



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM, CAMPUS JURQUILLA

MODULACIÓN DE LA FACILITACIÓN DE LARGA DURACIÓN POR LA MICROGLÍA

PROYECTO DE TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGIA)

PRESENTA:
NEIRA POLET CAMACHO HERNÁNDEZ

TUTOR:
DR. JOSÉ FERNANDO PEÑA ORTEGA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, UNAM, CAMPUS JURQUILLA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE NEUROBIOLOGÍA DEL DESARROLLO Y NEUROFISIOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. STÉPHANIE COLETTE THÉBAULT
UNAM, JURQUILLA, INB, DEPARTAMENTO DE NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y
MOLECULAR

DR. MANUEL MIRANDA ANAYA
UNAM, JURQUILLA, UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE DOCENCIA E
INVESTIGACIÓN

JURQUILLA, QUERÉTARO, 28 DE JULIO DE 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Tesis realizada en el laboratorio de Circuitos Neuronales, perteneciente al Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutela del Dr. Fernando Peña. Becaria CONACYT No. 422050. Además, contó con los financiamientos CONACyT No. 117, 235789, 237570, 246888 y 181323, de la DGAPA-UNAM con el proyecto No. IN200715 y la Cátedra Marcos Moshinsky.

La vida no es fácil para ninguno de nosotros. ¿Pero qué hay con eso? Tenemos que tener perseverancia y, sobre todo, confianza en nosotros mismos.

Marie Curie

Education is not the learning of facts, but the training of minds to think.
Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

A MIS PADRES

Perla y Ramiro

Por apoyarme en cada paso de mi vida, por estar a mi lado incondicionalmente, quererme de esa forma tan particular, por ser la base de lo que soy y seré, por todo el amor, cariño y sus buenos consejos, los amo.

A MIS HERMANOS

Rubí, Fernanda y Aarón

Quienes siempre me apoyan y están en cada momento importante, los quiero, malditos.

A MIS AMIGOS DE VIDA

Francisca, Alejandra y Pablo

Quienes, pese al tiempo y la distancia, permanecen siempre a mi lado, alentándome a seguir adelante. Saben que llevo una parte de cada uno de ustedes en mi persona.

A MIS AMIGOS DE SIEMPRE

Alicia, Lupita y Servando

Que siempre me han apoyado y han estado ahí desde lejos cada vez que los necesito, ya sea para reír, llorar, y otras enojarnos.

A LOS HOMITOS

El JJ, el W, Scott, El Ricardillo, Lalo, Ellis, La Laurita Garza, el Txupi, el Zito, El Kalucha, el Alim e Iván.

Gracias por todas las pláticas y estupideces que dicen a diario y que me han mantenido con un buen ánimo y humor durante estos dos años, los quiero, malditos insectos y ¡que viva la revolución!

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DEL LAB

El Benja, el Jon, el Josué, el Benito, Rebeca y Keila, el Chema, Karlita, el Arturo, Victor, Lupita, Ernesto y todos los del C01, porque todos me han enseñado algo.

AL DR. PEÑA

Por todo su apoyo durante el desarrollo de este proyecto de maestría, por su personalidad relajada que hace que las cosas marchen de forma simple, y esa pasión que comparte por la investigación con sus alumnos

A LOS MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

La Dra. Thebault, y el Dr. Miranda, por sus comentarios objetivos y críticos durante cada tutorial, así como las observaciones realizadas al trabajo final.

Al MVZ. José Martín García Servín y a la Dra. Alejandra Castillo León del Bioterio del Instituto de Neurobiología, por la atención y el cuidado brindado a los animales.

A la UNAM, y al CONACYT

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
INTRODUCCIÓN	12
ANTECEDENTES	15
2.1- La respiración	15
2.2- El Complejo Pre-Bötzinger (CPB).....	17
2.3- Respuesta del CPB ante la hipoxia	21
2.3.1- <i>La facilitación de larga duración (LTF)</i>	25
2.3.2- <i>Las condiciones inflamatorias que modifican la LTF</i>	27
2.4 - Inflamación en el sistema nervioso central	30
2.5- La microglía	33
2.5.1- <i>Comunicación de la microglía con su entorno y con otros tipos celulares del SNC</i>	37
2.5.2- <i>Activación de la microglía</i>	40
2.5.3- <i>Receptor CX3CR1</i>	41
JUSTIFICACIÓN	45
4- HIPÓTESIS	46
5- OBJETIVOS	46
5.1- Objetivos específicos.....	46
6- MATERIALES Y MÉTODOS	47
6.1- Animales.....	47
6.2- Registros in vitro	47
6.2.1- <i>Activación de la microglía</i>	48
6.2.1.1- <i>Activación optogenética de la microglía</i>	48
6.2.1.2- <i>Activación de la microglía con LPS</i>	49
6.2.2- <i>Eliminación de la microglía con clodronato liposomal</i>	51
7- Análisis de datos	52
8- RESULTADOS.....	54
8.1- Registro control	54
8.2- Inducción de la LTF en respuesta a la HI	55
8.3- Efecto de la activación optogenética de la microglía en la actividad del CPB ..	56
8.4- Respuesta del CPB ante la HI después de la activación optogenética	57
8.5- Actividad basal del CPB en un modelo transgénico carente del CX3CR1	59
8.6- Respuesta del CPB ante la HI en los modelos de ratones transgénicos CX3CR1 ^{-/-} y CX3CR1 ^{-/+}	60
8.7- Efecto del LPS sobre la actividad basal del CPB	62
8.8- Respuesta del CPB ante la HI cuando la microglía es activada con LPS	63
8.9- Efecto del clodronato liposomal sobre la actividad basal del generador de la respiración	64
8.10- Respuesta del CPB ante la HI cuando la microglía es eliminada	65
9- DISCUSIÓN	67
10- CONCLUSIONES	74

11- BIBIOGRAFÍA	75
13- LISTA DE FIGURAS	91

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT	Proteína quinasa B (por su abreviatura alternativa en inglés)
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
AQP4	Acuaporina 4 (por sus siglas en inglés)
AQP4 KO	Animal carente (<i>knock out</i> , por su denominación en inglés) de la AQP4
ATP	Trifosfato de adenosina (por sus siglas en inglés)
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro (por sus siglas en inglés)
BHE	Barrera hematoencefálica
BrdU+	5-bromo-2-deoxiuridina (por sus siglas en inglés)
C1q	Molécula del complemento C1q
C3b	Molécula del complemento 3b
CD11b	Grupo de diferenciación 11b (por sus siglas en inglés)
CD11b/CD18	Complejo Grupo de diferenciación 11b/ Grupo de diferenciación 11 ó Receptor a la molécula del complemento 3
CD18	Grupo de diferenciación 18 (por sus siglas en inglés)
ChR2	Canalrodopsina 2
ChRs	Canalrodopsinas
CI2MBP	Diclorometilen-bisfosfonato o clodronato
COX-2	Ciclooxygenasa 2 (por sus siglas en inglés)
CR3	Receptor a la molécula del complemento 3
CX3CL1	Ligando 1 para el motivo C-X3-C (por sus siglas en inglés), también llamado fractalquina
CX3CR1	Receptor del CX3CL1, también llamado receptor a fractalquina
CX3CR1^{-/+} CRE	Cepa de animales heterócigotos para la expresión de la recombinasa CRE bajo el control del receptor CX3CR1 y heterócigotamente carentes del receptor CX3CR1
ChR2^{-/+} YFP	ChR2 asociada a la proteína amarilla fluorescente
CX3CR1^{-/-}	Cepa de animales carentes del receptor CX3CR1
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño (por sus siglas en inglés)
DCX+	Células positivas a doblecortina (por sus siglas en inglés)
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares (por sus siglas en inglés)
Fc	Fracción cristalizable (o constante) del receptor para inmunoglobulinas
FKN	Fractalquina (por su abreviatura en inglés)
HI	Hipoxia intermitente
Iba1	Molécula adaptadora de la unión a calcio ionizado 1 (por sus siglas en inglés)

ICE	Enzima convertidora de la IL-1 β (por sus siglas en inglés)
IFN-γ	Interferón gamma
IGF1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (por sus siglas en inglés)
IgG	Inmunoglobulina G
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-1ra	Receptor de interleucina 1
IL-1α	Interleucina 1 alfa
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
INF-γ	Interferón gama
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible (por sus siglas en inglés)
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal (por sus siglas en inglés)
LCRA	Líquido cefalorraquídeo artificial
Lip-CLO	Clodronato Liposomal (por su abreviatura en inglés)
LME	L-Leucina Metil-ester
LPS	Lipopolisacárido
LTD	Depresión de larga duración (por sus siglas en inglés)
LTF	Facilitación de larga duración (por sus siglas en inglés)
LTP	Potenciación de larga duración (por sus siglas en inglés)
MAPK	Quinasa activada por mitógenos
MHC II	Complejo principal de histocompatibilidad tipo II (por sus siglas en inglés)
MPP	1-metil-4-fenilpiridinio
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NBQX	2,3-dihidroxi-6- nitro-7-sulfamoyl-benzo(f) quinoxalina
NK1	Neurokinina 1
NK1R-ir	Inmunorreactividad para el receptor de neurokinina 1 (por sus siglas en inglés)
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOX2	NADPH oxidasa 2
P2Y6	Receptor purinérgico a ATP subtipo 2Y6
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
pLTF	LTF frénica (por sus siglas en inglés)
PSD95	Proteína de la densidad postsináptica-95 (por sus siglas en inglés)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés)

SAOS	Síndrome de apnea obstructiva del sueño
SNAP25	Proteína asociada al sinaptosoma 25 (por sus siglas en inglés)
SNC	Sistema nervioso central
SOCS3	Supresor de la señalización de citoquinas 3 (por sus siglas en inglés)
SOD2	Súper óxido dismutasa 2
SP-SAP	Sustancia P conjugada con saporina
SR-A	Receptor atrapador tipo A (por sus siglas en inglés)
SR-A I	Receptor atrapador tipo A 1 (por sus siglas en inglés)
SR-A II	Receptor atrapador tipo A 2 (por sus siglas en inglés)
SR-MARCO	Receptor atrapador-Receptor de macrófagos con estructura colágeno (por sus siglas en inglés)
SST	Somatostatina
SSTR2	Receptor de somatostatina tipo 2 (por sus siglas en inglés)
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta (por sus siglas en inglés)
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa (por sus siglas en inglés)
UDP	Difosfato de uracilo (por sus siglas en inglés)
UTP	Trifosfato de uracilo (por sus siglas en inglés)

RESUMEN

Las apneas de sueño son una patología común en el neonato y el adulto. Esta patología produce un fenómeno llamado hipoxia intermitente (HI) que es capaz de inducir neuroinflamación, modificar la función de los circuitos neuronales y las conductas asociadas con los mismos. Una de las funciones moduladas por la HI es la respiración. Después de un periodo corto de HI, la respiración sufre un fenómeno plástico llamado facilitación de larga duración (LTF, por sus siglas en inglés), que consiste en un aumento en la amplitud y/o en la frecuencia de los esfuerzos respiratorios que se mantienen por periodos prolongados (decenas de minutos), aún después de que la HI haya cesado. La respiración es generada por un circuito localizado en el tallo cerebral llamado complejo pre-Bötzinger (CPB). El CPB puede ser aislado en una rebanada de tallo cerebral y puede generar una LTF cuando se le aplica HI *in vitro*. Interesantemente, la LTF *in vivo* es inhibida cuando se inducen condiciones pro-inflamatorias periféricas. Debido a que la inflamación periférica activa a la microglía a nivel del sistema nervioso central, en esta tesis nos propusimos caracterizar la inducción de la LTF *in vitro* y evaluar si la activación de la microglía inhibe este fenómeno plástico. Nuestros resultados muestran que la aplicación de HI en rebanadas de tallo cerebral que contienen al CPB induce una LTF del ritmo respiratorio que se caracteriza por un aumento de la frecuencia de las ráfagas inspiratorias acompañado de una disminución de su amplitud. La LTF *in vitro* es inhibida cuando se activa a la microglía optogenéticamente o con el inmunógeno lipopolisacárido. La LTF *in vitro* también es inhibida cuando la microglía carece del receptor a fractalquina (lo que la lleva a un estado pro-inflamatorio). Sorprendentemente, la LTF *in vitro* es también inhibida cuando se depleta a la rebanada de microglía con clodronato liposomal. Nuestros resultados indican que la activación de la microglía interfiere con la plasticidad del generador de la respiración en respuesta a la HI, pero además indican que la microglía es necesaria para que este fenómeno pueda llevarse a cabo.

ABSTRACT

Sleep apneas are a common pathology in neonates and adults. This pathology produces intermittent hypoxia (IH), a phenomenon capable of inducing neuroinflammation and alterations in neural circuit function and their associated behaviors. One of the functions modulated by IH is breathing. After a short period of IH, breathing undergoes a plastic phenomenon called long-term potentiation (LTF), which consists of an increase in the amplitude and/or frequency of the respiratory efforts that is maintained during extended periods (tens of minutes), even after IH has ceased. Breathing is generated by the pre-Bötzinger complex (PBC), a circuit located in the brainstem. The PBC can be isolated in a brainstem slice, where (and can generate a LTF when IH is applied *in vitro* in response to IH it can generate a LTF. Interestingly, *in vivo* LTF is inhibited under peripheral pro-inflammatory conditions. Because peripheral inflammation activates microglia in the central nervous system, in this thesis we aimed to characterize LTF induction *in vitro* and to evaluate if microglia activation inhibits this plastic phenomenon. Our results show that IH application to brainstem slices containing the PBC induces a LTF of the respiratory rhythm, characterized by an increased frequency and decreased amplitude of inspiratory bursts. *In vitro* LTF is inhibited when the microglia are activated optogenetically or with the immunogen lipopolysaccharide. *In vitro* LTF is also inhibited when microglia lack the receptor to fractalkine (which leads microglia cells to a pro-inflammatory state). Unexpectedly, *in vitro* LTF is inhibited when the slice is depleted of microglia with liposomal clodronate. Our results indicate that microglia activation interferes with the plasticity of the respiratory rhythm generator in response to HI, but they also indicate that microglia is necessary for LTF to happen.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de apneas obstructivas del sueño (SAOS) se produce por la oclusión intermitente y repetitiva de las vías aéreas superiores durante el sueño, lo que origina una interrupción completa (apnea) o parcial (hipopnea) del flujo aéreo y, en consecuencia, hipoxia intermitente (HI) (Guilleminault et al, 1990). Las apneas de sueño tienen una duración variable y alteran la homeostasis cardiorrespiratoria (Solà-Soler y Fiz J., 2015), lo que genera varios problemas de salud con patogénesis hasta ahora desconocida en su totalidad (Guilleminault et al, 1990-1995; Goldberg et al., 1998). Las apneas obstructivas del sueño pueden ser de origen central (Guilleminault et al, 1975), periférico o mixto (Guilleminault et al, 1975; Raza y Blackwell, 1999). Las apneas obstructivas de origen central ocurren cuando el sistema nervioso central (SNC) del sujeto envía señales defectuosas a los nervios que controlan la respiración (Guilleminault et al, 1990), mientras que las apneas obstructivas de origen periférico son generadas por la obstrucción física de las vías aéreas superiores (Mitchell et al., 2003). Las apneas obstructivas mixtas son una combinación de ambas patologías (Guilleminault et al, 1975; Mitchell et al., 2003).

Las apneas de sueño desencadenan fenómenos patológicos que pueden alterar la generación de los ritmos respiratorios (Guilleminault et al., 1995; Raza y Blackwell, 1999; Hofstetter et al., 2007; Hofstetter y Herlenius 2015) y la homeostásis del organismo en general (Huxtable et al., 2013; Hofstetter et al., 2007). Dentro de las alteraciones más prominentes inducidas por las apneas de sueño crónicas se encuentra la inflamación tanto periférica como central (Hofstetter et al., 2007). La inflamación, a su vez, se ha relacionado con la disminución en la capacidad de los individuos para generar boqueos y autoresucitación después de episodios de apnea prolongada (Hofstetter et al., 2007; Lorea-Hernández et al., 2016). Coincidentemente, la infección sistémica, en modelos *in vitro*, puede alterar la respiración, sobre todo durante periodos tempranos del desarrollo y, principalmente, debido a la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (también llamadas citocinas) que, en el SNC, son producidas mayoritariamente por la microglía (Kettenmann et al., 2011).

Durante infecciones, tanto periféricas como centrales, la microglía es activada, lo que induce inicialmente la liberación de citoquinas pro-inflamatorias y posteriormente la liberación de citoquinas anti-inflamatorias (Graeber et al., 2011). Dentro de las citoquinas pro-inflamatorias que libera la microglía se encuentran las interleucinas 1 (IL-1) (Giulian et al., 1986; Van Dame et al., 1995), 6 (IL-6), y 8 (IL-8) (Nguyen et al., 2002; Ransohoff et al., 2007). La IL-1, particularmente su subtipo beta (IL-1 β), es liberada por la microglía después de que ocurre daño en el SNC (Giulian et al., 1986; Caggiano y Kraig, 1999; Laflamme et al., 1999). La IL-1 β ha sido relacionada con la depresión respiratoria que acompaña a la activación del sistema inmune (Hofstetter y Herlenius 2005). Por lo tanto, la IL-1 β representa un vínculo entre las condiciones de infección y la aparición de alteraciones respiratorias, incluidas las apneas (Raza y Blackwell, 1999; Hofstetter et al., 2007; Hofstetter y Herlenius 2015).

La respuesta neuroinflamatoria generada principalmente por la microglía, incluye al tallo cerebral (Ashwell et al., 1991; Hofstetter y Herlenius 2005; Kettenmann et al., 2011), en el que se encuentra el generador de los ritmos respiratorios, el complejo Pre-Bötzinger (CPB) (Smith et al., 1991). El CPB, durante un proceso inflamatorio, puede ser afectado por las moléculas pro-inflamatorias liberadas por la microglía, lo que ocasiona disfunción en la respiración (Lorea-Hernández et al., 2016; Peña-Ortega, 2017).

Estudios de nuestro laboratorio han mostrado que la aplicación de fármacos que modulan la actividad de la microglía afectan el funcionamiento del generador de los ritmos respiratorios (Lorea-Hernández et al., 2016; Peña-Ortega, 2017). En seguimiento a estos hallazgos en esta tesis nos interesamos en determinar si la microglía puede modular la respuesta del generador de los ritmos respiratorios ante la HI, puesto que la disfunción de este circuito se ha relacionado con inflamación (Hofstetter et al., 2007).

La HI, cuando es simulada en modelos animales *in vivo* e *in vitro*, consiste en la aplicación de ciclos repetidos de desoxigenación-oxigenación que, cuando son aplicados en sólo unos cuantos ciclos (p.e. de 3 a 10), inducen un fenómeno plástico llamado facilitación de larga duración (LTF, por sus siglas en inglés) (Millhorn et al., 1980;1986; Morris et al., 1996; Olson et al., 2001; Blitz y Ramirez 2002). La LTF, inducida por la HI aguda, consiste en un incremento sostenido de la actividad de las

salidas motoras de los nervios que controlan la respiración (Mitchell y Johnson 2003., Mellen et al., 2012). De manera interesante, Huxtable y colaboradores (2013) han demostrado que la generación de la LTF del nervio frénico (pLTF), cuyos comandos respiratorios se originan en el CPB, puede ser bloqueada tras la aplicación intraperitoneal de fármacos que promueven estados pro-inflamatorios, como el lipopolisacárido (LPS, componente de la pared celular de bacterias gram-negativas) (Anderson et al., 1992). El fenómeno de la LTF puede reproducirse *in vitro* directamente en el CPB, cuando se le aplican tres ciclos de HI; según lo descrito por Blitz y Ramirez (2002). Debido a que los fármacos que promueven estados pro-inflamatorios periféricos, como el LPS, pueden secundariamente inducir neuroinflamación dentro del SNC y a que la célula mayormente involucrada en la neuroinflamación es la microglía, consideramos de importancia estudiar si la activación de este tipo celular modula la plasticidad del generador de los ritmos respiratorios después de la HI.

ANTECEDENTES

2.1- La respiración

La respiración es un proceso complejo, que inicia desde etapas tempranas del desarrollo, y continúa activo incesantemente hasta la muerte (Douglas y Haldane, 1908; Feldman et al., 2003; Dick et al., 2016). La respiración es una actividad altamente organizada, donde varios elementos del sistema deben presentar actividad rítmica sostenida, coherente y secuencial para que se lleve a cabo adecuadamente (Douglas y Haldane, 1908; Pokorski, 2016). Por ejemplo, cuando estornudamos, tocemos, ingerimos alimentos o cuando reímos, todos estos eventos conllevan a la entrada y salida de aire y/o a la apertura u oclusión de las vías aéreas (Feldman, et al., 2003; Pokorski, 2016). El proceso de la respiración puede ser observado desde varios grados de complejidad: desde la expansión rítmica de los pulmones (Dick et al., 2016), hasta la actividad de los núcleos neuronales en el SNC, que la generan (Lumsden, 1923; Smith et al., 1991; Dick et al., 2016). La respiración se divide en dos etapas, una es la inspiración, donde el diafragma se contrae y expande los pulmones, lo que genera entrada de aire, y la otra etapa es la espiración, donde el diafragma se relaja, y los pulmones se contraen, para liberar el aire contenido (Zhang et al., 2016).

