CA1 pyramidal neurons: mediation by arachidonic acid and its metabolites. *J Neurosci* 13:2033-2049.
- Schweitzer P, Madamba S, Siggins GR (1990) Arachidonic acid metabolites as mediators of somatostatin-induced increase of neuronal M-current. *Nature* 346:464-467.
- Schweitzer P, Madamba SG, Siggins GR (1998) Somatostatin increases a voltage-insensitive K<sup>+</sup> conductance in rat CA1 hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 79:1230-1238.
- Selmer I, Schindler M, Allen JP, Humphrey PP, Emson PC (2000) Advances in understanding neuronal somatostatin receptors. *Regul Pept* 90:1-18.
- Señaris RM, Schindler M, Humphrey PP, Emson PC (1995) Expression of somatostatin receptor 3 mRNA in the motoneurons of the rat spinal cord, and the sensory neurons of the spinal ganglia. *Brain Res Mol Brain Res* 29:185-190.
- Shan HQ, Cheng JS (2000) Effect of adenosine on adenosine triphosphate-sensitive potassium channel during hypoxia in rat hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* 286:45-48.
- Shao XM, Feldman JL (1997) Respiratory rhythm generation and synaptic inhibition of expiratory neurons in pre-Bötzinger complex: differential roles of glycinergic and GABAergic neural transmission. *J Neurophysiol* 77:1853-1860.
- Shao XM, Feldman JL (2000) Acetylcholine modulates respiratory pattern: effects mediated by M3-like receptors in preBötzinger complex inspiratory neurons. *J Neurophysiol.* (3):1243-52.
- Shao XM, Feldman JL (2005) Cholinergic neurotransmission in the preBötzinger Complex modulates excitability of inspiratory neurons and regulates respiratory rhythm. *Neuroscience* 130(4):1069-81.
- Shapiro MS, Hille B (1993) Substance P and somatostatin inhibit calcium channels in rat sympathetic neurons via different G protein pathways. *Neuron* 10:11-20.
- Shapiro MS, Wollmuth LP, Hille B (1994) Modulation of Ca<sup>2+</sup> channels by PTX-sensitive G-proteins is blocked by N-ethylmaleimide in rat sympathetic neurons. *J Neurosci* 14:7109-7116.
- Shen L, Duffin J (2002) Caudal expiratory neurones in the rat. *Pflugers Arch* 444:405-410.
- Smith JC, Abdala AP, Rybak IA, Paton JF (2009) Structural and functional architecture of respiratory networks in the mammalian brainstem. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364: 2577-2587
- Smith JC, Butera RJ, Koshiya N, Del Negro C, Wilson CG, Johnson SM (2000) Respiratory rhythm generation in neonatal and adult mammals: the hybrid pacemaker-network model. *Respir Physiol* 122:131-147.
- Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW, Feldman JL (1991) Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* 254:726-729.
- Solomon IC (2004) Ionotropic excitatory amino acid receptors in pre-Botzinger complex play a modulatory role in hypoxia-induced gasping in vivo. *J. Appl. Physiol.* 96:1643-1650.
- Solomon IC (2005) Glutamate neurotransmission is not required for, but may modulate, hypoxic sensitivity of pre-Botzinger complex in vivo. *J. Neurophysiol.* 93:1278-1284.
- Sosulina L, Meis S, Seifert G, Steinhäuser C, Pape HC (2006) Classification of projection neurons and interneurons in the rat lateral amygdala based upon cluster analysis. *Mol Cell Neurosci.* 33(1):57-67.



- Spary EJ, Maqbool A, Batten TF (2008) Expression and localisation of somatostatin receptor subtypes sst1-sst5 in areas of the rat medulla oblongata involved in autonomic regulation. *Journal of chemical neuroanatomy* 35:49-66.
- Sridhar R, Thach BT, Kelly DH, Henslee JA (2003) Characterization of successful and failed autoresuscitation in human infants, including those dying of SIDS. *Pediatr Pulmonol* 36:113-122.