La etapa de la inspiración, que es la fase activa de la respiración, está determinada principalmente por el nervio frénico que lleva los comandos motores que contraen rítmicamente al diafragma (Lumsden 1923; Hernández et al., 2016; Pokorski, 2016), lo que genera una presión negativa que permite la entrada de aire a los pulmones (Dick et al., 2016; Zhang et al., 2016). En este proceso, también intervienen otras estructuras como la cavidad torácica formada por la columna vertebral, el esternón y las costillas, así como la musculatura asociada a la misma (Dick et al., 2016). Por otro lado, la espiración es la etapa pasiva de la respiración y es generada sólo después de que la inspiración se llevó a cabo y cuando todos los músculos antes mencionados se relajan (Zhang et al., 2016). Durante la espiración, la elasticidad torácica, combinada con la relajación pasiva del diafragma reduce el volumen del tórax, produciendo así una presión positiva que saca el aire de los pulmones (Pokorski, 2016).

La función principal de la respiración es mantener el balance en las concentraciones de CO_2 y O_2 y, con ello, los niveles de pH en un rango homeostático muy estrecho (Mitchell, 2004; Pokorski 2016). Cualquier disrupción en este balance genera señales de retroalimentación hacia los centros controladores de la respiración para que éstos emitan una respuesta ante el reto que se presenta (Douglas y Haldane, 1908; Lumsden, 1923; Hernández et al., 2016). Por ejemplo, ante una disminución del aporte de O_2 , o un aumento de las concentraciones parciales de CO_2 (lo cual disminuye el pH sanguíneo), se generan cambios en la actividad de los controladores respiratorios que llevan, en este caso particular, a un incremento de la actividad respiratoria aumentando la frecuencia y/o la amplitud de las inspiraciones (Douglas y Haldane, 1908; Lumsden, 1923).

A nivel del SNC, el núcleo que genera las señales que posteriormente se envían al nervio frénico, es el CPB (Smith et al., 1991) (**Figura 1**) que está encargado de la fase activa de la respiración, la inspiración (Smith et al., 1991). A continuación, se revisarán algunos aspectos generales de este núcleo, como su localización y la naturaleza de las células que lo componen.

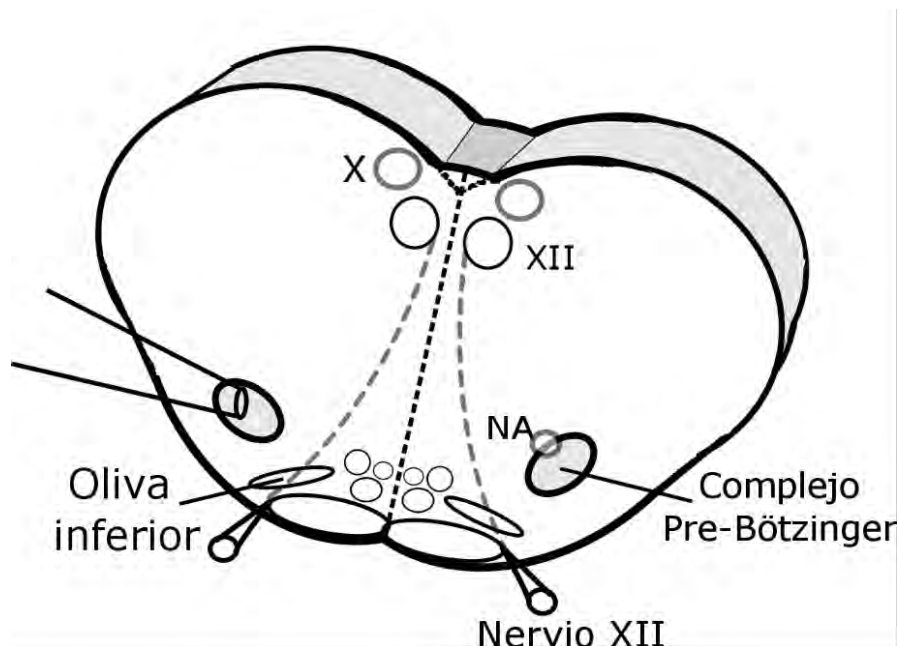


Figura 1. Rebanada de tallo cerebral que muestra la localización del Complejo Pre-Bötzing. X; Núcleo del nervio vago, XII; Núcleo del nervio hipogloso, NA; núcleo ambiguo, Nervio XII; raíz del nervio hipogloso. Modificado de Smith y col., 1991.

2.2- El Complejo Pre-Bötzinger (CPB)

El CPB es un circuito neuronal generador central de patrones, necesario y suficiente para la generación de la respiración (Ramírez et al., 2012; Feldman et al., 2013). Su papel indispensable se ha demostrado porque su eliminación química, genética, o su inhibición optogénica y/o farmacológica detiene la respiración (Ramírez et al., 2012; Feldman et al., 2013). Por otra parte, el CPB es suficiente para la generación de la respiración, debido a que si se le aísla en una rebanada de tallo cerebral (Smith et al., 1991), o si de esa rebanada se obtiene solamente el área que contiene al CPB en una preparación llamada “isla” del CPB (Johnson et al., 2001), este circuito sigue generando el ritmo respiratorio.

El CPB forma parte de una zona del tallo cerebral llamada bulbo raquídeo ventrolateral, que incluye un conjunto de neuronas llamada la columna respiratoria ventral (Ramírez et al., 2012; Feldman et al., 2013). El CPB está localizado caudal al núcleo retrofacial y al Complejo Bötzing, y en dirección rostral del grupo respiratorio ventral (GRV; Ramírez et al., 2012; Feldman et al., 2013). Como se mencionó, el circuito que contiene el mínimo de elementos necesarios para generar y mantener el ritmo respiratorio es el CPB (Smith 1991). Además de generar la respiración, el CPB envía comandos inspiratorios hacia el grupo respiratorio ventral rostral (Ramírez et al., 2012; Feldman et al., 2013). Las neuronas del grupo respiratorio ventral rostral, a su vez, mandan comandos inspiratorios a las motoneuronas frénicas, que son las que inervan directamente al diafragma (Ramírez et al., 2012; Feldman et al., 2013). Adicionalmente, el CPB manda comandos espiratorios al complejo Bötzing (Ramírez et al., 2012; Feldman et al., 2013). Por otra parte, el CPB también tiene conexiones directas con salidas motoras como son las originadas de motoneuronas localizadas en los núcleos hipogloso y ambiguo (Zavala-Tecuapetla et al., 2014).

Los dos CPBs, localizados bilateralmente en cada bulbo raquídeo ventrolateral, se sincronizan por neuronas que proyectan a través de fibras comisurales (Zavala-Tecuapetla et al., 2014). Si estas fibras se cortan, cada uno de los CPBs, por sí mismo, puede generar su propio ritmo respiratorio (Johnson et al., 2001); por lo que para

generar de manera coordinada el ritmo de la respiración en un animal completo se requiere la coordinación de ambos CPBs a través de la comunicación producida por estas fibras comisurales (Ezure, 1990; Zheng et al., 1998).

El grupo liderado por el Dr. Feldman, estima que existen alrededor de 3000 neuronas respiratorias que conforman al CPB (Ramírez et al., 2012; Feldman et al., 2013). Se definen a las células respiratorias como aquellas que disparan sus potenciales de acción en fase con la respiración (Peña y García, 2006). Estas células respiratorias del CPB presentan morfología diversa, por ejemplo: piramidales, fusiformes etc. (Picardo et al., 2013; Zavala Tecuapetla et al., 2014) y no hay una forma particular asociada con un fenotipo eléctrico (Picardo et al., 2013; Zavala Tecuapetla et al., 2014). El CPB no muestra una estructura histológica bien definida, es decir, no forma un núcleo histológicamente diferenciable y se entremezcla con neuronas no respiratorias que se involucran también en el control cardiovascular (Ramírez et al., 2012; Feldman et al., 2013).

Las células del CPB presentan ciertos marcadores moleculares que las distinguen de otras neuronas del bulbo raquídeo ventrolateral (Ramírez et al., 2012; Feldman et al., 2013). Uno de estos marcadores es el receptor NK1 (Gray et al., 2001; Guyenet et al., 2001; Wang et al., 2001), que es el receptor para el neuromodulador de la respiración sustancia P (Wiley et al., 1997). Otro marcador molecular importante del CPB es la somatostatina (SST) (Ramírez-Jarquín et al., 2012). Además, del 50 al 70 % de las neuronas del CPB expresan al factor de transcripción Dbx1 y al marcador molecular propio de células glutamatérgicas que es el transportador vesicular del glutamato tipo 2 (Kottick y Del Negro, 2015).

El CPB es modulado por diversos neuromoduladores como la SST (Ramírez-Jarquín et al., 2012), el óxido nítrico (NO) (Pyatin y Miroshnichenko, 2001), la histamina (Dutschmann et al. 2003), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés) (Bouvier et al., 2008), el peróxido de hidrógeno (García et al., 2011), la prostaglandina E2 (Koch et al., 2015), la sustancia P y la serotonina (Peña y Ramírez, 2002; 2004; Hodges et al., 2008), entre otros. Por dar un ejemplo, estudios realizados por Ramírez-Jarquín y cols., (2012) demuestran que la SST puede modular la generación de los ritmos respiratorios en el CPB, incluyendo la eupnea (respiración

normal o “verdadera”), los suspiros y los boqueos. Además, demostraron que la SST ejerce una modulación tónica endógena de la generación del ritmo respiratorio mediante la activación de los receptores de somatostatina tipo 2 (SSTR2s, por sus siglas en inglés), mismos que se expresan abundantemente en el CPB (Ramírez-Jarquín et al., 2012). La relevancia de esta neuromodulación tónica se desprende de la observación de que el bloqueo de los SSTR2 interrumpe la generación de boqueos y evita la auto-resucitación después de condiciones de anoxia (Ramírez-Jarquín et al., 2012).

De las 3000 neuronas que componen al CPB, alrededor del 50 % de ellas son neuronas excitadoras glutamatérgicas (Stornetta et al., 2003; Winter et al., 2009; Morgado-Valle et al., 2010; Ramírez et al., 2012; Feldman et al., 2013). El resto, son neuronas inhibitoras (Stornetta et al., 2003; Winter et al., 2009; Morgado-Valle et al., 2010; Ramírez et al., 2012; Feldman et al., 2013); alrededor del 50 % de ellas son productoras del neurotransmisor GABA (Stornetta et al., 2003; Winter et al., 2009; Morgado-Valle et al., 2010; Ramírez et al., 2012; Feldman et al., 2013) y el otro 50 % de las neuronas inhibitoras respiratorias son productoras del aminoácido glicina (Stornetta et al., 2003; Winter et al., 2009; Morgado-Valle et al., 2010; Ramírez et al., 2012; Feldman et al., 2013). La inhibición dentro del CPB no es necesaria para la generación del ritmo respiratorio (Feldman and Smith, 1989; Del Negro et al., 2009; Janczewski et al 2013), pues la aplicación de bicuculina y/o estricnina, inhibidores GABAérgico y glicinérgico, respectivamente (Morgan et al., 1983), no evita la generación de la actividad rítmica del CPB en la preparación de rebanada aislada de tallo cerebral de roedores neonatos (Shao y Feldman, 1997). Por el contrario, la generación de los ritmos respiratorios es dependiente de la transmisión glutamatérgica, ya que la aplicación del antagonista de los receptores tipo AMPA, el 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(f) quinoxalina (NBQX), elimina completamente la actividad respiratoria generada por el CPB (Morgado-Valle, et al., 2007).

Desde el punto de vista funcional, hay tres grandes tipos de neuronas respiratorias dentro del CPB (Ramírez et al., 2012; Feldman et al., 2013). Neuronas inspiratorias y post-inspiratorias, que corresponden a un 80 % del total de la población neuronal del CPB (Ramírez et al., 2012; Feldman et al., 2013) y que aumentan su frecuencia de

disparo de potenciales de acción durante la inspiración (neuronas inspiratorias) o al final de la misma (neuronas post-inspiratorias) (Ramírez et al., 2012; Feldman et al., 2013). El otro 20 % de las neuronas del CPB son neuronas espiratorias, que se caracterizan por disminuir su tasa de disparo durante la inspiración (Ramírez et al., 2012; Feldman et al., 2013). Dentro del grupo de neuronas inspiratorias, existe un subgrupo de alrededor de un 30 % de ellas que son neuronas denominadas marcapaso (Johnson et al., 1994; Ramírez et al., 2012; Feldman et al., 2013). Las neuronas marcapaso son capaces de producir ráfagas de potenciales de acción rítmicas de manera intrínseca (Johnson et al., 1994; Ramírez et al., 2012; Feldman et al., 2013), incluso en ausencia de interacción con otras células (p.e. bloqueo de la transmisión sináptica) (Ramírez et al., 2012; Feldman et al., 2013).

Hay dos poblaciones de neuronas marcapaso dentro del CPB: una población de neuronas marcapaso cuya producción de ráfagas de potenciales de acción es dependiente de una corriente catiónica inespecífica activada por calcio (I_{CAN} , por su acrónimo en inglés) (Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2005). Hay otra población de neuronas marcapaso cuya producción de ráfagas de potenciales de acción es dependiente de la corriente persistente de sodio (I_{Nap}), (Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2005). Estas dos poblaciones son independientes y su actividad es alterada diferencialmente por bloqueadores de las corrientes mencionadas (Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2005). La I_{CAN} es bloqueada por el ácido flufenámico (Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2005), mientras que la corriente persistente de sodio es bloqueada por el riluzol (Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2005). La generación de los potenciales de acción de la población de neuronas marcapaso dependiente de la corriente de I_{CAN} no es afectada por la aplicación de riluzol pero es abolida por la aplicación del ácido flufenámico (Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2005). Por otro lado, la actividad de la población de neuronas marcapaso dependiente de la corriente persistente de sodio no es afectada por el ácido flufenámico, pero es abolida por la aplicación del riluzol (Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2005).

De manera interesante, el bloqueo de la actividad de una sola población de neuronas marcapaso no es suficiente para bloquear la generación de la respiración en condiciones normales de oxigenación (ver más adelante; Peña et al., 2004; Peña y

Aguileta, 2007). Para ello, es necesario bloquear la actividad de ambas poblaciones de neuronas marcapaso (Peña et al., 2004; Peña y Aguileta, 2007). Con base en lo anterior, se ha concluido que la generación de la ráfaga inspiratoria en condiciones normales de oxigenación es comandada conjuntamente por las dos poblaciones de neuronas marcapaso (Peña et al., 2004; Peña y Aguileta, 2007), tanto *in vivo* como *in vitro*.

Como ya se mencionó, la función de las neuronas marcapaso es la de generar el ritmo respiratorio y determinar su frecuencia (Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2005; Ramírez et al., 2007; Peña 2009). Además, las neuronas marcapaso reclutan, fundamentalmente a través de transmisión excitadora, a las llamadas neuronas seguidoras para generar un ritmo más robusto (Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2005; Ramírez et al., 2007; Peña 2009). Con esto, se ha propuesto que la frecuencia del ritmo respiratorio es modulada mayoritariamente por la actividad de las neuronas marcapaso y la amplitud es modulada por el reclutamiento de las neuronas seguidoras (Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2005; Ramírez et al., 2007; Peña 2009). Hay evidencia de que la actividad de las neuronas marcapaso es regulada por las neuronas respiratorias inhibitorias seguidoras del mismo CPB (Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2005; Ramírez et al., 2007; Peña 2009). Como ya se mencionó, las neuronas marcapaso reclutan a otras neuronas inspiratorias para generar el ritmo respiratorio, sin embargo, las neuronas inspiratorias reclutadas, además de comunicarse entre ellas mismas retroalimentan negativamente a las neuronas marcapaso con la finalidad de controlar la frecuencia respiratoria (Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2005; Ramírez et al., 2007; Peña 2009). Esto indica que hay una retroalimentación negativa dentro del CPB que es producida por neuronas inhibitorias, fundamentalmente inspiratorias (Ramírez et al., 2011). Esta interacción permite que se genere un marcapaso regulado que no lleve al circuito a un estado de hiperexcitabilidad (Ramírez et al., 2011).

2.3- Respuesta del CPB ante la hipoxia

El generador de la respiración presenta un alto grado de plasticidad en respuesta a cambios fisiológicos o patológicos como, por ejemplo, un bajo suministro de oxígeno (hipoxia) (Peña-Ortega, 2009; 2012). Como ya se mencionó, en condiciones de

normoxia, el CPB genera la eupnea y los suspiros, mientras que en condiciones de hipoxia sostenida el CPB puede sufrir un proceso de reconfiguración que deriva en la generación de los boqueos (Lieske et al., 2000; Ramírez-Jarquín et al., 2012; Rivera-Angulo y Peña-Ortega 2014; Lorea-Hernández et al., 2016). El protocolo de hipoxia que permite observar la reconfiguración del CPB está esquematizado en la **Figura 2**. Este protocolo consiste en realizar un registro electrofisiológico de campo, registrando la actividad rítmica respiratoria generada por el CPB y una vez que la actividad es estable, el tejido se somete a hipoxia durante 15 minutos (Lieske et al., 2000; Ramírez-Jarquín et al., 2012; Rivera-Angulo y Peña-Ortega 2014; Lorea-Hernández et al., 2016). Durante la aplicación de la hipoxia el CPB genera una respuesta inicial que consiste en la aceleración del ritmo respiratorio, seguida por un decremento progresivo tanto de la frecuencia y como de la amplitud de las ráfagas poblacionales generadas por el CPB (Lieske et al., 2000; Ramírez-Jarquín et al., 2012; Rivera-Angulo y Peña-Ortega 2014; Lorea-Hernández et al., 2016). Durante este proceso de depresión respiratoria en condiciones de hipoxia prolongada el CPB se reconfigura y ahora genera un nuevo patrón respiratorio llamado boqueos, los boqueos se diferencian de la eupnea por ser de menor amplitud, duración y frecuencia (Lieske et al., 2000; Ramírez-Jarquín et al., 2012; Rivera-Angulo y Peña-Ortega 2014; Lorea-Hernández et al., 2016). Al reestablecer la reoxigenación de la preparación, dentro de los primeros minutos se observa la recuperación de la actividad respiratoria, donde el circuito incrementa la frecuencia y la amplitud de las ráfagas respiratorias hasta llegar a una condición estable en la que se vuelve a generar un patrón respiratorio tipo eupnea (Rivera-Angulo y Peña-Ortega 2014; Ramírez-Jarquín et al., 2012; Lorea-Hernández et al., 2016). La hipoxia sostenida ha demostrado ser útil no sólo para caracterizar el proceso de reconfiguración que se produce en el CPB *in vitro* y que conduce a la generación de boqueos, sino que ha permitido explorar estrategias que fomentan la generación de este otro ritmo respiratorio (Rivera-Angulo y Peña-Ortega 2014).

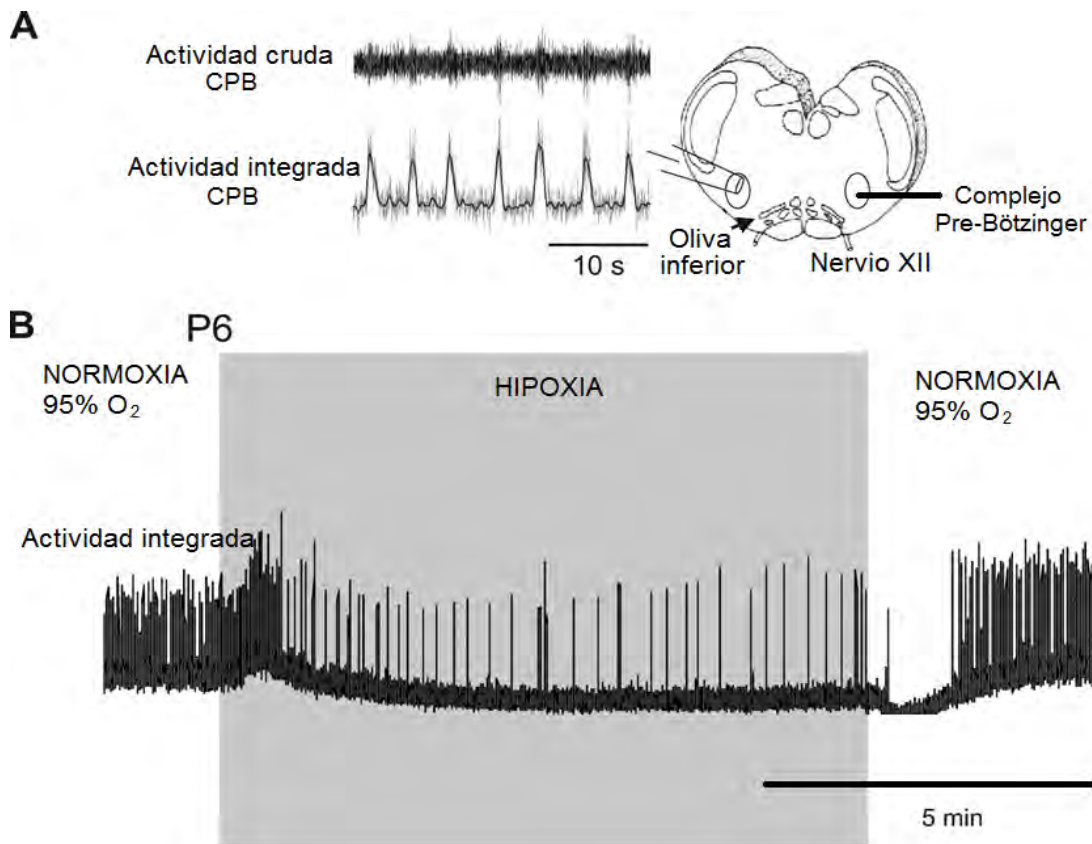


Figura 2. Registro de la actividad extracelular del Complejo Pre-Bötzinger (CPB) y protocolo de hipoxia sostenida. (A) Los trazos muestran ráfagas inspiratorias generadas por el CPB. El trazo superior es un registro extracelular crudo, y el trazo inferior es la señal rectificada e integrada del mismo trazo. A la derecha, se encuentra el esquema de una rebanada transversal de tallo cerebral que contiene al CPB. En la misma rebanada se encuentran las siguientes estructuras: Nervio XII; hipogloso, CPB y Oliva inferior. (B) Se muestra la actividad extracelular integrada del CPB y su respuesta a una reducción en la concentración de O₂ (0 % O₂) seguida de un periodo de reoxigenación (Normoxia, 95 % O₂). Modificado de Hu et al., 2012.

Por ejemplo, la aplicación de un intermediario del ciclo de Krebs, el isocitrato, evita el decremento de la frecuencia y la amplitud de las ráfagas inspiratorias durante la hipoxia (Rivera-Angulo y Peña-Ortega 2014). Así, se ha propuesto que el isocitrato puede ser una herramienta útil para contrarrestar la imposibilidad en generar boqueos y autoresuscitación en condiciones patológicas (Rivera-Angulo y Peña-Ortega 2014).

La respuesta generada por el CPB a condiciones de hipoxia prolongada puede ser afectada negativamente por diversos factores, entre los que se incluyen la edad y el género (Feldman et al., 2003; Garcia et al., 2013). Estudios realizados por Garcia y cols. (2003) registrando la actividad extracelular poblacional del CPB en rebanadas de ratones neonatos CD1 (P10-13), muestran que la depresión en la amplitud y la frecuencia de las ráfagas inspiratorias generada por la hipoxia sostenida es más pronunciada en machos en comparación con las hembras (Garcia et al., 2013). Además, estos registros revelan que el tiempo después de la hipoxia hasta la aparición de la primera ráfaga inspiratoria después de la reoxigenación, se retrasa significativamente en los machos (Garcia et al., 2013). Adicionalmente, ratones expuestos a la nicotina durante el periodo prenatal, muestran una disminución en la generación de boqueos y en la capacidad para sobrevivir a la hipoxia severa (Hu et al., 2012).

Además de la hipoxia sostenida, existen otros protocolos de hipoxia que pueden ser utilizados para estudiar la plasticidad generada por el CPB, como la HI (HI, **Figura 3**). Después del protocolo de HI el generador de la respiración produce un fenómeno plástico conocido como facilitación de larga duración (LTF) (por sus siglas en inglés), Blitz y Ramirez, 2002). Si bien la HI crónica produce alteraciones en muchos circuitos neuronales y está asociada a una gran diversidad de patologías (Almendros et al., 2014), la LTF, inducida por HI aguda, puede ser aprovechada como un acercamiento terapéutico en varios desórdenes respiratorios que cursan con hipoventilación (Peña y García, 2008; Almendros et al., 2014). Por lo anterior, el entendimiento de los mecanismos celulares que subyacen a la generación de la LTF puede servir para establecer acercamientos farmacológicos y no-farmacológicos para el tratamiento de desórdenes respiratorios como las mismas apneas obstructivas del sueño y el síndrome de muerte súbita del lactante (Mitchell et al., 2003, Huxtable et al., 2013). Por ejemplo, la LTF se puede inducir en el nervio geniogloso (McKay et al., 2004), lo que pudiera reducir el colapso de las vías aéreas superiores que ocurre durante el sueño (McKay et al., 2004).

A pesar de que existen muy pocos estudios realizados directamente sobre el CPB y su respuesta a la HI aguda (Blitz y Ramirez, 2002), el fenómeno de la LTF ha sido

ampliamente estudiado en las salidas respiratorias motoras, como los nervios geniogloso, hipogloso y frénico (Mitchell et al., 2003; McKay et al., 2004; Huxtable et al., 2013). A continuación, serán revisadas algunas condiciones que determinan y/o modulan la generación y el mantenimiento de la LTF.

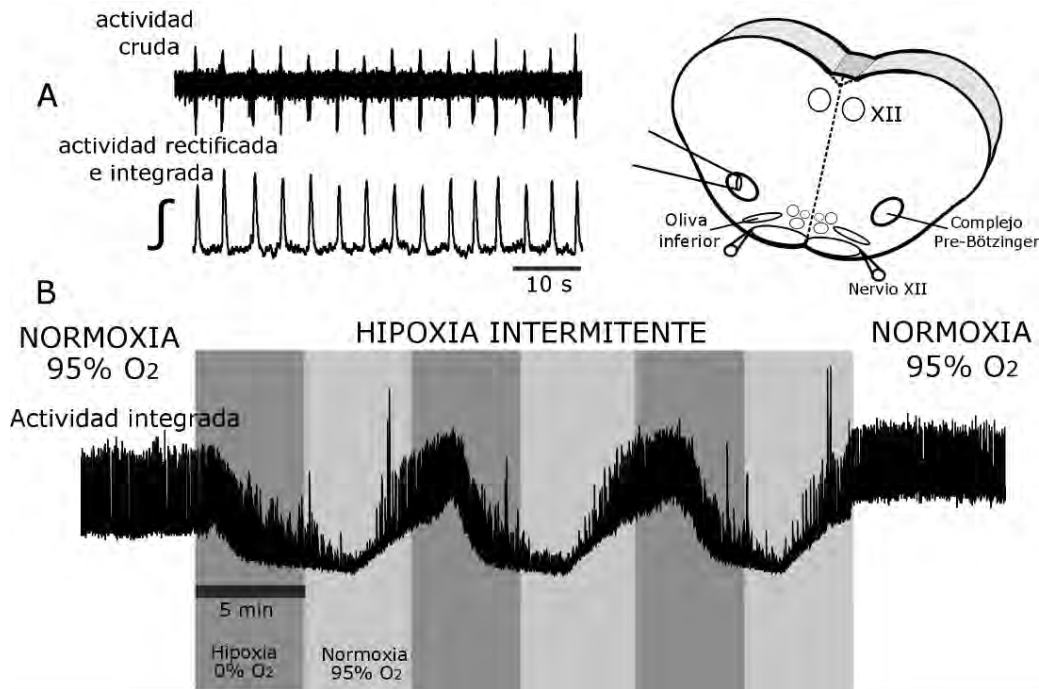


Figura 3. Protocolo de HI. (A) Los trazos muestran ráfagas inspiratorias generadas por el CPB. El trazo superior es un registro extracelular crudo, y el trazo inferior es la señal rectificada e integrada del mismo trazo. A la derecha, se encuentra el esquema de una rebanada transversal de tallo cerebral que contiene al CPB. En la misma rebanada se encuentran las siguientes estructuras: Nervio XII; hipogloso, y Oliva inferior. CPB y Oliva inferior (No están correctamente señaladas en el esquema). (B) Se muestra la actividad extracelular integrada del CPB y su respuesta a la HI producida por una reducción en la concentración de O₂ (0% O₂) durante tres ciclos de cinco minutos de hipoxia, seguidos de cinco minutos de reoxigenación (Normoxia, 95% O₂).

2.3.1- La facilitación de larga duración (LTF)

Como ya se mencionó, la HI genera la LTF tanto *in vitro* como *in vivo* (Morris et al., 1996; Blitz y Ramirez, 2002; Mitchel et al., 2004). La LTF en el nervio frénico (pLTF) es uno de los modelos mejor estudiados de plasticidad respiratoria (Morris et al., 1996). La pLTF es un incremento en la actividad respiratoria, dependiente de serotonina (Bach y Mitchell, 1996), que es ocasionado por episodios de HI (Morris et al., 2000, Morris et al., 2003) o por estimulación eléctrica del nervio carotideo (Mitchell y Fregosi, 1994). El

estudio de este fenómeno es de relevancia clínica, ya que la plasticidad respiratoria juega un papel crítico en diferentes desórdenes respiratorios como las apneas del sueño (Mitchell et al., 2008).

Los primeros en describir el fenómeno de la LTF fueron Millhorn y colaboradores (1986), quienes observaron este fenómeno después de la estimulación eléctrica repetida del nervio carotídeo. Después de esta estimulación, se observó un incremento abrupto en la actividad ventilatoria, que se mantuvo después de terminar la estimulación, y perduró por horas. Desde entonces, este fenómeno fue nombrado LTF (Millhorn et al., 1986). Este fenómeno fue posteriormente reproducido por la aplicación de HI mientras se registraban los comandos respiratorios directamente en el nervio frénico y/o hipogloso (Mitchell et al., 1991; 1994). A través de las últimas décadas, se ha determinado que la LTF depende del género, de la edad, del fondo genético y de la especie (Mitchell et al., 2002; Feldman et al., 2003; Mitchell et al., 2003; Garcia et al., 2013). En un inicio, se pensó que la LTF estaba confinada a las motoneuronas respiratorias y que era exclusivamente dependiente de serotonina (Millhorn et al., 1980; Mitchell et al., 1991; 1994). Sin embargo, en concordancia con estos modelos *in vivo*, la LTF también ha sido encontrada en rebanadas que contienen el CPB (Smith et al., 1991) y se ha demostrado que dependen de otros neuromoduladores como el BDNF y las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) (Bouvier et al., 2008; MacFarland y Mitchell., 2008)

La prueba de que la LTF puede inducirse directamente en el CPB fue provista por Blitz y Ramirez (2002), quienes registraron la actividad del CPB en rebanadas de tallo cerebral y encontraron que después de aplicar un protocolo de HI que consistía en 3 periodos de hipoxia de 5 minutos, alternados con periodos de reoxigenación de la misma duración (**Figura 4**), el CPB es capaz de desplegar un fenómeno plástico que consiste en un incremento significativo en la frecuencia que se mantiene al menos 90 minutos después de la HI sin mostrar cambios en la amplitud (**Figura 4**) (Blitz y Ramirez 2002).

De manera interesante, la HI no solo afecta la actividad neuronal, sino que es capaz de modificar a las células gliales (Giulian et al., 1993; McRae et al., 1996; Huxtable et al., 2013). Por ejemplo, la HI incrementa el número de microglía activada (Giulian et al.,

1993; McRae et al., 1996) e induce un incremento de la expresión de la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP, por sus siglas en inglés) en los astrocitos (McRae et al., 1996), lo que indicaría que la HI podría modular a la glía (induciendo inflamación) y/o que la glía contribuye a los fenómenos plásticos asociados con la HI (Giulian et al., 1993; McRae et al., 1996; Huxtable et al., 2013). Si bien, se sabe muy poco acerca del impacto de la inflamación sobre el sistema del control central de la respiración (Huxtable et al., 2013), en el siguiente apartado describiremos cuál es el impacto de las condiciones pro-inflamatorias sobre la generación de los ritmos respiratorios y su plasticidad.

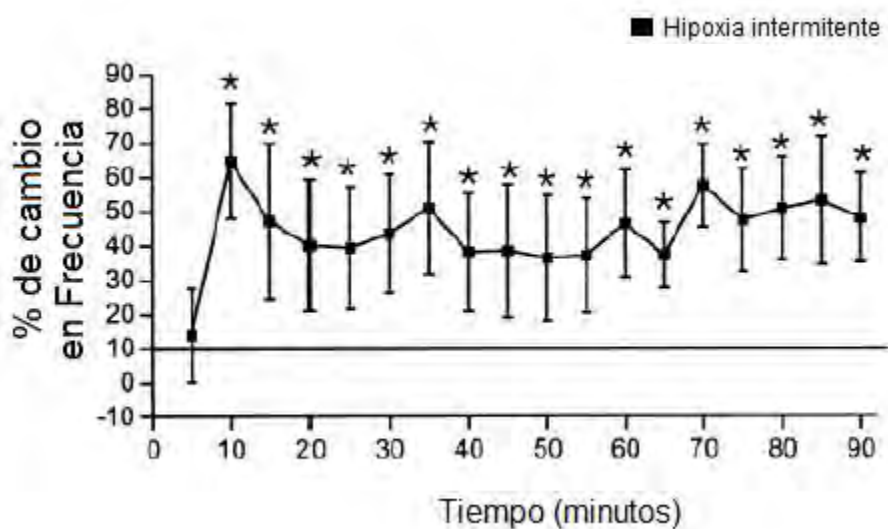


Figura 4. Inducción de la LTF en rebanadas de tallo cerebral. Se grafica el porcentaje del cambio en la frecuencia, contra el tiempo en minutos, de las ráfagas inspiratorias generadas por el CPB *in vitro* después de la aplicación de un protocolo de HI. La frecuencia de las ráfagas inspiratorias generadas por el CPB aumenta durante los primeros 10 minutos y se mantiene elevada por al menos 90 minutos que duró el registro.

2.3.2- Las condiciones inflamatorias que modifican la LTF

La plasticidad respiratoria y la comprensión de cómo la inflamación altera el sistema respiratorio es crucial para el desarrollo de mejores estrategias en el estudio de la respiración y para la utilización de la plasticidad neuronal como tratamiento (Mitchell et al., 2008). Existe evidencia que apoya un papel dinámico para la inflamación ya sea en la facilitación o la inhibición de diferentes formas de neuroplasticidad (Mitchell et al.,

2008; Huxtable et al., 2011). Dado que se ha propuesto que la plasticidad respiratoria está implicada en el desarrollo o tratamiento de enfermedades respiratorias, nuevas investigaciones se han enfocado en el papel que desarrolla la inflamación sobre el sistema respiratorio (Mitchell et al., 2008; Huxtable et al., 2011; 2013; 2015). Una característica en común de la mayoría de enfermedades infecciosas, ya sean respiratorias o no, es la inflamación (Smith et al., 2012; Wu et al., 2013; Sun et al., 2016), por lo que es necesario establecer cuál es la interacción que se lleva a cabo entre el sistema inmune y el sistema respiratorio, y como estas interacciones intervienen en la modificación de la plasticidad de los circuitos neuronales incluido el CPB (Raza y Blackwell, 1999; Mitchell et al., 2003; Mitchell et al., 2008; Lorea-Hernández et al., 2016).

Actualmente, hay evidencia científica de que la inflamación sistémica induce inflamación del SNC (Huxtable et al., 2011). La inflamación del SNC se asocia principalmente con la activación de la microglía (Laflamme et al., 1999; Verkhratsky et al., 2014; Hofstetter et al., 2015), las células inmunes residentes del SNC (Kettenmann et al., 2011), pero también de los astrocitos (McRae et al., 1996; Dong y Benveniste, 2001). Las células gliales, en especial la microglía, contribuyen a la expresión de genes pro-inflamatorios dentro del SNC (Laflamme et al., 1999). Los modelos de hipoxia sostenida ó de HI pueden generar un grado bajo de inflamación (Giulian et al., 1993). Sin embargo, se sabe muy poco acerca de las moléculas pro-inflamatorias que pueden modificar los patrones de respuesta a la hipoxia del CPB (Huxtable et al., 2011; 2013). Como ya se mencionó en el apartado anterior, tras la aplicación de HI, se producen ROS. Se sabe también que la microglía, después de su activación a un estado pro-inflamatorio (Giulian et al., 1993; McRae et al., 1996), tiene la capacidad de sintetizar grandes cantidades de ROS (Colton et al., 1996). Estas ROS son necesarias para el mantenimiento de la pLTF y sus niveles se incrementan después de aplicar la HI crónica (MacFarland y Mitchell., 2008) a través de múltiples mecanismos, incluyendo la transcripción de NADPH oxidasa 2 (NOX2), la disminución de la actividad de la superóxido dismutasa 2 (SOD2) (Prabhakar et al., 2015) y la inducción de la inflamación (Lam et al., 2012). Se ha reportado que, al aplicar antioxidantes, durante la HI crónica, se impide el establecimiento de la pLTF (Prabhakar et al., 2015), por lo que

al ser la microglía y las condiciones pro-inflamatorias las que liberan ROS, ésta célula podría jugar un papel importante en la generación de la plasticidad respiratoria.

Como ya se mencionó, la plasticidad motora respiratoria, es comúnmente estudiada través de la pLTF (Huxtable et al., 2011; 2013; 2015). Este fenómeno plástico, es sensible a niveles bajos de inflamación sistémica, ya que la aplicación sistémica de una dosis baja de lipopolisacárido (LPS, un componente de la pared celular de las bacterias Gram negativas, altamente antigénico) induce inflamación y suprime la pLTF durante al menos 24 h (Huxtable et al., 2013). Los efectos producidos por el LPS se revierten mediante la aplicación sistémica de Keptoprofeno, un anti-inflamatorio no esteroideo, lo cual apoya la hipótesis de que la inflamación inducida por LPS impide la generación y establecimiento de la pLTF (Huxtable et al., 2015).

La inflamación puede tener efectos opuestos sobre la generación de la plasticidad, pues por una parte es necesaria para el incremento de la respuesta ventilatoria a la hipoxia sostenida, la inflamación sistémica provocada con inyecciones intraperitoneales de LPS inhibe la pLTF después de la HI aguda (Huxtable et al., 2013). Inesperadamente, la aplicación de minociclina (un antibiótico del grupo de las tetraciclinas con capacidad de inhibir la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias) también bloquea la generación de la pLTF y, contrario a lo que ocurre con el keptoprofeno (Huxtable et al., 2015), no revierte los efectos producidos por el LPS del bloqueo de la pLTF (Huxtable et al., 2011). Dado que la inflamación sistémica provoca muchos cambios en el SNC, es probable que tales cambios en el SNC alteren el control neural de la respiración (Huxtable et al., 2011).

La inflamación perinatal parece causar perjuicios a largo plazo en una variedad de funciones neurales (Bilbo and Schwarz, 2012; Cardoso et al., 2015). Sin embargo, se sabe muy poco acerca de los efectos de la inflamación perinatal en cualquier aspecto del control de la plasticidad respiratoria (Mitchell et al., 2008; Huxtable et al., 2011). En conjunto, los efectos de la inflamación sistémica sobre la plasticidad respiratoria, particularmente sobre la pLTF, son variables y requieren mayor investigación. Por ejemplo, en preparaciones aisladas *in vitro* que contengan al generador del ritmo respiratorio, donde la inflamación ocasionada no sea sistémica y se pueda estudiar la plasticidad respiratoria directamente sobre rebanadas de tallo cerebral que contengan

al CPB. Dicha preparación presenta la ventaja de permitir el estudio de los efectos de la inflamación sobre la plasticidad respiratoria, así como de los mecanismos que subyacen a ésta, directamente sobre el núcleo generador de los ritmos respiratorios (Blitz y Ramírez, 2002). Además, se podría determinar qué papel juegan las células microgliales y cómo las funciones que ejerce este tipo celular, bajo condiciones pro-inflamatorias, podrían estar involucradas en la inhibición de la plasticidad del circuito respiratorio. A continuación, describiremos el proceso de la inflamación dentro del SNC, así como las características principales de la microglía, y cómo este tipo celular se encuentra estrechamente involucrado en la modulación de la actividad de circuitos neuronales en etapas postnatales.

2.4 - Inflamación en el sistema nervioso central

La inflamación del SNC puede ser producto de diversas fuentes, como los traumatismos, la isquemia general o focalizada, la infecciones que pueden ser tanto centrales como a nivel sistémico, así como la neurodegeneración (Verkhatsky et al., 2014). Todas estas condiciones pueden activar a la microglía (Laflamme et al., 1999; Banks et al., 2003). La microglía puede ser activada desde la periferia por diversas vías, entre las que se incluyen el paso de citoquinas de forma directa a través de los órganos circumventriculares, que carecen de barrera hematoencefálica (BHE), la activación del endotelio por las citoquinas, que a su vez transmite señales al SNC (Laflamme et al., 1999), la inducción de señales por las citoquinas que viajan al SNC a través del nervio vago (Mascarucci et al. 1998) y el transporte activo de las citoquinas a través de la BHE (Banks et al., 2003).

La activación de la microglía puede inducir la liberación de quimioquinas y de citoquinas pro-inflamatorias, como la IL-1, la IL-6 (Nguyen et al., 2002), la IL1- β (Van Dame et al., 1995; Hofstetter et al., 2015) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , por sus siglas en inglés) (Guilian et al., 1986). Además de esas moléculas, la activación de la microglía puede generar un aumento en los niveles de ROS (Röhl et al., 2005). En cultivos de microglía y astrogliá, el LPS induce que la microglía produzca mayor cantidad de NO (Röhl et al., 2005). La activación de la microglía está relacionada con la neurodegeneración y la activación de la astrogliá, ya que se ha reportado que la

activación de la microglía precede a la muerte neuronal y a la reactividad de los astrocitos (Wu et al 2005).