- St-John WM (1998) Neurogenesis of patterns of automatic ventilatory activity. *Progress in neurobiology* 56:97-117.
- Storm JF (1990) Potassium currents in hippocampal pyramidal cells. *Prog Brain Res.* 83:161-87.
- Stornetta RL, Rosin DL, Wang H, Sevigny CP, Weston MC, Guyenet PG (2003) A group of glutamatergic interneurons expressing high levels of both neurokinin-1 receptors and somatostatin identifies the region of the pre-Bötzinger complex. *J Comp Neurol* 455:499-512.
- Strittmatter M, Hamann GF, Strubel D, Cramer H, Schimrigk K (1996) Somatostatin-like immunoreactivity, its molecular forms and monoaminergic metabolites in aged and demented patients with Parkinson's disease--effect of L-Dopa. *J Neural Transm* 103:591-602.
- Stroh T, Kreienkamp HJ, Beaudet, A (1999) Immunohistochemical distribution of the somatostatin receptor subtype 5 in the adult rat brain: predominant expression in the basal forebrain. *J. Comp. Neurol.* 412: 69–82.
- Stroh T, Sarret P, Tannenbaum GS, Beaudet A (2006) Immunohistochemical distribution and subcellular localization of the somatostatin receptor subtype 1 (sst1) in the rat hypothalamus. *Neurochem. Res.* 31:247–257.
- Strowbridge BW, Bean AJ, Spencer DD, Roth RH, Shepherd GM, Robbins RJ (1992) Low levels of somatostatin-like immunoreactivity in neocortex resected from presumed seizure foci in epileptic patients. *Brain Res* 587:164-168.
- Sun J, Kapur J (2012) M-type potassium channels modulate Schaffer-collateral CA1 glutamatergic synaptic transmission. *J Physiol.* 2012 Jul 9. [Epub ahead of print]
- Sun QQ, Huguenard JR, Prince DA (2002) Somatostatin inhibits thalamic network oscillations in vitro: actions on the GABAergic neurons of the reticular nucleus. *J Neurosci* 22:5374-5386.
- Takashima S, Mito T, Yamanouchi H (1994) Developmental brain-stem pathology in sudden infant death syndrome. *Acta Paediatr Jpn* 36:317-320.
- Takeda S, Eriksson LI, Yamamoto Y, Joensen H, Onimaru H, Lindahl SG (2001) Opioid action on respiratory neuron activity of the isolated respiratory network in newborn rats. *Anesthesiology.* 95:740–749.
- Tallent MK, Qiu C (2008) Somatostatin: an endogenous antiepileptic. *Molecular and cellular endocrinology* 286:96-103.
- Tallent MK, Reisine T (1992) Gi alpha 1 selectively couples somatostatin receptors to adenylyl cyclase in pituitary-derived AtT-20 cells. *Mol Pharmacol* 41:452-455.
- Tallent MK, Siggins GR (1997) Somatostatin depresses excitatory but not inhibitory neurotransmission in rat CA1 hippocampus. *J Neurophysiol* 78:3008-3018.
- Tallent MK, Siggins GR (1999) Somatostatin acts in CA1 and CA3 to reduce hippocampal epileptiform activity. *J Neurophysiol* 81:1626-1635.

- Tan W, Janczewski WA, Yang P, Shao XM, Callaway EM, Feldman JL (2008) Silencing preBötzinger complex somatostatin-expressing neurons induces persistent apnea in awake rat. *Nat Neurosci.* (5):538-40. Epub 2008 Apr 6.
- Telgkamp P, Cao YQ, Basbaum AI, Ramirez JM (2002) Long-term deprivation of substance P in PPT-A mutant mice alters the anoxic response of the isolated respiratory network. *J Neurophysiol* 88:206-213.
- Telgkamp P, Ramirez JM (1999) Differential responses of respiratory nuclei to anoxia in rhythmic brain stem slices of mice. *J. Neurophysiol.* 82:2163–2170.