La microglía presenta diferentes estados fenotípicos (basal, activado pro-inflamatorio ó M1, activado anti-inflamatorio ó M2, entre otros) los cuales han sido estudiados con base en las moléculas que liberan, así como la morfología que estas células presentan (Koshinaga et al., 1995; Dávalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005; Tremblay et al., 2011). En estudios realizados por Taylor y cols., (2015), se demostró que después de un daño directo al SNC, la microglía expresa altos niveles de IL-6 que favorece la aparición del fenotipo M1. Sin embargo, la aparición posterior de marcadores para la inducción del fenotipo M2 como la arginasa-1, el TGF- β y el SOCS3 favorecen una transición del fenotipo M1 al M2 en espacios temporales que van de horas a semanas y que involucran cambios en la expresión de citoquinas pro-inflamatoria, como la IL-12 (Wu et al., 2005).

La microglía es capaz de expresar muchos receptores capaces de responder a sustancias liberadas por las neuronas y los astrocitos (Pockok y Kettenmann 2007) y estos receptores le ayudan a establecer la comunicación con su entorno. Uno de estos receptores es el que une a la quimiocina fractalquina (CX3CL1), llamado receptor CX3CR1 (Zhuang et al., 2007; Milligan et al., 2008), con el cual establece comunicación con las neuronas (mismas que liberan fractalquina). Se hablará de este receptor a detalle más adelante. La sobreactivación de la microglía y la sobreproducción de factores pro-inflamatorios pueden conducir a la alteración de los circuitos neuronales y a la muerte neuronal (Sun et al., 2016). Tanto los astrocitos como la microglía contribuyen al daño de las neuronas mediante la liberación de citoquinas pro-inflamatorias tales como la IL-1 y el TNF- α (Koshinaga et al., 1995).

La microglía es capaz de liberar sustancias, dependiendo del estado en el que se encuentre (basal, M1, M2, entre otros; **Figura 5**), lo que le permiten modular a las neuronas y a la glía circundante (Barger et al., 2007). La liberación de sustancias pro-inflamatorias o anti-inflamatorias por parte de la microglía podría involucrarse en la modulación de diversos circuitos neuronales, en respuesta a antígenos, traumas, neurodegeneración o como mecanismo de sobrevivencia (Scholz y Wolf, 2011). Aunado a ésto, se ha reportado que la activación microglial generada por la

neuroinflamación sistémica puede causar efectos importantes sobre funciones neuronales fundamentales como la transmisión y plasticidad sináptica (Wu et al., 2013; Funk et al., 2015). Revisaremos los aspectos generales de la fisiología de la microglía, las características de su actividad basal, el cómo sus diferentes fenotipos pueden influir sobre los circuitos neuronales y, por último, cómo la microglía se comunica con su entorno para generar respuestas con base en los estímulos que esta célula recibe.

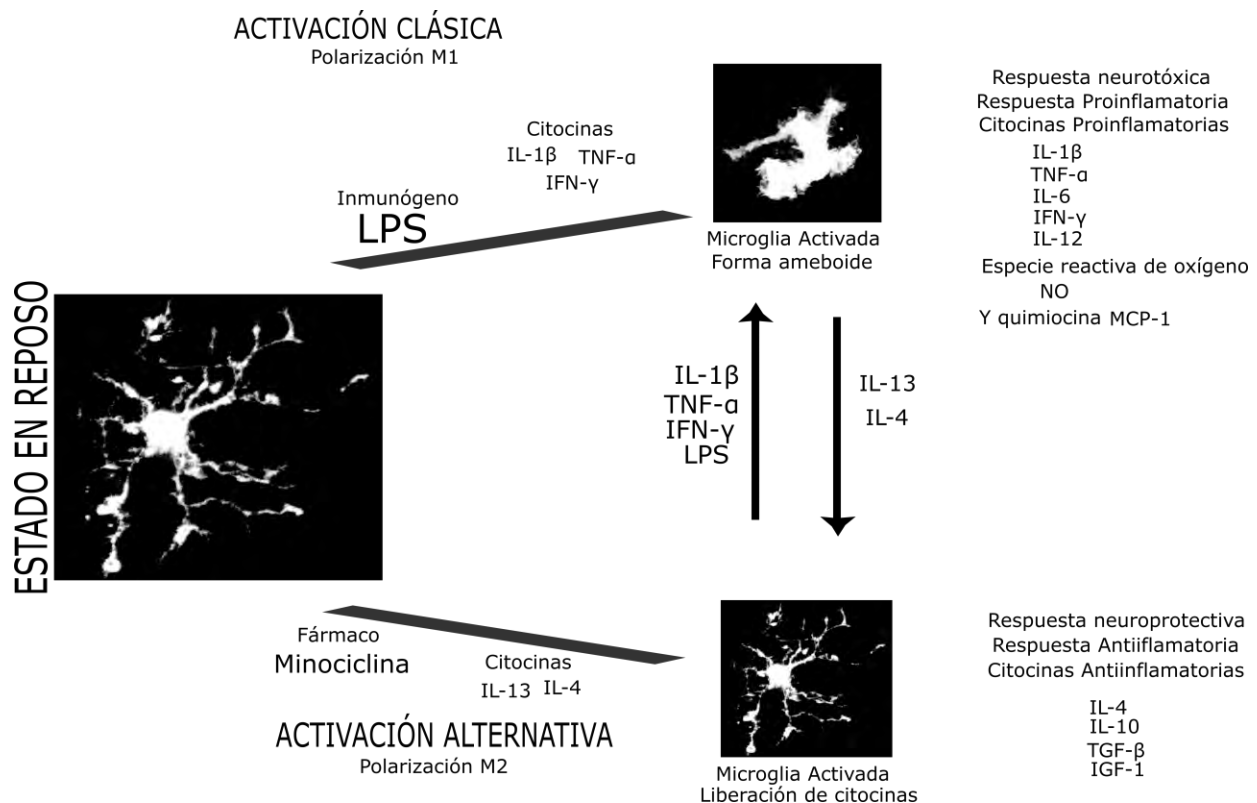


Figura 5. La microglía y sus perfiles de activación, así como las interleucinas que participan en las respuestas pro y anti-inflamatorias. El estado de reposo de la microglía se caracteriza por tener un soma pequeño y la emisión de procesos que ocupan gran superficie (comparados con el soma). Los procesos se componen de prolongaciones muy finas y pequeñas de aspecto espinoso. En el estado de reposo existe una liberación moderada de citocinas por parte de la microglía. La activación clásica M1 de la microglía puede ser inducida por inmunógenos como el lipopolisacárido (LPS), o moléculas como citocinas pro-inflamatorias. El estado M1 se diferencia morfológicamente del estado en reposo por la retracción de los procesos, y un soma compacto. En este estado la microglía libera de forma exacerbada citocinas pro-inflamatorias, como la IL-1 β , el TNF- α , y el IFN- γ . La activación alternativa de la microglía M2 se puede inducir por la aplicación de fármacos como la minociclina así como por citocinas anti-inflamatorias. En este estado la microglía mantiene sus procesos, pero sostiene una liberación incrementada con respecto a su estado basal de citocinas anti-inflamatorias, como la IL-4, la IL-10, el TGF- β y el IGF-1.

2.5- La microglía

El SNC está conformado por dos grandes grupos de células: las neuronas y la glía (Kettenmann et al., 2011). Las neuronas son las encargadas de la transmisión rápida de los impulsos eléctricos (Hodgkin y Huxley, 1945), mientras que la glía, son células encargadas principalmente del soporte de las neuronas (Kettenmann et al., 2011), de mantener la homeostasis dentro del SNC (Shaked et al., 2004; Nimmerjahn et al. 2005; Katayama et al., 2012) y de la mielinización de axones (Kettenmann et al., 2011). La glía incluye a los astrocitos, oligodendrocitos, células NG2, células de Müller, células de Bergman y microglía, entre otras (Ginhoux y Prinz 2015). La mayoría de las células gliales provienen del ectodermo, específicamente de la glía radial (Ginhoux et al., 2010), mientras que la microglía proviene del mesodermo (Ashwell et al., 1991; Ginhoux et al., 2010). Durante el desarrollo, la microglía se infiltra en el SNC, y se distribuye a lo largo de todo éste (Elkabes et al., 1996; Sierra et al., 2010; Tremblay, 2011). Clásicamente, se ha propuesto que la microglía tiene funciones de macrófago en el SNC (Kreutzberg et al., 1995) y que responde, por medio de su activación, a cambios patológicos en su medio ambiente (Nimmerjahn et al., 2005; Sierra et al., 2010; Tremblay et al., 2011). Cuando existe una lesión en el SNC, la microglía activada puede proliferar y migrar al sitio de la lesión, donde fagocita agentes extraños o restos celulares e interactúa con células del sistema inmune periférico por medio de la presentación de antígenos (Graeber et al., 2011; Scheffel et al., 2012). Cualquier proceso patológico en el cerebro conlleva a la activación de la microglía (Kreutzberg et al., 1995; Butovsky et al., 2006; Kettenmann et al., 2011).

El papel principal de la microglía en el SNC es protegerlo de agentes patológicos tanto externos como internos (Ginhoux y Prinz 2015). En el cerebro sano, la microglía permanece en un estado de reposo ó “estado vigía”. Sin embargo, se sabe que en este estado la microglía es altamente dinámica (Nimmerjahn et al., 2005; Tremblay et al., 2011). La microglía en reposo presenta ramificaciones que se encuentran en constante prolongación y retracción (**Figura 6**). Las ramificaciones microgliales contactan directamente con astrocitos, neuronas y vasos sanguíneos (Tremblay et al., 2010),

permitiéndole desarrollar funciones de “vigía” monitoreando su microambiente (Nimmerjahn et al., 2005).

Existe evidencia de que la microglía puede influir en el establecimiento y la permanencia de contactos sinápticos (Paolicelli et al., 2011). Además, la microglía modula la conectividad de grupos neuronales (Wu et al., 2013), lo que define un papel nuevo para la microglía, más allá de ser sólo un sensor patológico (Kettenmann et al., 2011; Ginhoux y Prinz 2015). Muchos de los procesos celulares y moleculares que participan en las funciones no-inflamatorias de la microglía están por determinarse (Tremblay et al., 2011; Shemer et al., 2015).

Con base en una reconstrucción 3D de la corteza visual, utilizando electromicroscopía seriada, Tremblay y cols. (2010) mostraron que los procesos de la microglía se encuentran en contacto dinámico tanto con la presinapsis como con la postsinapsis. También los procesos microgliales se contactan con los astrocitos perisinápticos y la hendidura sináptica, sugiriendo así que el contacto de la microglía con otras células del SNC, incluidas las neuronas, es de suma importancia para el funcionamiento basal de los circuitos neuronales (Tremblay et al., 2011). Por su parte, estudios realizados por Paolicelli y cols. (2011), por medio de microscopía confocal y electrónica de barrido, encontraron proteínas específicas de la presinapsis, como la SNAP25, y de la postsinapsis, como la PSD95, dentro de los procesos de la microglía. Con base en estos hallazgos, se ha propuesto que la microglía se encuentra involucrada en el mantenimiento funcional de las sinapsis (Paolicelli et al., 2011), a través de su interacción continua con las terminales sinápticas, las espinas dendríticas, los procesos de astrocitos y las hendiduras sinápticas (Wake et al., 2009; Tremblay, 2011).

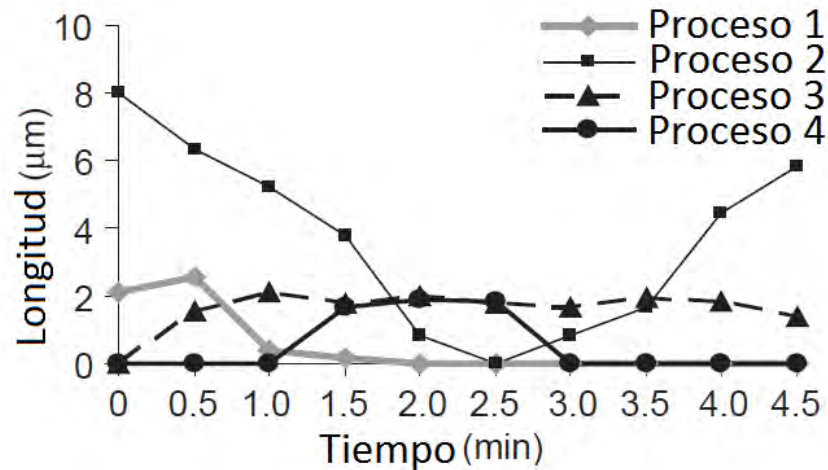
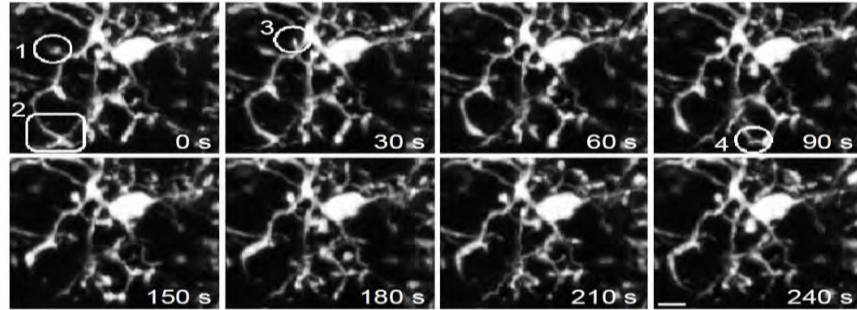


Figura 6. Dinámica de los procesos microgliales determinada con videomicroscopía de dos fotones. La serie de imágenes muestran la extensión y retracción rápida de los procesos microgliales finos en la escala de los segundos (A). Los círculos y la casilla redondeada indican cuatro procesos representativos que cambian de longitud y forma a lo largo del tiempo. Los cambios de la longitud de los cuatro procesos marcados en A se grafican en función del tiempo en B. Barra de escala, 5 μ m. (Modificado de Dávalos et al., 2005)

Estas interacciones permiten a la microglía reconocer el nivel de la actividad neuronal bajo condiciones basales y diferenciarla de la actividad neuronal “anormal” como la que ocurre en presencia de alteraciones estructurales en las sinapsis ó la que se presenta cuando el microentorno cambia (Nimmerjah et al., 2005; Tremblay, 2011). Ante la patología presente en las enfermedades neurodegenerativas, la microglía se encarga de la eliminación de elementos no funcionales (Katayama et al., 2012). De igual manera, durante el desarrollo embrionario, cuando se genera un exceso de sinapsis, la microglía es la encargada de fagocitar aquellas sinapsis que no van a prevalecer (Paolicelli et al., 2011). Para que la microglía pueda fagocitar algún elemento del SNC, necesita una señal molecular (Kettenmann et al., 2011). Por ejemplo, las células

apoptóticas liberan nucleótidos trifosforilados como el ATP y el UTP (Katayama et al 2012). La microglía puede reconocer al UDP, que es un producto de la degradación del UTP, por medio de un receptor purinérgico tipo P2Y6 (Dávalos et al., 2005), lo que induce que la microglía adopte un fenotipo que fagocita restos celulares (Katayama et al 2012). Otro receptor que sirve para el mismo fin es el CX3CR1, que se une a la quimioquina fractalquina y que genera una señal quimio-atrayente al sitio de apoptosis e induce la fagocitosis de restos celulares (Truman et al., 2008). La fagocitosis también puede ser desencadenada por el reconocimiento de opsoninas solubles que se unen a receptores que activan la vía clásica del complemento (Truman et al., 2008), lo que genera una señalización interna en la microglía que activa al factor de transcripción NFκβ y que, además de promover la fagocitosis, induce la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias (Schütze et al., 1992; Erblich et al., 1998).

Los anticuerpos de tipo inmunoglobulina G (IgG) y las proteínas del sistema del complemento, como el factor de complemento 3b (C3b), se unen a los receptores Fc en la membrana de la microglía y al receptor del complemento CR3, respectivamente, mediando así la fagocitosis (Goodridge y Underhill, et al., 2012). También se ha demostrado que moléculas inmunes del complemento C1q, C3 y los receptores CR3 (CD11b/CD18) son moléculas claves que contribuyen a la fagocitosis de neuritas y sinapsis por parte de la microglía (Schafer et al., 2012).

Lo anterior indica que la microglía está involucrada en el mantenimiento y en la organización de las redes neuronales (Wake et al., 2009; Paolicelli et al., 2011; Tremblay, 2011). En un sentido amplio, la microglía no sólo se encuentra monitoreando su entorno (Nimmerjah et al., 2005), sino que también se encarga de remodelarlo a través de la fagocitosis de restos o elementos celulares (Shemer et al., 2015). Además, la microglía libera una variedad amplia de moléculas (Harrison et al., 1998; Kettenmann et al., 2011), que pueden regular la comunicación sináptica y su plasticidad, a través de la modulación funcional de elementos pre y postsinápticos (Paolicelli et al., 2011; Tremblay et al., 2011). En resumen, la microglía puede modular la función de los circuitos neuronales a través de inducir cambios estructurales en los mismos, mediados fundamentalmente por la fagocitosis (Wu et al., 2013); así como a través de la liberación de mediadores microgliales que influyen la función de los componentes de

los circuitos (Schafer et al., 2012). Ambos aspectos serán revisados brevemente a continuación.

2.5.1- Comunicación de la microglía con su entorno y con otros tipos celulares del SNC

La función de la microglía no se limita a monitorear el medio ambiente que la rodea (Nimmerjah et al., 2005). Además de esto, cuenta con una batería de receptores que le permiten mantener a los circuitos neuronales en un estado basal normal (Nimmerjah et al., 2005). Esta comunicación con otras células cerebrales, como astrocitos, neuronas y oligodendrocitos es de suma importancia para que se mantengan la homeostasis requerida en el SNC y que la microglía cumpla con sus funciones de forma adecuada (Butovsky et al., 2006). La comunicación que la microglía establece con otros tipos celulares en el SNC depende del estado (fenotipo) de la misma (Michelucci et al., 2009).

Además de su estado de vigilia, la microglía presenta dos fenotipos generales que se han denominado activación M1 y activación M2 (**Figura 5**) (Michelucci et al., 2009). El fenotipo M1 ha sido descrito como pro-inflamatorio y neurodegenerativo (Kettenmann et al., 2011; Ziebell et al., 2015), mientras el M2, como anti-inflamatorio y neuroprotectivo (Ziebell et al., 2015). De manera interesante, los ratones carentes del receptor CX3CR1 en la microglía no pueden pasar al fenotipo M2, por lo que se sugiere que el receptor CX3CR1 es necesario para la transición a dicho fenotipo (Taylor et al., 2015). Por otra parte, la pérdida del receptor CX3CR1 lleva a una reducción del número de microglía durante la etapa postnatal, lo que conlleva a una deficiencia en la poda sináptica, una débil transmisión sináptica y una conectividad funcional cerebral reducida (Paolicelli et al., 2011; Zhan et al., 2014). Como ya se mencionó, el ligando del receptor CX3CR1, es la fractalquina (CX3CL1) (Ransohoff et al., 2007), que se libera de las neuronas y se encarga de mantener a la microglía en estado no inflamatorio o no neurotóxico (fenotipo M2) (Wolf et al., 2013). La comunicación neurona-microglía, mediada por el sistema CX3CR1-CX3CL1 es importante para mantener la actividad basal de los circuitos neuronales, ya que la activación del receptor a quimioquinas CX3CR1 por su

ligando fractalquina reduce las corrientes postsinápticas mediadas por el receptor tipo AMPA (Ragozzino et al., 2006).

La señalización purinérgica es también una forma de comunicación neurona-microglía (Davalos et al., 2005). Por ejemplo, la activación del receptor neuronal dendrítico tipo NMDA, genera la liberación de ATP, lo cual induce la extensión de los procesos microgliales en rebanadas de hipocampo de ratones (Dissing-Olesen et al., 2014). Otra forma de inducción de la movilización de los procesos de la microglía se genera por la disminución de calcio extracelular (Pozner et al., 2015).

La microglía, al igual que los macrófagos y otras células inmunes, expresa receptores TLR (por las siglas en inglés de *toll like receptors*) (Kettenmann et al., 2011; Smith et al., 2013); que son una familia de receptores que participan en la inmunidad innata y que juegan un papel importante durante la respuesta a la inflamación (Smith et al., 2013). Se ha demostrado que los TLRs reconocen distintos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS, por sus siglas en inglés) (Esen y Kielian 2007). Los TLRs también reconocen patrones moleculares asociados a peligro o daño (DAMPS, por sus siglas en inglés) (Kettenmann et al., 2011; Smith et al., 2013), mismos que son liberados por neuronas necróticas o son productos metabólicos derivados de la hemoglobina (Smith et al., 2013).

En condiciones basales, la microglía también tiene la capacidad de producir factores tróficos para guiar la migración celular, no sólo de sí misma (Shemer et al., 2015), sino de otros tipos celulares (Batchelor et al 2002; Ribeiro et al., 2015). Por ejemplo, en las zonas subventricular y subgranular, los factores tróficos liberados por la microglía ayudan a las neuronas a llegar al lugar donde van a incorporarse como nuevas células, para ejercer sus funciones (Ribeiro et al., 2015). Sin embargo, la microglía también puede producir citoquinas inflamatorias que reducen la supervivencia de las neuronas nuevas (Sierra et al., 2010). La microglía residente de los nichos neurogénicos presenta un fenotipo distinto al resto del SNC (Ribeiro et al., 2015), al tener menor densidad de receptores purinérgicos y, por lo tanto, responder en menor magnitud al ATP del medio que las rodea (Ribeiro et al., 2015). Lo anterior, podría deberse a la gran cantidad de células apoptóticas en la zona subventricular, que liberan ATP (Davalos et al., 2005; Ribeiro et al., 2015), con lo cual aumentan la concentración de

ATP extracelular (Davalos et al., 2005) y, por lo tanto, la actividad fagocítica de la microglía (Davalos et al., 2005; Ribeiro et al., 2015). Todo lo anterior, indica que la microglía no sólo es capaz de monitorear las condiciones de su medio circundante, sino que es capaz de adaptar su fisiología al mismo (Davalos et al., 2005; Ribeiro et al., 2015).

En el SNC, los astrocitos constituyen casi la mitad de las células totales, proporcionando soporte estructural, metabólico y trófico para las neuronas (Pekny y Pekna, 2014). Los astrocitos también pueden funcionar como células inmunocompetentes en el SNC (Dong y Benveniste, 2001). Tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* se ha documentado la capacidad de los astrocitos para producir una amplia variedad de citoquinas, quimioquinas y factores neurotróficos (Dong y Benveniste, 2001). Se cree que los astrocitos desempeñan un papel clave en la perpetuación del proceso inflamatorio disruptivo asociado con enfermedades neurodegenerativas (como la esclerosis múltiple y la enfermedad de Alzheimer) (Verkhatsky et al., 2014). Existe cada vez más evidencia de que la microglía y los astrocitos mantienen comunicación celular estrecha (Perry, 2003).

Sun y colaboradores (2016) encontraron que los ratones knock out (KO) para acuaporina 4 (AQP4) muestran niveles aumentados de gliosis (astrocitos y microgliosis) en respuesta a la inducción de la enfermedad de Parkinson mediante aplicación crónica de MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina). Esto fue acompañado de una mayor actividad basal e inducible de NF- κ B y de un aumento de la producción de IL-1 β y TNF- α en el mesencéfalo. De manera similar, la deficiencia de AQP4 aumenta la activación de la vía NF- κ B y la producción de IL-1 β y TNF- α en cultivos de astrocitos de mesencéfalo tratados con MPP (1-metil-4-fenilpiridinio). Además, la deficiencia de AQP4 promueve la activación de células microgliales en cocultivos con astrocitos. Estos datos proporcionan la primera evidencia de que existen mecanismos por los cuales los astrocitos pueden modular a la microglía en la neuroinflamación (Sun et al., 2016). Estos resultados indican que la activación microglial puede depender de cierta forma de factores liberados por los astrocitos, y que la AQP4 es un modulador de la neuroinflamación a través de la regulación de la

liberación de citoquinas inflamatorias, de ATP en astrocitos y la subsecuente activación de la microglía (Sun et al., 2016).

2.5.2- Activación de la microglía

Como ya se mencionó, la microglía presenta una forma ramificada en el cerebro sano (Lawson et al., 1990; Ashwell et al., 1991; Nimmerjahn et al., 2005; Kettenmann et al., 2011). Sin embargo, estas células pueden alterar rápidamente su morfología para adoptar un estado activado en respuesta a daño cerebral (Perry et al., 2010). Después del contacto inicial con un patógeno o con restos celulares, la microglía se activa, e induce la sobreexpresión de moléculas como el CD11b, molécula de la familia de las integrinas que se une a CD18 para formar al receptor del complemento 3 -CR3 (por sus siglas en inglés) (Scheffel et al., 2012). El CD11b promueve la expresión de moléculas presentadoras de antígeno del complejo principal de histocompatibilidad tipo II (MHC-II, siglas para *Major Histocompatibility Complex type II*) (Tremblay et al., 2011; Scheffel et al., 2012). Estas moléculas presentadoras de antígeno no están expresadas en la microglía vigilante (Wake et al., 2009). La microglía activada también genera la sobreexpresión de la molécula *ionized calcium binding adaptor molecule 1* (Iba1) (Ohsawa et al., 2004), la cual participa en la retracción de la membrana y la fagocitosis por la microglía activada en su fenotipo M1 (Ohsawa et al., 2004). La microglía puede ser activada por diversos estímulos y, dependiendo del estímulo, diferenciarse en uno de sus fenotipos activados (M1 ó M2) (Michelucci et al., 2009). Por ejemplo, la activación de la microglía por citoquinas como el interferón gama (IFN- γ , a bajas concentraciones) y la IL- 4, promueve la diferenciación de la microglía a su fenotipo M2 neuroprotector (Shaked et al., 2004; Butovsky et al., 2006). Lo anterior, ocurre mediante la regulación de los niveles de factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1, por sus siglas en inglés) y del TNF- α . Por el contrario, la estimulación de la microglía por agentes extraños, como el LPS, el péptido beta amiloide, o altas concentraciones de IFN- γ , hacen que la microglía se diferencie en el fenotipo M1 (Butovsky et al., 2005). Además, si la microglía es activada con IL-4, antes de ser activada con LPS, el efecto de la IL-4 impide que el LPS genere la inducción al fenotipo M1 (Scheffel et al., 2012).

La activación aguda o crónica de la microglía no sólo le impide cumplir con las funciones necesarias para mantener el funcionamiento adecuado del SNC (Bilbo and Schwarz, 2012; Huxtable et al., 2013), sino que cuando promueve que adquiera el fenotipo M1 puede iniciar la liberación de moléculas nocivas como las ROS (Colton et al., 1996), las citoquinas pro-inflamatorias (Laflamme et al., 1999; Ransohoff et al., 2007; Ming et al., 2015) y el NO (Colton et al., 1996), que afectan la función del SNC (Bilbo and Schwarz, 2012; Cardoso et al., 2015). La microglía activada también es capaz de liberar glutamato (Pocock y Kettenmann, 2007), el cual puede resultar tóxico para las neuronas, oligodendrocitos, o astrocitos a través del proceso de excitotoxicidad (Kettenmann et al., 2007; Perry et al., 2010). La activación de la microglía la lleva a desarrollar un perfil quimio-atrayente que favorece el reclutamiento de monocitos y linfocitos que exacerban la neuroinflamación (Haüsler et al., 2002). Finalmente, la microglía activada es capaz de fagocitar células endoteliales y causar la desintegración de los vasos sanguíneos, resultando en un rompimiento de la BHE (Jolivel et al., 2015), lo cual aumenta el riesgo de daño al SNC (Huxtable et al., 2011). Por otro lado, y como ya se mencionó, se ha demostrado que la fractalquina, una quimioquina liberada principalmente por las neuronas en el SNC (Harrison et al., 1998; Clark y Mallcangio, 2014), activa el receptor CX3CR1 (Harrison et al., 1998), que se expresa principalmente en microglía en el SNC e induce la liberación de mediadores pro-inflamatorios (Clark y Mallcangio, 2014). A continuación, se describirá brevemente la interacción de la microglía y las neuronas a través del sistema CX3CL1/CX3CR1.

2.5.3- Receptor CX3CR1

La fractalquina (CX3CL1) es una citoquina quimiotáctica (quimioquina) que es expresada y liberada por las neuronas (Harrison et al., 1998; Pan et al., 1997; Maggi et al., 2011; Clark y Mallcangio, 2014), su receptor es el receptor a fractalquina o CX3CR1, expresado principalmente por la microglía (Harrison et al., 1998), astrocitos en cultivo (Maciejewski et al., 1999) y bajo ciertas condiciones muy excepcionales por algunas neuronas (Meucci et al., 2000), en las cuales podrían estar involucrado en interacciones tanto parácrinas como autócrinas entre las neuronas y la microglía (Meucci et al., 2000). En general, el sistema CX3CL1/CX3CR1 es un sistema de

comunicación en el que las neuronas liberan casi de manera exclusiva el CX3CL1 (Pan et al., 1997) y la microglía expresa casi de manera exclusiva el receptor CX3CR1 (Harrison et al., 1998, Bachstetter et al., 2009; Paolicelli et al., 2011; Rogers et al., 2011), estableciendo un sistema de comunicación neurona-microglía muy específico (Harrison et al., 1998).

Para dilucidar el papel fisiológico basal de las interacciones CX3CL1/CX3CR1 se han utilizado ratones carentes (*knockout*) para el receptor CX3CR1 (Ransohoff et al., 2007; Rogers et al., 2011; Maggi et al., 2011; Wolf et al., 2013; Taylor et al., 2015). Los ratones carentes del receptor CX3CR1 son incapaces de evocar la potenciación de largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés), (**Figura 7**) (Paolicelli et al., 2011; Rogers et al., 2011) y tienen aumentada la depresión de larga duración (LTD, por sus siglas en inglés) (Rogers et al., 2011), en comparación con ratones no transgénicos. Por el contrario, los ratones carentes del receptor CX3CR1 no presentan alteraciones en la transmisión sináptica basal, ni cambios en el protocolo de pulsos pareados (Rogers et al., 2011), mismo que reflejaría alteraciones a nivel presináptico (Peña et al., 2002, 2010). En el experimento llevado a cabo por Rogers y cols. (2011), además de demostrar que los ratones KO no pueden generar LTP, demostraron que al agregar el antagonista de los receptores para la IL-1 β , el IL-1ra, ya sea de forma directa sobre la rebanada o en un tratamiento de inyecciones en el ventrículo lateral izquierdo, se recupera la LTP al nivel de los ratones no transgénicos (**Figura 7**), sugiriendo que esta citoquina y su receptor juegan un papel importante para la evocación de fenómenos plásticos mediados por la microglía.

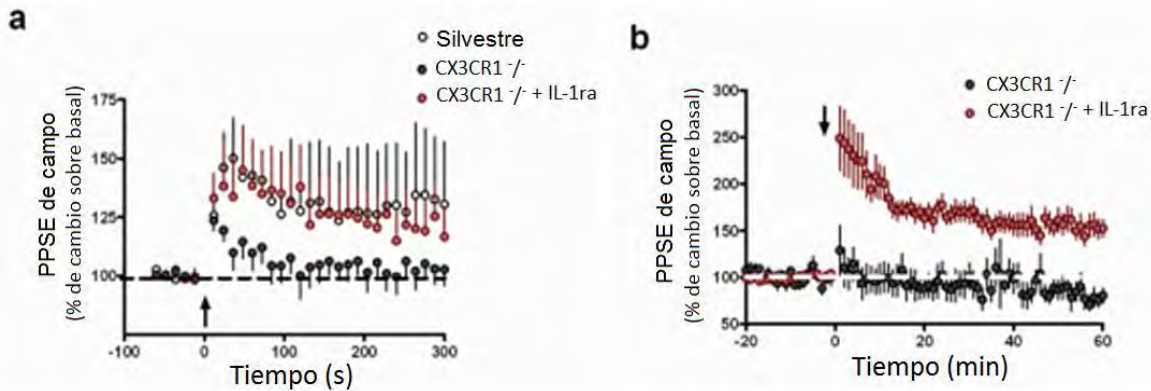


Figura 7. La falta del receptor CX3CR1 impide la generación de la potenciación de largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés). En a) observamos la respuesta de una rebanada de hipocampo tras una estimulación tetánica a 100 hz; de un ratón silvestre (círculos blancos), un ratón transgénico CX3CR1^{-/-} (círculos negros), y un ratón transgénico CX3CR1^{-/-} al que se le agregó el antagonista IL-1ra (círculos rojos). Nótese que el ratón transgénico sin el tratamiento (CX3CR1^{-/-}, círculos negros) es incapaz de generar potenciación posttetánica, contrario a lo que ocurre con el ratón silvestre (círculos blancos), y el ratón transgénico al que se le agregó el antagonista IL-1ra (CX3CR1^{-/-} + IL-1ra, círculos rojos). En b) observamos la respuesta de una rebanada de hipocampo tras aplicar el protocolo de potenciación de largo plazo (LTP, dos trenes de estimulación de 100Hz) del ratón transgénico CX3CR1^{-/-} (sin tratamiento, círculos negros) y el ratón CX3CR1^{-/-} (con tratamiento, se le inyectó el antagonista IL-1ra, en el ventrículo izquierdo del hipocampo). El ratón CX3CR1^{-/-} es incapaz de evocar la LTP, por el contrario, en el ratón que recibió el tratamiento con IL-1ra se revierte el efecto y se recupera la LTP, de manera similar a lo que ocurre en cepas silvestres (Tomado y modificado de Rogers et al., 2011)

El receptor CX3CR1 se encuentra también involucrado en la neurogénesis hipocampal (Bachstetter et al., 2009; Rogers et al., 2011). La cantidad de células positivas a doblecortina (DCX+ por sus siglas en inglés), un marcador específico de células jóvenes que van a diferenciarse en neuronas (Gleeson et al., 1999), es menor en aquellos animales transgénicos que carecen del receptor CX3CR1, comparados con los animales silvestres (Bachstetter et al., 2009; Rogers et al., 2011). Lo mismo se observa para la marca de 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU+, por sus siglas en inglés) en el giro dentado. La marca BrdU+ que normalmente ocurre durante la proliferación celular (Kuhn, et al., 1996), se encuentra reducida en ratones carentes del receptor CX3CR1 (Ransohoff et al., 2011, Taylor et al., 2015) lo cual indica una disminución en neurogénesis. La disminución de la neurogénesis ante la reducción ó carencia de expresión del CX3CR1 (Ransohoff et al., 2007; Rogers et al., 2011) es dependiente de la dosis genética, ya que los animales heterocigotos CX3CR1^{+/-} presentan una expresión de los marcadores neurogénicos significativamente mayor que los

homocigotos CX3CR1^{-/-}, pero una expresión significativamente menor comparada con los animales silvestres CX3CR1^{+/+} (Rogers et al., 2011).

Otros estudios realizados por Ransohoff y cols., (2007) utilizando el ratón transgénico *knockout* homocigoto CX3CR1^{GFP/GFP} y el heterocigoto al CX3CR1^{+GFP} muestran que la falta del receptor CX3CR1 mantiene a la microglía en un estado de liberación de moléculas pro-inflamatorias, como la IL-1 β , correspondiente a un estado activado (Ransohoff et al., 2007). Además, demostraron que estos ratones carentes del CX3CR1 al ser estimulados con la aplicación de LPS intraperitoneal (modelo frecuentemente utilizado para producir neuroinflamación sin interrupción de la barrera hematoencefálica) presentan una expresión aumentada de la IL-1 β (Ransohoff et al., 2007). De nueva cuenta, tanto la activación microglial, como la expresión de la IL-1 β es dependiente de la dosis genética (Ransohoff et al., 2007). La expresión elevada de la IL-1 β está asociada con un aumento de la muerte celular neuronal en el hipocampo (Cardona et al., 2006; Ransohoff et al., 2007) y ésto, su vez, podría estar relacionado con la disminución de marcadores neurogénicos en el hipocampo (Rogers et al., 2011). Lo anterior, permite concluir que el receptor CX3CR1 juega un papel muy importante en la regulación de eventos que son necesarios para mantener la homeostasis dentro del SNC, así como la comunicación entre las neuronas y la microglía; además de ser un elemento importante en el proceso de activación de la microglía (Harrison et al., 1998).

JUSTIFICACIÓN

Se sabe que la liberación de diversas sustancias (como las citocinas pro-inflamatorias) por la microglía puede modular a las neuronas y a la astrogliá circundante (Scholz y Wolf, 2007), que las infecciones sistémicas podrían estar relacionadas con episodios apnéicos (Lieske et al., 2000) y que la microglía es la principal línea de defensa ante la infección dentro del SNC (Tremblay et al., 2011; Sun et al., 2016; Shaked et al., 2004). Para cumplir con su función inmunoprotectora, ésta célula libera una serie de moléculas encargadas de la respuesta inmunológica. Una de las principales citoquinas pro-inflamatorias liberadas por la microglía, es la IL-1 β , la cual se ha relacionado con alteraciones respiratorias durante las apneas recurrentes (Hofstetter y Herlenius 2005). A pesar de que existe evidencia del papel que desempeña la microglía en la modulación de la plasticidad de diferentes circuitos neuronales, como por ejemplo en el hipocampo (Rogers et al., 2011; Paolicelli et al., 2011), aún no se sabe el papel que desempeña esta célula modulando la plasticidad del circuito generador de la respiración (Lorea-Hernández et al., 2016). Por ello, en el presente trabajo nos enfocamos a caracterizar el papel de la activación microglial como un probable modulador de la plasticidad del circuito neuronal encargado de la generación de respiración, el CPB (Smith, 1991), bajo condiciones de HI. Además, determinaremos cambios en la plasticidad del CPB después de la HI cuando eliminamos a la microglía, y qué función desempeña el receptor CX3CR1 en la capacidad del circuito para evocar la LTF, al utilizar animales carentes de dicho receptor. La LTF ha sido utilizada como un acercamiento terapéutico en los desórdenes respiratorios y el entendimiento de los mecanismos sinápticos y celulares que la subyacen, puede servir para establecer acercamientos farmacológicos y no-farmacológicos en el tratamiento de desórdenes respiratorios como por ejemplo las apneas obstructivas del sueño y el síndrome muerte súbita del lactante (Mitchell et al., 2003; Huxtable et al., 2013). Por todo lo anterior, consideramos de suma importancia estudiar si la activación de la microglía posee la capacidad de deprimir ó inhibir la plasticidad del generador de los ritmos respiratorios después de la HI.

4- HIPÓTESIS

- 1) La activación de la microglía deprime la facilitación de larga duración inducida por HI en el CPB.
- 2) La facilitación de larga duración inducida por HI en el CPB depende de la microglía e implica al receptor CX3CR1.

5- OBJETIVOS

Determinar si la modulación de la microglía inhibe la facilitación de larga duración inducida por HI en el CPB, y la participación de su receptor específico CX3CR1 en esta modulación.

5.1- Objetivos específicos

En rebanadas de CPB de ratón:

- 1) Caracterizar la facilitación de larga duración inducida por la hipoxia intermitente.
- 2) Determinar si la activación optogenética de la microglía inhibe la facilitación de larga duración inducida por HI.
- 3) Caracterizar el ritmo respiratorio de los ratones transgénicos CX3CR1^{-/-} y CX3CR1^{+/-} y su capacidad de producir la facilitación de larga duración en respuesta a HI.
- 4) Determinar si el “activador microglial” LPS y la “microgliotoxina” clodronato liposomal afectan la facilitación de larga duración inducida por HI.

6- MATERIALES Y MÉTODOS

6.1- Animales

Para los experimentos con ratones transgénicos se utilizaron animales CX3CR1^{-/+}CRE ChR2-YFP^{-/+}, los cuales fueron obtenidos por retrocruzas de animales homocigotos CX3CR1^{-/-}CRE y ChR2-YFP^{+/+} realizadas en el bioterio del instituto. Además, se utilizaron animales CX3CR1^{-/-} de 5 a 8 días de nacidos, obtenidos de Jackson Laboratories con un fondo genético de ratones C57BL/6J. Por último, los ratones CX3CR1^{-/+} se obtuvieron de retrocruzas de animales CX3CR1^{-/-} con ratones C57BL/6J. Para los experimentos farmacológicos se utilizaron ratones CD1 de 5 a 8 días de nacidos, proporcionados por el bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla. Todos los procedimientos se ajustaron a los lineamientos establecidos por el comité de ética del INB (protocolo número 050) y la Norma Oficial Mexicana para el Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

6.2- Registros *in vitro*

La obtención de las rebanadas de tallo cerebral se realizó bajo protocolos ya descritos previamente (Peña et al., 2008). Brevemente, los animales fueron decapitados y el cerebro fue removido rápidamente y colocado en líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) frío, con un gaseo constante de carbógeno (95% O₂ y 5% O). El LCRA fue preparado con los siguientes ingredientes, en concentración mM: NaCl 119, KCl 3, CaCl₂ 1.5, MgCl₂ 1, NaHCO₃ 25, D-glucosa 30 y un pH de 7.4. Se aisló el tallo cerebral, mismo que fue colocado y pegado sobre un soporte de agarosa. Posteriormente, se inició el corte de rebanadas de 400 µm en un vibratomo Leica VT1000s en dirección rostro-caudal. Una vez observada la apertura del cuarto ventrículo, se realizó un corte de 470 µm (+ 10 µm por cada día de vida postnatal) y, posteriormente, se obtuvo una rebanada de 700 µm de grosor que contenía al CPB. La rebanada se colocó en una cámara de registro con perfusión constante de LCRA con un volumen total de 30 mL y con gaseo constante con carbógeno a una temperatura de 30-32°C (Peña et al., 2004; 2008). Para los registros, se aumentó paulatinamente la

concentración de KCl a una concentración final de 8 mM antes de iniciar el registro (Tryba et al., 2003).