- Thach BT (1983) The role of pharyngeal airway obstruction in prolonging infantile apneic spells. In: *Sudden Infant Death Syndrome*, edited by Tildon JT, Roeder LM, Steinschneider A. New York: Academic. 279–292.
- Thach BT (2005) The role of respiratory control disorders in SIDS. *Respir Physiol Neurobiol* 149:343-353.
- Thach BT (2008) Some aspects of clinical relevance in the maturation of respiratory control in infants. *J Appl Physiol.* 104(6):1828-34. Epub 2008 Apr 17.
- Thermos K, Bagnoli P, Epelbaum J, Hoyer D,(2006). The somatostatin sst1 receptor: an autoreceptor for somatostatin in brain and retina? *Pharmacol. Ther.* 110:455–464.
- Thoby-Brisson M, Ramirez JM (2000) Role of inspiratory pacemaker neurons in mediating the hypoxic response of the respiratory network in vitro. *J Neurosci* 20:5858-5866.
- Thoby-Brisson M, Ramirez JM (2000) Role of inspiratory pacemaker neurons in mediating the hypoxic response of the respiratory network in vitro. *J. Neurosci.* 20:5858–5866.
- Thoby-Brisson M, Ramirez JM (2001) Identification of two types of inspiratory pacemaker neurons in the isolated respiratory neural network of mice. *J Neurophysiol* 86:104-112.
- Thoby-Brisson M, Trinh JB, Champagnat J, Fortin G (2005) Emergence of the pre-Bötzinger respiratory rhythm generator in the mouse embryo. *J Neurosci* 25:4307-4318.
- Trés Guerres JAF (1999) *Fisiología humana*. Madrid. McGraw-Hill.
- Triggler DJ (2006) L-type calcium channels. *Curr Pharm Des.* 12(4): 443-57.
- Tryba AK, Peña F, Lieske SP, Viemari JC, Thoby-Brisson M, Ramirez JM (2008) Differential modulation of neural network and pacemaker activity underlying eupnea and sigh-breathing activities. *J Neurophysiol* 99:2114-2125.
- Tryba AK, Peña F, Ramirez JM (2003) Stabilization of bursting in respiratory pacemaker neurons. *J Neurosci* 23:3538-3546.
- Tryba AK, Peña F, Ramirez JM (2006) Gasping activity in vitro: a rhythm dependent on 5-HT<sub>2A</sub> receptors. *J Neurosci* 26:2623-2634.
- van de Nes JA, Sandmann-Keil D, Braak H (2002) Interstitial cells subjacent to the entorhinal region expressing somatostatin-28 immunoreactivity are susceptible to development of Alzheimer's disease-related cytoskeletal changes. *Acta Neuropathol* 104:351-356.
- Van Drongelen W, Koch H, Marcuccilli C, Peña F, Ramirez JM (2003) Synchrony levels during evoked seizure-like bursts in mouse neocortical slices. *J Neurophysiol*, 90: 1571-1580.
- Vezzani A, Hoyer D (1999) Brain somatostatin: a candidate inhibitory role in seizures and epileptogenesis. *Eur J Neurosci* 11:3767-3776.

- Viana F, Hille B (1996) Modulation of high voltage-activated calcium channels by somatostatin in acutely isolated rat amygdaloid neurons. *J Neurosci* 16:6000-6011.
- Videau C, Hochgeschwender U, Kreienkamp HJ, Brennan MB, Viollet C, Richter D, Epelbaum J (2003) Characterisation of [<sup>125</sup>I]-Tyr<sup>0</sup>DTrp<sup>8</sup>-somatostatin binding in sst1- to sst4- and SRIF-gene-invalidated mouse brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 367:562-571.
- Viemari JC, Bévangut M, Burnet H, Coulon P, Pequignot JM, Tiveron MC, Hilaire G (2004) Phox2a gene, A6 neurons, and noradrenaline are essential for development of normal respiratory rhythm in mice. *J Neurosci* 24:928-937.