La actividad poblacional del CPB se registró con electrodos de vidrio (0.5 M Ω de resistencia) colocados sobre la superficie de la rebanada a nivel del CPB (Lieske et al., 2000; Blitz y Ramirez 2002, Peña et al., 2004, 2008). La señal se amplificó y filtró (pasa bajas, 0.25 KHz, pasa altas, 5 Hz) utilizando un amplificador de banda ancha (Grass Instruments, Quincy, MA). La señal también se rectificó e integró usando un filtro electrónico (constante de tiempo de 30-50 milisegundos, diseñado por electrónica JFI en la Universidad de Chicago) (Zavala-Tecuapetla et al., 2008, 2014). Una vez que se identificó la actividad rítmica característica del CPB (Tryba et al., 2003; Peña et al., 2004; 2008), se dejó estabilizar la preparación durante una hora. Se inició el registro de campo y se grabó durante 20 minutos un registro basal. Posteriormente, se inició el protocolo de HI (Blitz y Ramirez, 2002). Para inducir las condiciones de hipoxia, se sustituyó el aporte constante de carbógeno, por una mezcla con gas Nitrógeno (95 % N₂, y 5 % CO₂). La preparación se sometió a 3 ciclos de hipoxia (95 % N₂, y 5 % CO₂), de una duración de 5 minutos cada uno, seguidos de la aplicación de normoxia (95 % O₂ y 5 % CO₂) entre cada ciclo de hipoxia de 5 minutos cada uno. En el ciclo final de normoxia, la rebanada permaneció durante una hora (Blitz y Ramirez, 2002).

6.2.1- Activación de la microglía

6.2.1.1- Activación optogenética de la microglía.

Las canalrodopsinas (ChRs) son canales de cationes activados por luz, que median el transporte de iones a través de membranas en microalgas (Watanabe et. al., 2012). La ChR de la *Chlamydomonas reinhardtii* (Canalrodopsina-2; ChR2) se puede expresar de forma estable y segura en las células de mamíferos y se le utiliza para inducir la despolarización neuronal en una metodología llamada optogenética (Boyden et al., 2005). Actualmente, la optogenética puede ser aprovechada para la modulación específica de varios grupos celulares, en los cuales se induce el flujo de cationes en las células que expresan las ChRs al activarlas con longitudes de onda específicas (Boyden et al., 2005). La expresión de la ChR2 se hace específica para un tipo celular con el uso de sistemas de recombinación y/o de promotores genéticos específicos

(Boyden et al., 2005, Watanabe et al., 2012, Asrican et al., 2013, Parkhurst et al., 2013). En el SNC, la microglía es la única célula que, bajo condiciones fisiológicas basales, es capaz de expresar al receptor de fractalquina, el CX3CR1 (Harrison et al., 1998). Debido a esta particularidad, se puede utilizar al promotor del gen que codifica para el receptor CX3CR1 como un medio para expresar a la ChR2 específicamente a la microglía (Parkhurst et al., 2013).

Los ratones transgénicos que expresan ChR2 específicamente en células microgliales, se obtuvieron por retrocruza de dos cepas de ratones transgénicos. Se utilizó un animal homocigoto para la recombinasa CRE expresada bajo el control del promotor del gen del receptor a fractalquina (CX3CR1) que se cruzó con otro animal que contiene la secuencia de la ChR2 asociada a la secuencia de la proteína amarilla fluorescente flanqueada con sitios de recombinación *LoxP* (Parkhurst et al., 2013). Los ratones CX3CR1^{ChR2-YFP/+} obtenidos después de la cruce de las cepas fueron utilizados para los experimentos de activación optogenética de la microglía (**Figura 8**). Las rebanadas fueron obtenidas de la forma ya descrita (Peña et al., 2008), pero bajo condiciones de oscuridad para evitar la activación de la ChR2. Una vez que encontramos la actividad rítmica respiratoria característica del CPB (Tryba et al., 2003; Peña et al., 2004; 2008), se dejó estabilizar la actividad por una hora. Posteriormente, la rebanada se expuso durante 20 minutos a la luz de un led ultra brillante de color azul (450 nm, aproximadamente), y se le dió una hora de recuperación. Finalmente, se aplicó el protocolo de HI (Blitz y Ramirez, 2002)

6.2.1.2- Activación de la microglía con LPS

El Lipopolisacárido (LPS) es el principal patrón molecular asociado a patógeno (PAMP, por sus siglas en inglés), por lo cual es la herramienta farmacológica más utilizada para la activación de la microglía, ya sea a través de una inyección intraperitoneal para producir inflamación sistémica (Huxtable et al., 2013; 2015), utilizándolo directamente sobre cultivos microgliales (Hetier et al., 1988; Sawada et al., 1989; Boje et al., 1992; Nakamura et al., 1999), ó aplicándolo al baño de registro de rebanadas de cerebro (Lorea-Hernández et al., 2016). El LPS es un componente de la pared celular de las bacterias gram negativas y es reconocido por el TLR4 y el CR3 en la superficie de la

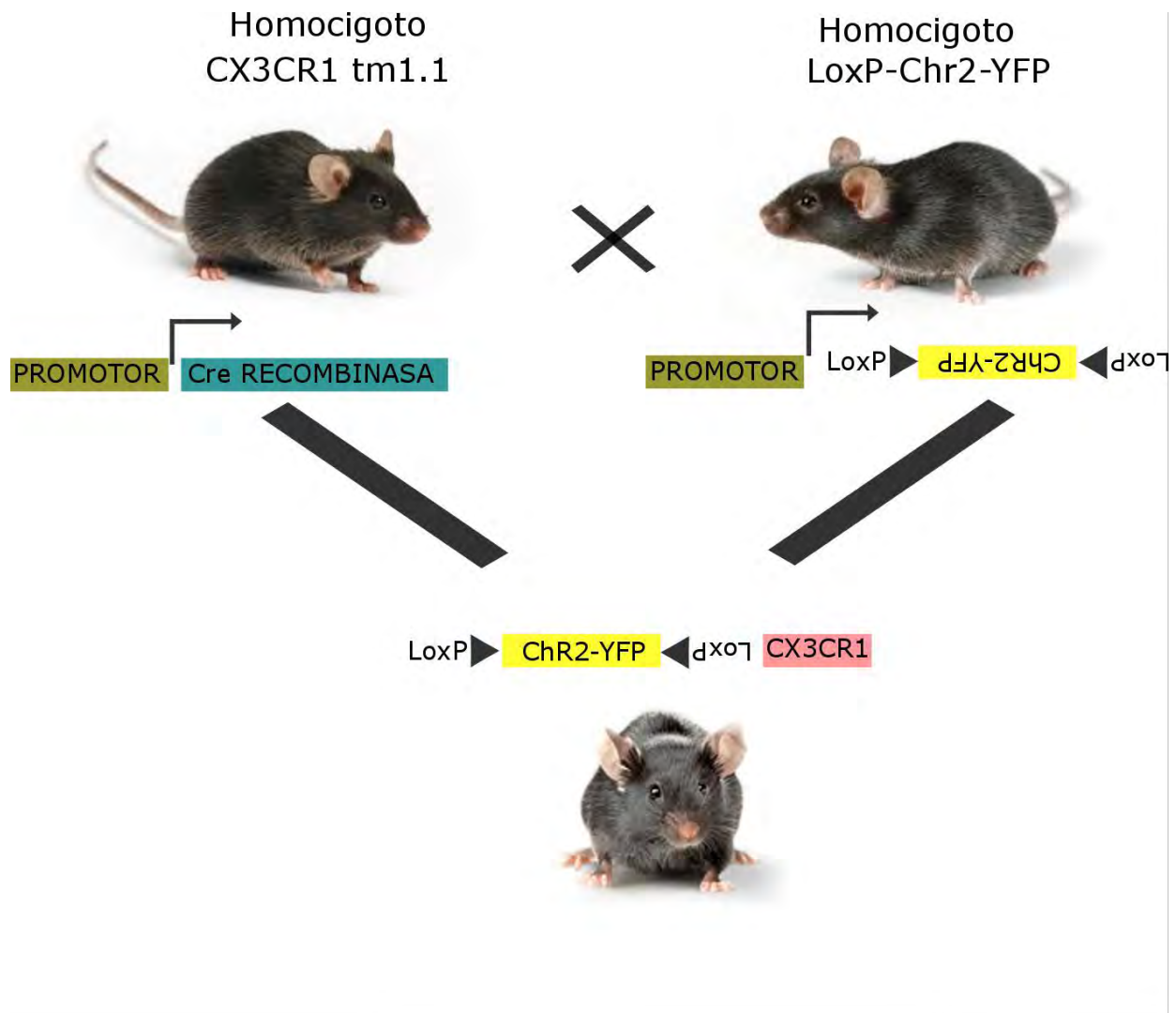


Figura 8. Ilustración esquemática de la expresión dirigida de la canalrhodopsina-2 (ChR2) a través de un enfoque Cre-LoxP. Los ratones transgénicos que expresan a la recombinasa Cre bajo el control del promotor para el receptor de fractalquina en la microglía, se cruzan con un ratón que contienen a los genes que codifican a la ChR2 unida a la proteína amarilla fluorescente (YFP) usada como reportero de su expresión flanqueados por regiones LoxP de. Después de la cruce, sólo las células con Cre-recombinasa expresarán ChR2-YFP. El constructo genético resultante son ratones heterocigotos $CX3CR1^{ChR2-YFP/+}$

microglía (Smith et al., 2013). La activación del TLR4 por el LPS recluta a la proteína adaptadora MyD88 dando como resultado la activación de las vías de señalización NF- κ B y MAPK (Smith et al., 2013; O'Neill et al., 1997). El NF- κ B, es uno de los principales factores de transcripción activados en la respuesta inflamatoria (O'Neill et al., 1997) al inducir la producción de citocinas pro-inflamatorias (Smith et al., 2013). Los astrocitos también poseen los receptores TLR4, pero la microglía es mucho más sensible a LPS ante el cual produce mayor síntesis de TNF- α , de IL1- α , de IL1- β y de especies reactivas de oxígeno (Hetier et al., 1988; Hetier et al., 1988; Boje et al., 1992; Nakamura et al., 1999) en comparación con los astrocitos (Sawada et al., 1989).

El LPS también puede unirse a otros receptores como los receptores atrapadores tipo A (SR-A/CD204), y el receptor atrapadores de clase B (SR-B/CD36) (Biedrón et al., 2016; Peña-Ortega, 2017) y producir una respuesta similar a través de otras vías de señalización que desembocan en la activación de factores de transcripción que inducen la síntesis de moléculas pro-inflamatorias (Hayden et al., 2008, Smith et al., 2012). El papel de los receptores atrapadores CD36 y CD204 se ha descrito como receptores de LPS accesorios que pueden contribuir a la activación pro-inflamatoria (Biedrón et al., 2016)

6.2.2- Eliminación de la microglía con clodronato liposomal

Los liposomas son vesículas lipídicas preparadas artificialmente que consisten en bicapas concéntricas de fosfolípidos que atrapan, en compartimentos internos, a moléculas hidrófilas en solución acuosa (Rooijen y Sanders 1994). Los liposomas han sido utilizados para introducir la microgliotoxina clodronato (diclorometilen-bisfosfonato (Cl2MBP)) al interior de la microglía (Rooijen y Sanders 1994, Rooijen et al., 1996). El clodronato libre no atraviesa las membranas celulares y tiene una vida media extremadamente corta en circulación y en los fluidos corporales (Fleisch, 1988). El clodronato encapsulado en liposomas (clodronato liposomal) es específicamente fagocitado por los macrófagos y la microglía (Rooijen y Sanders 1994, Rooijen et al., 1996). Después de la fagocitosis, la acción lisosómica rompe las bicapas grasas del liposoma y el clodronato libre se expulsa en el interior de la célula, causando un deterioro funcional, un daño irreversible y, eventualmente, apoptosis (Rooijen et al.,

1996). El clodronato liposomal ha sido ampliamente utilizado como un depletador específico de la microglía, en diferentes preparaciones, como cultivos celulares (Rooijen y Sanders et al., 1994; Kumamaru et al., 2012; Ji et al., 2013), *in vivo* (Fulci et al., 2007; Koennecke et al., 1999) o en rebanadas de cerebro (Ji et al., 2013; Lorea-Hernández et al., 2016). Esta técnica (Rooijen y Sanders 1994), ha mostrado ser una herramienta eficiente para la depleción de un gran porcentaje de la población microglial (Rooijen y Sanders 1994, Koennecke et al., 1999, Fulci et al., 2007, Lorea-Hernández et al., 2016), lo que se ha constatado por técnicas inmunohistoquímicas (Fulci et al., 2007, Lorea-Hernández et al., 2016), o por la cuantificación de citocinas pro-inflamatorias como la IL-1 β , la IL-16 (Kumamaru et al., 2012), el TNF- α (Kumamaru et al., 2012, Ji et al., 2013) o la disminución en la liberación de ROS (Ji et al., 2013) después de agregar moléculas que activan a la microglía como el LPS. Todos estos factores hacen al clodronato liposomal una herramienta útil para la eliminación específica de la microglía, y así entender la función de los circuitos neuronales o cultivos celulares en ausencia de la misma, y así determinar cuál es el papel que esta célula desempeña en la función basal de los circuitos neuronales.

En nuestros experimentos, la microglía fue eliminada con clodronato liposomal, preparado en el laboratorio según lo descrito por Rooijen y Sanders (1994). Después de la estabilización por una hora de la preparación, y un registro en condición basal por 20 minutos, se añadió a la solución de perfusión 12.5 μ M de clodronato liposomal, y se registró su actividad por 120 minutos. Se aplicaron 3 ciclos de HI y se reoxigenó la preparación por una hora

7- Análisis de datos

Los registros de campo obtenidos fueron analizados en los paquetes IGOR-Pro (Wavemetrics, lake Oswego, OR) y Clampfit (Axon instruments, Burlingame, CA). Se cuantificó la amplitud y frecuencia de la señal amplificada e integrada. Los valores se normalizaron utilizando como 100 % los registros basales en normoxia, para cada grupo de datos. Para los análisis estadísticos se utilizó el programa Graph Pad Prism 5. Para determinar diferencias significativas entre los grupos, utilizamos inicialmente la

prueba Kruskal Wallis, seguida de la prueba de U de Mann Whitney. Las diferencias se consideraron significativas con una $p < 0.05$.

8- RESULTADOS

8.1- Registro control

Inicialmente, se registró la actividad de campo del circuito generador de la respiración para evaluar su estabilidad a través del tiempo requerido para los experimentos (Fig. 9a). Para ello, después de estabilizar la preparación una hora, se grabó un registro basal por veinte minutos y después se continuó el registro en las mismas condiciones por 4 horas (registros control). El ritmo respiratorio registrado 4 horas después del ingreso de la rebanada al baño de registro muestra una amplitud inalterada (97.2 ± 3.2 % del control; $p > 0.05$; Fig. 9b,c). Lo mismo ocurre para la frecuencia, que no cambia a lo largo del tiempo de registro (104.9 ± 5.8 % del control; $p > 0.05$; Fig. 9b,c). Una vez establecido que la rebanada puede mantener la generación del ritmo respiratorio de manera inalterada por 4 horas, se procedió a inducir la LTF en respuesta a la HI.

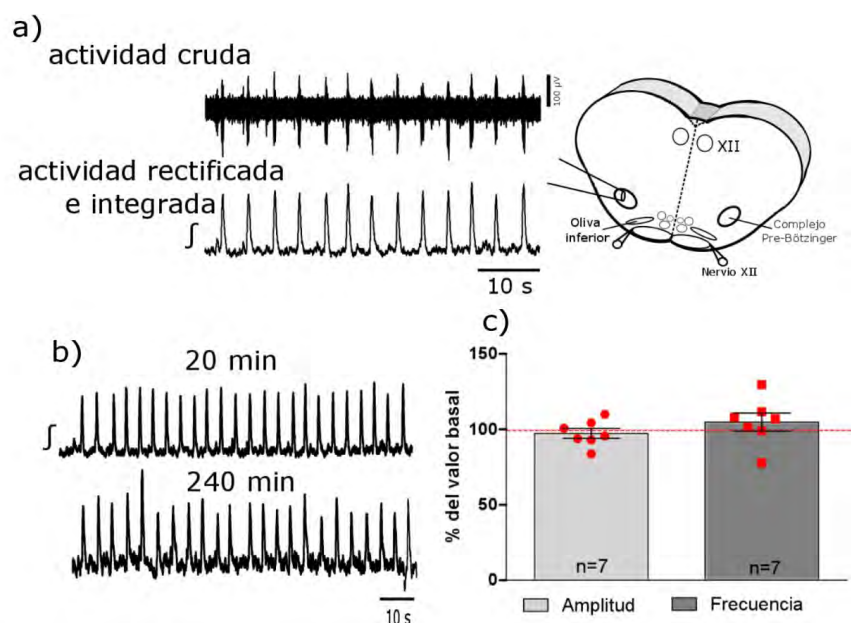


Figura 9. Estabilidad de la actividad de campo del circuito generador de la respiración. En a) observamos un trazo continuo de un minuto, de la actividad del CPB. El trazo superior es la actividad cruda del circuito, mientras que el trazo inferior representa la actividad integrada y rectificadas. A la derecha observamos un esquema de una rebanada de tallo cerebral, señalando el lugar donde colocamos el electrodo de registro y las estructuras que anatómicamente pueden distinguirse en la rebanada, b) se muestran los trazos representativos de la actividad integrada y rectificadas del CPB 20 minutos después de la estabilización (trazo superior) y cuatro horas después del inicio del registro (trazo inferior), c) se muestran los promedios de los valores normalizados (como % de su valor basal) del grupo control (sin tratamiento) en lo que respecta a

la amplitud y la frecuencia de las ráfagas poblacionales producidas por el CPB. No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los dos parámetros cuantificados ($p > 0.05$) con respecto a su valor basal, prueba U de Mann-Whitney.

8.2- Inducción de la LTF en respuesta a la HI

Después de aplicar tres ciclos de HI, los cuales consisten en cinco minutos de hipoxia, seguidos por cinco minutos de normoxia (recuperación), se encontró que la amplitud de las ráfagas poblacionales producidas por el CPB, medidas 60 minutos después de la HI, disminuye significativamente con respecto al grupo control y con respecto a su valor basal, (83.7 ± 5.9 % del control; $p < 0.05$, Fig. 10a,b). Por el contrario, la frecuencia de estas ráfagas, medidas 60 minutos después de la HI, incrementa significativamente, con respecto al grupo control y con respecto a su valor basal (a 178.4 ± 15.7 % del control; $p < 0.05$, Fig. 10a,c). Estos datos son consistentes con lo reportado por Blitz y Ramírez en 2002 en lo que respecta al cambio en la frecuencia, pero no difieren en la amplitud.

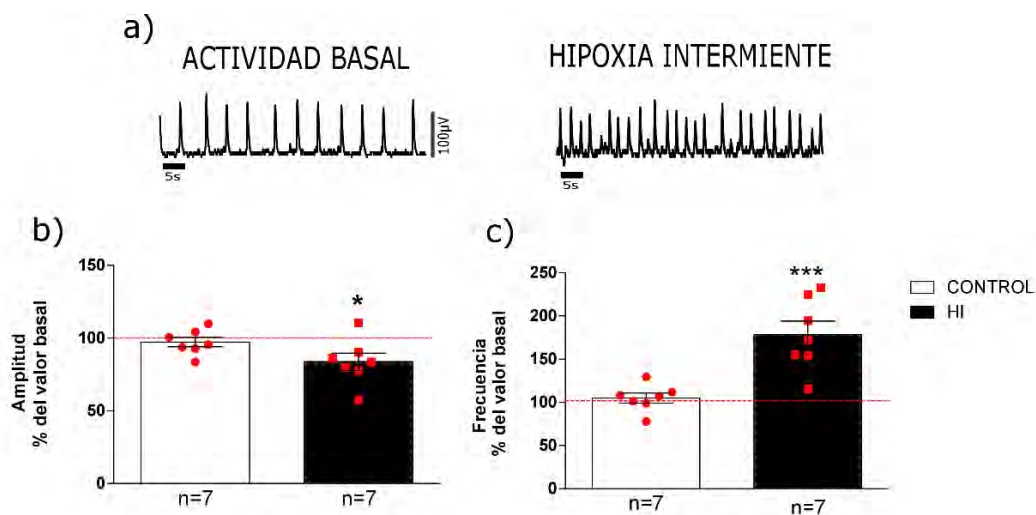


Figura 10. Inducción de la LTF en respuesta a la HI. En a) observamos trazos representativos de la actividad rectificada e integrada del CPB, el trazo de la izquierda representa la actividad basal del circuito, mientras que el trazo de la derecha es la actividad presentada 60 min después de aplicar la HI. Nótese el incremento en la frecuencia de las ráfagas poblacionales producidas por el CPB. b) Se muestran los promedios de los valores normalizados (como % de su valor basal) de la amplitud de las ráfagas poblacionales producidas por el CPB del grupo control (sin tratamiento) y del grupo sometido a la HI. Note que el grupo sometido a HI presenta una disminución en la amplitud de las ráfagas poblacionales producidas por el CPB, y c) se muestran los promedios de los valores normalizados (como % de su valor basal) de la frecuencia de las ráfagas poblacionales producidas por el CPB del grupo control (sin tratamiento) y del grupo sometido a la HI. Note que el grupo sometido a HI presenta un incremento significativo en la frecuencia de las

ráfagas poblacionales producidas por el CPB. Las diferencias significativas con respecto al control se denotan con *($p < 0.05$) y *** ($p < 0.0001$), prueba U de Mann-Whitney.

8.3- Efecto de la activación optogenética de la microglía en la actividad del CPB

Se registró la actividad de campo del circuito generador de la respiración en un modelo de ratón transgénico que expresa la ChR2 en la microglía (Fig. 11a). La expresión de la ChR2-YFP en la microglía fue verificada por medio de microscopía de fluorescencia, antes y después de la exposición a la luz azul (Fig. 11a). Después de aplicar luz azul por 20 minutos, las células que expresan la YFP mostraron un cambio en su morfología, pasando de células ramificadas con procesos que ocupan una gran superficie, a células redondeadas, pequeñas y con ausencia de procesos, lo que caracteriza a las células microgliales después de su activación (Fig. 11a). En cuanto al registro, después de estabilizar la preparación una hora, se grabó un registro basal por treinta minutos; luego se aplicó luz de una longitud de onda de 450 nm, por veinte minutos. Después, se continuó el registro por una hora más y, posteriormente, se aplicó la HI. El ritmo respiratorio registrado una hora después de aplicar 20 minutos de luz de un led azul ultra brillante, muestra una amplitud inalterada, que no es diferente ni del control, ni de su propio valor basal (94.2 ± 24.7 % del control; $p > 0.05$; Fig. 11b,c). Lo mismo ocurre para la frecuencia, que no cambia a lo largo de este tiempo de registro (a 113.7 ± 37.4 % del control; $p > 0.05$; Fig. 11b,c). Después de observar que la activación optogenética específica de la microglía no altera significativamente la generación del ritmo respiratorio (Fig. 11), se procedió a aplicar el protocolo de HI a cada una de las rebanadas en experimentos independientes.

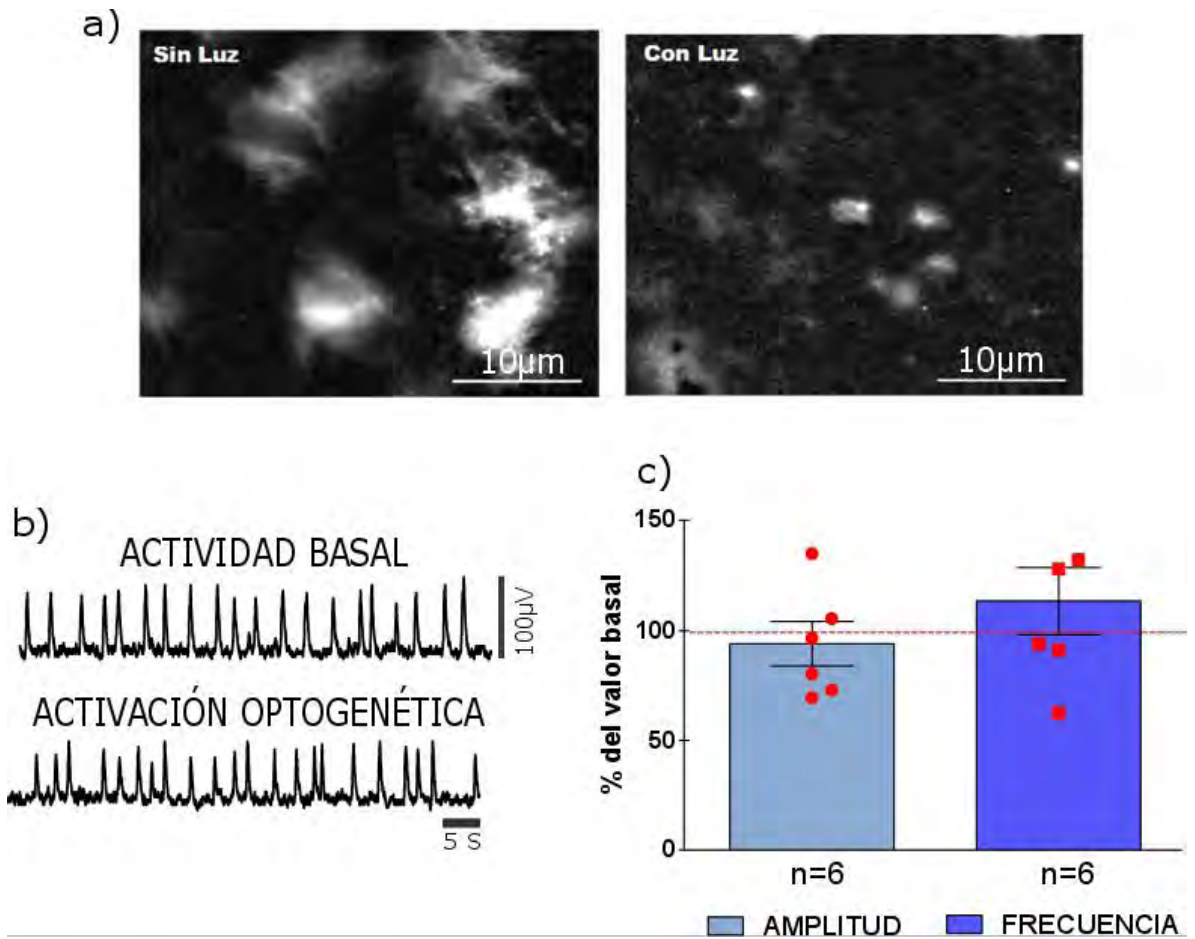


Figura 11. Efecto de la activación optogenética de la microglía sobre la actividad del circuito generador de la respiración en un modelo de ratón transgénico que expresa ChR2 en la microglía. En a) observamos la expresión de la proteína amarilla fluorescente en microglía. A la izquierda se muestra a las células antes de ser expuestas a la luz, y la imagen de la derecha muestra lo que ocurre después de aplicar luz azul (450nm) por veinte minutos. Nótese el cambio en la morfología de las células con expresión de ChR2-YFP, mismas que pasan de células extendidas a células de pequeña y redondas, b) muestra los trazos representativos de la actividad integrada y rectificadas del CPB sesenta minutos después de la estabilización (trazo superior) y sesenta minutos después de la activación optogenética (trazo inferior), c) promedios de los valores normalizados (como % del valor basal) de la actividad del CPB en lo que respecta a la amplitud y la frecuencia de las ráfagas poblacionales, después de la activación optogenética de la microglía. No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los dos parámetros cuantificados con respecto a su valor basal ($p > 0.05$; prueba U de Mann-Whitney).

8.4- Respuesta del CPB ante la HI después de la activación optogenética

Después de una hora de recuperación de la activación optogenética de la microglía, se procedió a aplicar el protocolo de HI. La activación optogenética de la microglía

previene la inducción de la LTF después de la HI. Después de 60 minutos de aplicar el protocolo de HI la amplitud de las ráfagas generadas por el CPB, en rebanadas sujetas a la activación de la microglía con luz azul, no muestra diferencias significativas con respecto a la del grupo control, aunque tampoco con respecto al grupo con HI (92.5 ± 9.8 % del control; $p > 0.05$; Fig. 12a,b). Sin embargo, la amplitud de las ráfagas generadas por el CPB después de la HI es diferente a la de su propio valor basal ($p < 0.05$; prueba U de Mann-Whitney). Por otra parte, con respecto a la frecuencia, la activación optogenética de la microglía produce un bloqueo de la LTF (105.6 ± 29.5 % del control; Fig. 12a,c), pues en este grupo la frecuencia de las ráfagas generadas por el CPB no es diferente a la del grupo control y es menor a la del grupo de ratones sin estimulación optogenética sometidos a HI (178.4 ± 41.6 % del control; $p < 0.05$; Fig. 12a,c).

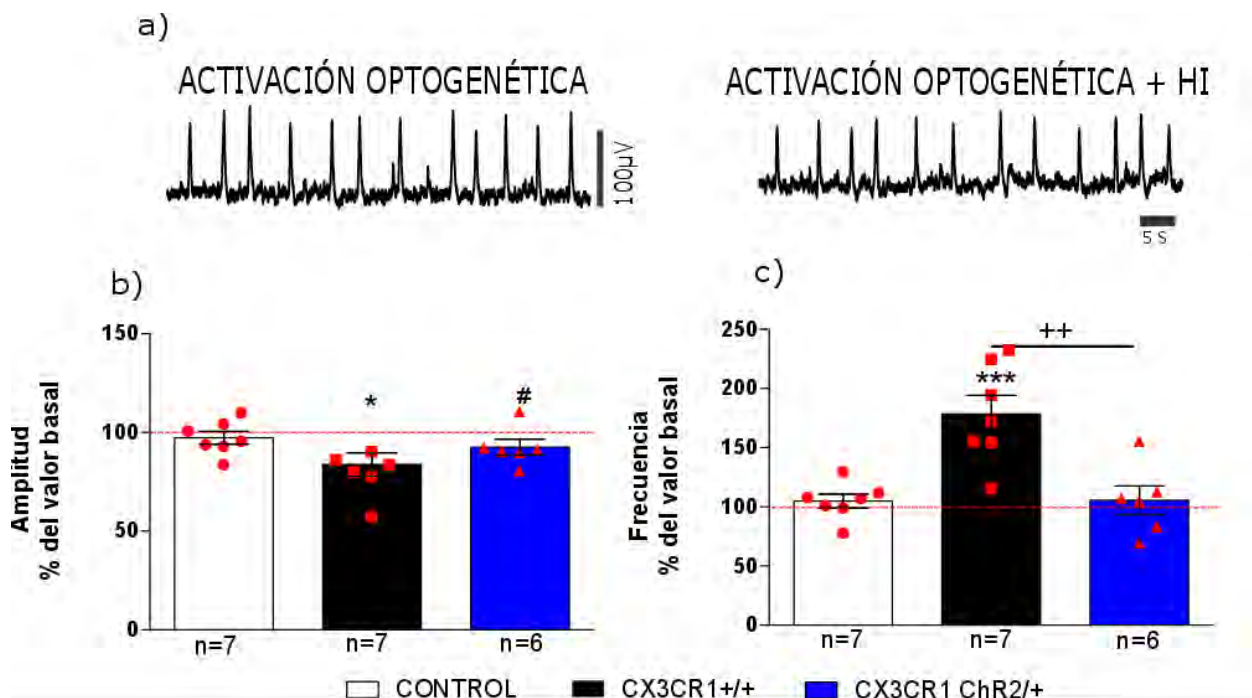


Figura 12. Respuesta del CPB ante la HI cuando la microglía es activada optogenéticamente. En a) se muestran trazos representativos de la actividad del circuito 1 hora después de la activación optogenética microglial (efecto de la luz, trazo derecho), así como de la actividad del circuito después de una hora de recuperación tras la HI (trazo izquierdo), b) y c) muestra la cuantificación del efecto de la HI sobre la amplitud y frecuencias del ritmo respiratorio respectivamente. Se muestran los datos normalizados del grupo control (sin tratamiento; barras blancas) y con HI (barras negras) como % de su valor basal, lo mismo ocurre para los resultados de la activación optogenética de la microglía (barras azules). La amplitud del ritmo respiratorio en presencia de la microglía activada optogenéticamente disminuye con respecto a su basal después de aplicar la HI y no hay un cambio significativo en la frecuencia al compararlo contra su propio valor basal y

contra el grupo control, pero la frecuencia es significativamente menor a la del grupo con HI. # denota una diferencia significativa con respecto a su condición basal (100 %; $p < 0.05$), Las diferencias significativas con respecto al control se denotan con * ($p < 0.05$) y ** ($p < 0.001$). ++ denota diferencias significativas con respecto al grupo con HI ($p < 0.001$), prueba U de Mann-Whitney.

8.5- Actividad basal del CPB en un modelo transgénico carente del CX3CR1

Se registró la actividad de campo del circuito generador de la respiración en un modelo de ratón transgénico homocigoto carente del receptor de fractalquina (CX3CR1^{-/-}) para evaluar su estabilidad a través del tiempo. Para ello, después de estabilizar la preparación una hora, se grabó un registro basal por treinta minutos y después se continuó su registro por 60 minutos adicionales. El ritmo respiratorio registrado por noventa minutos después del ingreso de la rebanada al baño de registro muestra una amplitud inalterada (96.1 ± 4.5 % del control; $p > 0.05$; Fig. 13a,c). Lo mismo ocurre para la frecuencia, que no cambia a lo largo del tiempo de registro (108.3 ± 12.4 % del control; $p > 0.05$; Fig. 13a,c). En experimentos independientes, se evaluó la actividad de campo del CPB en ratones transgénicos carentes del receptor de fractalquina heterocigóticamente (CX3CR1^{+/-}). En estos animales, no se encontraron diferencias significativas ni en la amplitud de las ráfagas inspiratorias generadas por el CPB (98.5 ± 4.4 % del control; $p > 0.05$; Fig. 12d) ni en su frecuencia (a 115.9 ± 28.2 % del control; $p > 0.05$; Fig. 13d). Una vez establecido que las rebanadas de tallo cerebral que contienen el CPB y que provienen de ratones transgénicos carentes del receptor de fractalquina (CX3CR1^{-/-} y CX3CR1^{+/-}) pueden mantener la generación del ritmo respiratorio de manera inalterada por noventa minutos, se procedió a aplicar el protocolo de HI a cada una de las rebanadas en experimentos independientes.

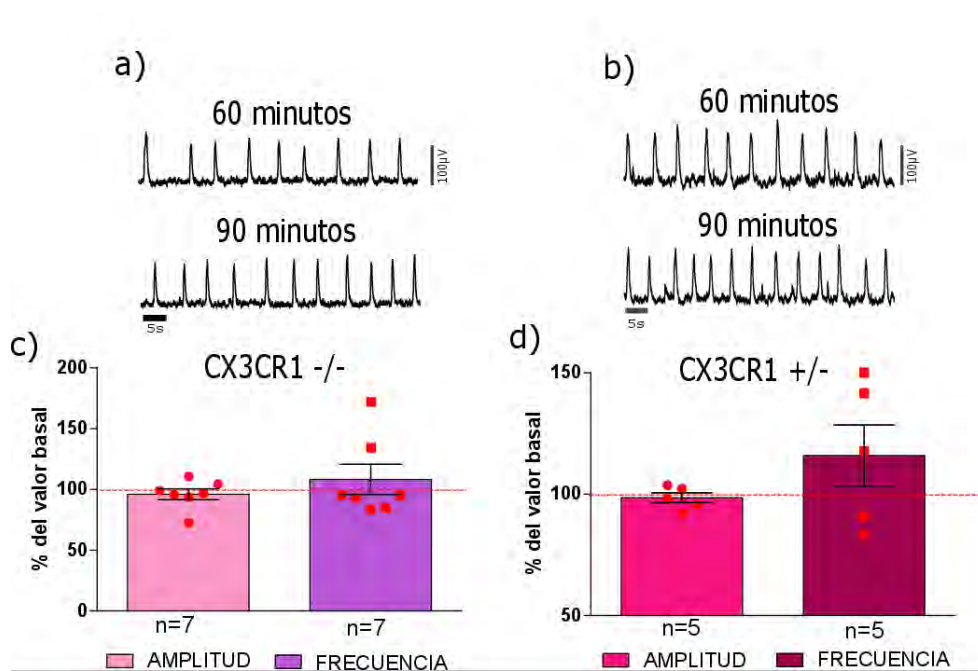


Figura 13. Estabilidad de la actividad de campo del circuito generador de la respiración en un modelo de ratón transgénico carente del receptor de fractalquina (CX3CR1^{-/-}). En a) se muestran los trazos representativos de la actividad integrada y rectificada del CPB a los sesenta minutos después de la estabilización (trazo superior) y 90 minutos después (trazo inferior) de los homocigotos carentes del receptor a fractalquina (CX3CR1^{-/-}), b) muestra los trazos representativos de la actividad integrada y rectificada del CPB a los sesenta minutos después de la estabilización (trazo superior) y treinta minutos después (trazo inferior) de los heterocigotos para el receptor a fractalquina (CX3CR1^{+/-}), c) y d) se muestran los promedios de los valores normalizados (como % de su valor basal) de la actividad basal del CPB de los transgénicos en lo que respecta a la amplitud y la frecuencia de las ráfagas poblacionales producidas por el CPB. No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los dos parámetros cuantificados con respecto a su valor basal ($p < 0.05$; 100% del valor basal; prueba U de Mann-Whitney) y en ninguno de los dos tipos de ratones (CX3CR1^{-/-} y CX3CR1^{+/-}).

8.6- Respuesta del CPB ante la HI en los modelos de ratones transgénicos CX3CR1^{-/-} y CX3CR1^{+/-}

Una vez que se estableció que la actividad del CPB permanece inalterada tanto en amplitud como en frecuencia en rebanadas de tallo cerebral de ratones que carecen del receptor CX3CR1 se procedió a aplicar la HI a los dos grupos de ratones transgénicos. El ritmo respiratorio registrado después de aplicar la HI en ratones CX3CR1^{-/-} muestra una disminución en la amplitud (a 83.7 ± 13.2 % del control; $p < 0.05$; Fig. 14c) con respecto al grupo control y a su propio valor basal, pero no con respecto al grupo con HI. Esta disminución de la amplitud es similar a la observada en animales control

después de la HI. Lo mismo ocurre para ratones $CX3CR1^{-/+}$ (a 72.8 ± 8.9 % del control; $p < 0.05$; Fig. 14c). De manera interesante, para el caso de la frecuencia de las ráfagas generadas por el CPB después de la HI los animales $CX3CR1^{-/-}$ mostraron una disminución de larga duración (a 84.1 ± 19.7 % del control; $p < 0.0001$; prueba U de Mann-Whitney; Fig. 14d) que es opuesta a la observada en animales control después de la HI (de 178.4 ± 41.6 % del control; $p < 0.05$; Fig. 14d) y que no se observó en animales $CX3CR1^{-/+}$ (94.4 ± 23.8 % del control; $p < 0.001$; Fig. 14d).

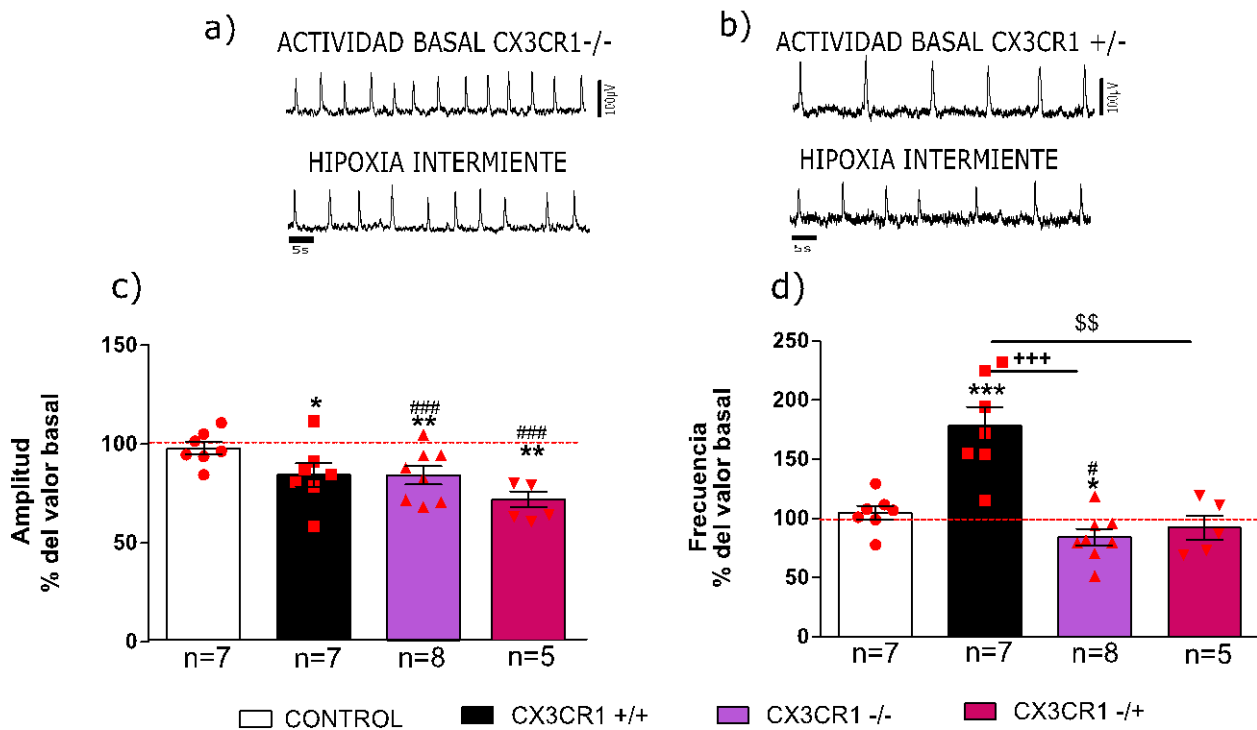


Figura 14. Respuesta del circuito generador de la respiración a la HI en ratones transgénicos $CX3CR1^{-/-}$ y $CX3CR1^{-/+}$. En a) y b) se muestran los trazos representativos de la actividad integrada y rectificada del CPB a los sesenta minutos después de la estabilización de la actividad de la rebanada (trazos superiores) y en los trazos inferiores, la respuesta después de una hora de recuperación post-HI, para los animales $CX3CR1^{-/-}$ y $CX3CR1^{-/+}$, respectivamente, c) y d) muestran los promedios de los valores normalizados para la amplitud y frecuencias, respectivamente, en los diferentes grupos (como % de su valor basal) después de la HI, de los grupos de ratones transgénicos $CX3CR1^{-/-}$ (n=8), $CX3CR1^{-/+}$ (n=5) y los grupos control. Ambos grupos transgénicos son diferentes de su propio valor basal ($p > 0.05$; 100% del valor basal; prueba U de Mann-Whitney) y del grupo control, para la amplitud y sólo el grupo de ratones transgénicos $CX3CR1^{-/-}$ (n=8) es diferente de todos los grupos y muestra una disminución de larga duración en a frecuencia. +++ denota una diferencia significativa con respecto al grupo con HI (100 %; $p < 0.0001$), \$\$ denota una diferencia significativa con respecto al grupo con HI (100 %; $p < 0.001$).