- Viemari JC, Garcia AJ, 3rd, Doi A, Ramirez JM (2011) Activation of alpha-2 noradrenergic receptors is critical for the generation of fictive eupnea and fictive gasping inspiratory activities in mammals in vitro. *Eur J Neurosci* 33:2228-2237.
- Vilchis C, Bargas J, Pérez-Roselló T, Salgado H, Galarraga E (2002) Somatostatin modulates Ca<sup>2+</sup> currents in neostriatal neurons. *Neuroscience* 109:555-567.
- Viollet C, Lepousez G, Loudes C, Videau C, Simon A, Epelbaum J (2008) Somatostatinergetic systems in brain: networks and functions. *Molecular and cellular endocrinology* 286:75-87.
- Vlemincx E, Taelman J, Van Diest I, Van den Bergh O (2010b) Take a deep breath: the relief effect of spontaneous and instructed sighs. *Physiol Behav.* 101(1):67-73. Epub 2010 Apr 24.
- Vlemincx E, Van Diest I, De Peuter S, Bresseleers J, Bogaerts K, Fannes S, Li W, Van Den Bergh O (2009) Why do you sigh? Sigh rate during induced stress and relief. *Psychophysiology.* 1005-13. Epub 2009 May 21.
- Vlemincx E, Van Diest I, Lehrer PM, Aubert AE, Van den Bergh O (2010a) Respiratory variability preceding and following sighs: a resetter hypothesis. *Biol Psychol.* 2010 Apr;84(1):82-7. Epub 2009 Sep 8.
- Volker A, Ballanyi K, Richter DW (1995) Anoxic disturbance of the isolated respiratory network of neonatal rats. *Exp. Brain Res.* 103:9-19.
- Wang HL, Bogen C, Reisine T, Dichter M (1989) Somatostatin-14 and somatostatin-28 induce opposite effects on potassium currents in rat neocortical neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9616-9620.
- Wang HL, Reisine T, Dichter M (1990) Somatostatin-14 and somatostatin-28 inhibit calcium currents in rat neocortical neurons. *Neuroscience* 38:335-342.
- Wang YJ, Sung RJ, Lin MW, Wu SN. (2006) Contribution of BK(Ca)-channel activity in human cardiac fibroblasts to electrical coupling of cardiomyocytes-fibroblasts. *J Membr Biol.* 213(3):175-85.
- Waters KA, Meehan B, Huang JQ, Gravel RA, Michaud J, Côté A (1999) Neuronal apoptosis in sudden infant death syndrome. *Pediatric research* 45:166-172.
- Watson TW, Pittman QJ (1988) Pharmacological evidence that somatostatin activates the m-current in hippocampal pyramidal neurons. *Neurosci Lett* 91:172-176.
- Weese-Mayer DE, Berry-Kravis EM, Maher BS, Silvestri JM, Curran ME, Marazita ML (2003a) Sudden infant death syndrome: association with a promoter polymorphism of the serotonin transporter gene. *Am J Med Genet A* 117A:268-274.
- Weese-Mayer DE, Rand CM, Berry-Kravis EM, Jennings LJ, Loghmanee DA, Patwari PP, Ceccherini I (2009). Congenital central hypoventilation syndrome from past to future: model for translational and transitional autonomic medicine. *Pediatr Pulmonol.* 44 (6): 521-35.

- Weese-Mayer DE, Zhou L, Berry-Kravis EM, Maher BS, Silvestri JM, Marazita ML (2003b) Association of the serotonin transporter gene with sudden infant death syndrome: a haplotype analysis. *Am J Med Genet A* 122A:238-245.
- Wenninger JM, Pan LG, Klum L, Leekley T, Bastastic J, Hodges MR, Feroah TR, Davis S, Forster HV (2004a) Large lesions in the pre-Bötzinger complex area eliminate eupneic respiratory rhythm in awake goats. *J Appl Physiol* 97:1629-1636.
- Wenninger JM, Pan LG, Klum L, Leekley T, Bastastic J, Hodges MR, Feroah T, Davis S, Forster HV (2004b) Small reduction of neurokinin-1 receptor-expressing neurons in the pre-Bötzinger complex area induces abnormal breathing periods in awake goats. *J Appl Physiol* 97:1620-1628.
- White RE, Schonbrunn A, Armstrong DL (1991) Somatostatin stimulates Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels through protein dephosphorylation. *Nature* 351:570-573.
- Willinger M, James LS, Catz C (1991) Defining the sudden infant death syndrome (SIDS): deliberations of an expert panel convened by the National Institute of Child Health and Human Development. *Pediatr Pathol.* 11 (5): 677-84.
- Wong-Riley MT, Liu Q (2005) Neurochemical development of brain stem nuclei involved in the control of respiration. *Respir Physiol Neurobiol* 149:83-98.
- Yamada K, Ji JJ, Yuan H, Miki T, Sato S, Horimoto N, Shimizu T, Seino S, Inagaki N (2001) Protective role of ATP-sensitive potassium channels in hypoxia-induced generalized seizure. *Science.* 292:1543–1546.
- Yamamoto S, Tanaka E, Shoji Y, Kudo Y, Inokuchi H, Higashi H (1997) Factors that reverse the persistent depolarization produced by deprivation of oxygen and glucose in rat hippocampal CA1 neurons in vitro. *J Neurophysiol.* 78:903–911.
- Yamamoto Y, Runold M, Prabhakar N, Pantaleo T, Lagercrantz H (1988) Somatostatin in the control of respiration. *Acta physiologica Scandinavica* 134:529-533.
- Yin H, Lee KE, Park SA, Bhattarai JP, Suh BJ, Jeon JG, Kim BG, Park SJ, Han SK (2009) Inhibitory effects of somatostatin on the substantia gelatinosa neurons of trigeminal subnucleus caudalis via somatostatin type 2 receptors in juvenile mice. *Brain Res.* 22;1304:49-56. Epub 2009 Sep 24.
- Yoneda M, Raybould H, Taché Y (1991) Central action of somatostatin analog, SMS 201-995, to stimulate gastric acid secretion in rats. *Peptides* 12:401-406.
- Young JN, Somjen GG (1992) Suppression of presynaptic calcium currents by hypoxia in hippocampal tissue slices. *Brain Res:* 21: 70–76.
- Zavala-Tecuapetla C (2008) Caracterización morfológica y funcional de los subgrupos de neuronas del Complejo pre-Bötzinger involucrados en la generación del ritmo respiratorio. Tesis de Doctorado. CINVESTAV-IPN.
- Zavala-Tecuapetla C, Aguilera MA, López-Guerrero JJ, González-Marín MC, Peña F (2008) Calcium-activated potassium currents differentially modulate respiratory rhythm generation. *Eur J Neurosci* 27:2871-2884.
- Zawar C, Neumcke B (2000) Differential activation of ATP-sensitive potassium channels during energy depletion in CA1 pyramidal cells and interneurons of rat hippocampus. *Pflugers Arch.* 439:256–262.
- Zeyda T, Diehl N, Paylor R, Brennan MB, Hochgeschwender U (2001) Impairment in motor learning of somatostatin null mutant mice. *Brain Res* 906:107-114.

- Zheng H, Bailey A, Jiang MH, Honda K, Chen HY, Trumbauer ME, Van der Ploeg LH, Schaeffer JM, Leng G, Smith RG (1997) Somatostatin receptor subtype 2 knockout mice are refractory to growth hormone-negative feedback on arcuate neurons. *Mol Endocrinol* 11:1709-1717.
- Zheng Y, Riche D, Rekling JC, Foutz AS, Denavit-Saubié M (1998) Brainstem neurons projecting to the rostral ventral respiratory group (VRG) in the medulla oblongata of the rat revealed by co-application of NMDA and biocytin. *Brain Res* 782:113-125.
- Ziegler DR, Cullinan WE, Herman JP (2002) Distribution of vesicular glutamatetransporter mRNA in rat hypothalamus. *J Comp Neurol* 448: 217–229.