Las diferencias significativas con respecto al control se denotan con * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.001$) y *** ($p < 0.0001$).

8.7- Efecto del LPS sobre la actividad basal del CPB

Una vez establecido que la activación específica de la microglía con optogenética afecta la LTF, se procedió a activar a la microglía con la herramienta farmacológica clásica LPS (200ng/mL) (Lorea-Hernández et al., 2015). La aplicación de LPS disminuye la amplitud del ritmo respiratorio (a $79.9 \pm 10.8\%$ del control; $p < 0.05$; Fig. 15b), comparada tanto con la del grupo control, como la de su propio valor basal. Por otra parte, la aplicación de LPS no afecta la frecuencia del ritmo respiratorio ($184.6 \pm 39.6\%$ del control; $p > 0.05$; Fig. 15c).

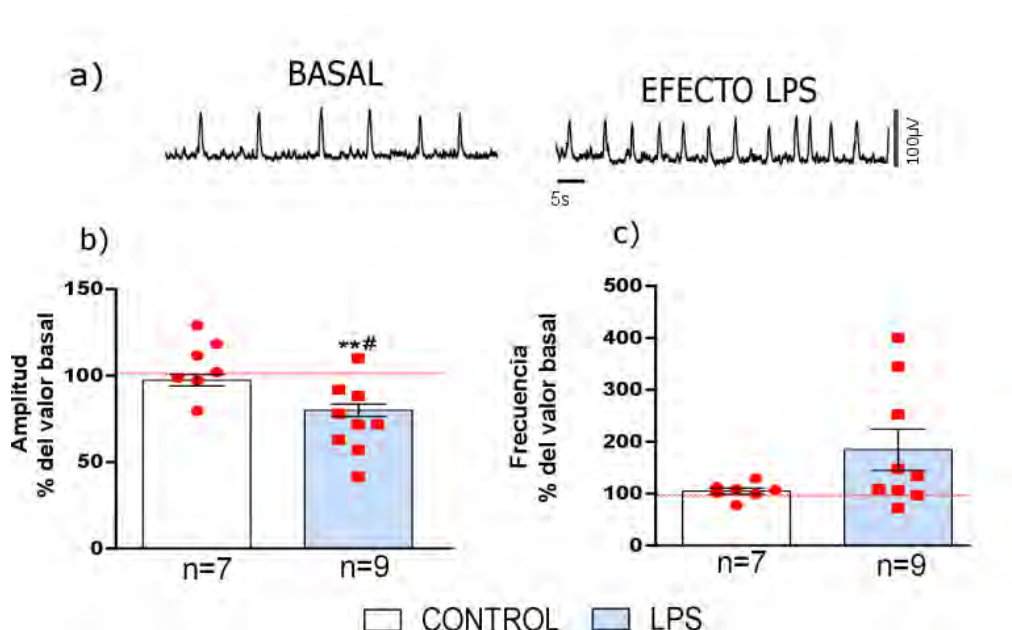


Figura 15. Efecto del LPS sobre la amplitud y la frecuencia de la actividad del generador de la respiración. En a) se muestran trazos representativos de la actividad basal (trazo izquierdo) y de la respuesta del circuito a la aplicación de LPS después de dos horas de incubación (trazo derecho), b) se muestran los datos normalizados de la amplitud del grupo control (sin tratamiento) y la amplitud en presencia de LPS 200ng/mL (como % de su valor basal). La amplitud del ritmo respiratorio en presencia de LPS disminuye significativamente cuando se le compara contra su propio control (previo a la aplicación de LPS), y también es menor con respecto a la amplitud de las rebanadas del grupo control (rebanadas no tratadas). c) muestran los datos normalizados de la frecuencia del grupo control (sin tratamiento) y la frecuencia en presencia de LPS 200ng/mL (como % de su valor basal). La frecuencia del ritmo respiratorio en presencia de LPS no es significativamente modificada. # denota una diferencia significativa con respecto a su condición basal (100 %; $p < 0.05$), ** denota una diferencia significativa con respecto al grupo control ($p < 0.001$) prueba U de Mann-Whitney.

8.8- Respuesta del CPB ante la HI cuando la microglía es activada con LPS

Después de la estabilización del efecto del LPS se aplicó el protocolo de HI. La aplicación de la HI después de la incubación con LPS no afecta la amplitud del ritmo respiratorio (86.9 ± 14 % del control; $p < 0.05$; Fig. 16b) y aumenta su frecuencia (a 117.4 ± 16.3 % del control; $p < 0.05$; Fig. 16c). Sin embargo, este incremento en la frecuencia del ritmo respiratorio es menor al que genera la HI en el grupo control ($p < 0.05$; Fig. 16c)

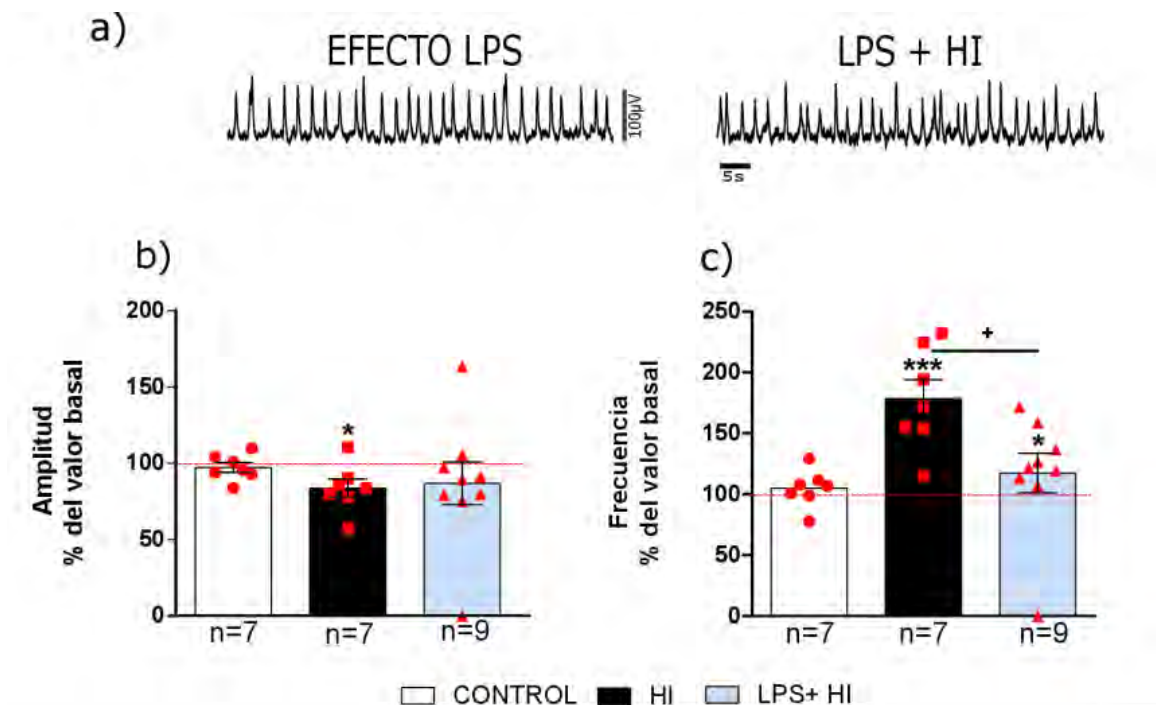


Figura 16. Respuesta del CPB ante la HI cuando la microglía es activada farmacológicamente. En a) se muestran trazos representativos de la actividad del circuito después de 2 horas de incubación con LPS (trazo derecho) y de la respuesta del circuito una hora después de la aplicación de LPS+HI (trazo izquierdo), b) se muestra la cuantificación del efecto de la HI sobre la amplitud del ritmo respiratorio. Se muestran los datos normalizados del grupo control (sin tratamiento, n=7), el grupo HI (n=7) y el grupo LPS+HI (n=7) como % de su valor basal. La amplitud del ritmo respiratorio en presencia de LPS después de aplicar HI no varía. c) muestra la cuantificación del efecto de la HI sobre la frecuencia del ritmo respiratorio. Se muestran los datos normalizados del grupo control (sin tratamiento, n=7), el grupo HI (n=7) y el grupo LPS+HI (n=7) como % de su valor basal. La frecuencia del ritmo respiratorio en presencia de LPS después de aplicar HI aumenta con respecto a su propio control, pero este aumento es menor al observado en el grupo HI. Las diferencias significativas con respecto al control se denotan con * ($p < 0.05$) y ** ($p < 0.001$) prueba U de Mann-Whitney. + denota una diferencia significativa con respecto al grupo HI ($p < 0.05$).

8.9- Efecto del clodronato liposomal sobre la actividad basal del generador de la respiración

Después de la aplicación del fármaco activador de la microglía, se procedió a eliminar la microglía y observar el efecto sobre la actividad del circuito, en condiciones basales y en respuesta a la HI. Para ello, en experimentos independientes, se utilizó el fármaco clodronato liposomal (Lip-CLO) (Lorea-Hernández et al., 2016), mismo que degenera a la microglía como puede ser observado en la figura 16.

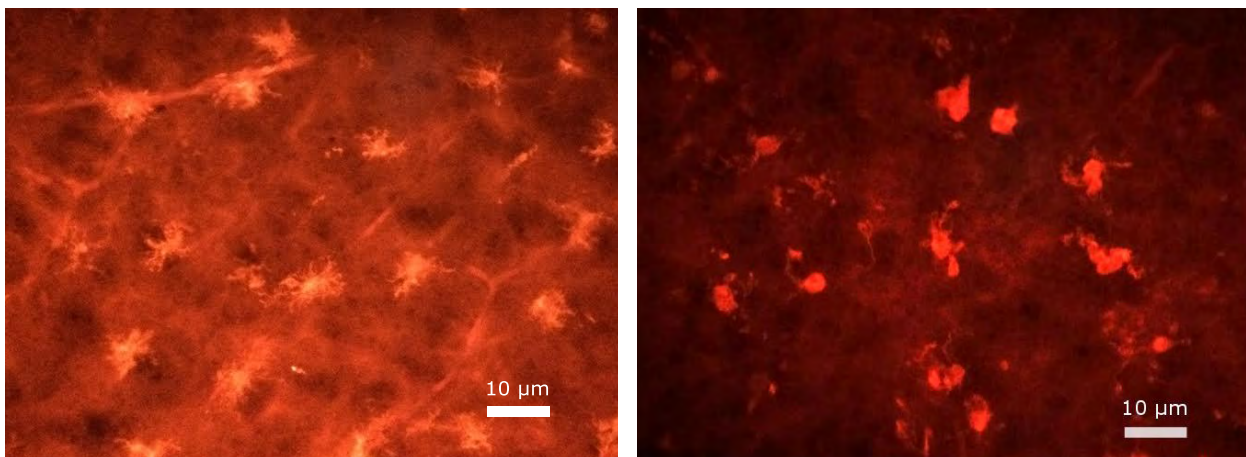


Figura 16. Efecto de clodronato liposomal sobre la microglía. Se observa la expresión de la marca inmunohistoquímica de Iba-1 por la microglía antes (izquierda) y 4 horas después (derecha) de la aplicación de clodronato liposomal. Nótese el cambio en la morfología de las células después de la aplicación de fármaco.

Esta degeneración se caracteriza por la pérdida de los procesos microgliales y la compactación del soma (Fig. 16; Raghuraman et al., 2016). Después de una hora de estabilización de la actividad basal del circuito, se aplicó el fármaco Lip-CLO y se dejó estabilizar su efecto por 2 horas. La aplicación de Lip-CLO disminuye significativamente la amplitud del ritmo respiratorio (a $73.3 \pm 4.8\%$ del control; $p < 0.001$; Fig. 17b), mientras que aumenta su frecuencia (a $135.0 \pm 7.8\%$ del control; $p < 0.05$; Fig. 17c.). En ambos casos, existen diferencias significativas en comparación con su propio basal (100 % del valor basal; $p < 0.05$; Fig. 17b,c)

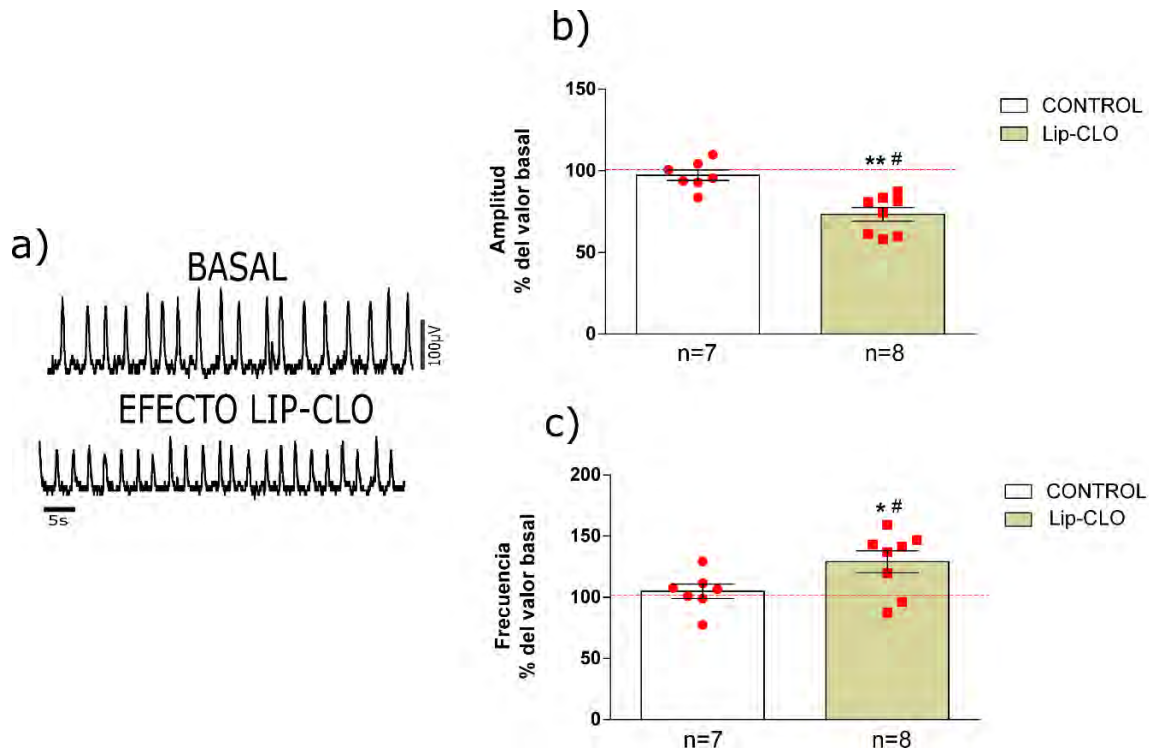


Figura 17. Efecto de un depletador de la microglía sobre la amplitud y la frecuencia del ritmo respiratorio. En a) se muestra el trazo representativo de la actividad basal del circuito (trazo superior, previo a la aplicación del fármaco) y de la respuesta del circuito a la eliminación de la microglía con Lip-CLO, después de dos horas de incubación (trazo inferior), b) se cuantifica el efecto del Lip-CLO sobre la amplitud del ritmo respiratorio. Se muestran los datos normalizados del grupo control (sin tratamiento) como 100% de su valor basal y lo mismo ocurre para los resultados de Lip-CLO. La amplitud del ritmo respiratorio en presencia del Lip-CLO disminuye significativamente, respecto a su propio valor basal respecto al grupo control y c) se cuantifica el efecto del sobre la frecuencia del ritmo respiratorio. Se muestran los datos normalizados del grupo control (sin tratamiento) como 100% de su valor basal y lo mismo ocurre para los resultados del Lip-CLO. La frecuencia del ritmo respiratorio en presencia del Lip-CLO aumenta significativamente cuando se le compara contra su propio control (previo a la aplicación de Lip-CLO), y también cuando se le compara contra el grupo control (rebanadas no tratadas). # denota una diferencia significativa con respecto a la condición basal (100 %; $p < 0.05$). Las diferencias significativas con respecto al control se denotan con * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.001$).

8.10- Respuesta del CPB ante la HI cuando la microglía es eliminada

Después de la estabilización del efecto del fármaco depletador de la microglía, se procedió a aplicar el protocolo de HI. La aplicación de la HI después de aplicar el Lip-CLO no genera cambio alguno ni en la amplitud (88.1 ± 5.9 % del control; $p > 0.05$; Fig. 18b), ni en la frecuencia del ritmo respiratorio (a 109.2 ± 5.4 % del control; $p > 0.05$; Fig.

18c). La amplitud de este grupo experimental después de la HI es significativamente menor a la observada en el grupo con HI ($p < 0.05$; Fig. 18b,c).

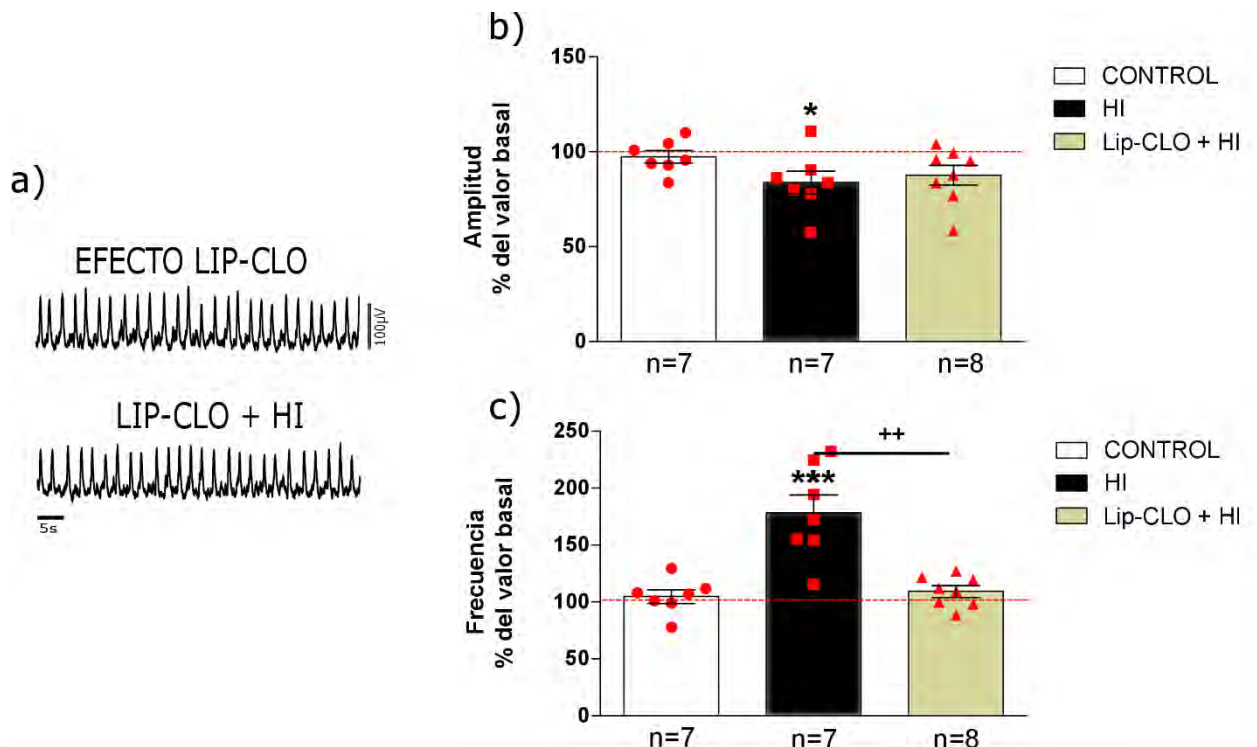


Figura 18. Respuesta del CPB ante la HI cuando la microglía es eliminada. En a) se muestran trazos representativos de la actividad del circuito después de 2 horas de incubación con clodronato liposomal (Lip-CLO, trazo superior) y de la respuesta del circuito una hora después de la aplicación de Lip-CLO+HI (trazo inferior), b) se cuantifica el efecto de la HI y del Lip-CLO+HI sobre la amplitud del ritmo respiratorio. Se normalizaron los datos con respecto al 100% de su valor basal. El grupo con Lip-CLO+HI no muestra cambios en la amplitud, misma que es menor a la registrada en el grupo con HI y c) se cuantifica el efecto de la HI y del Lip-CLO+HI sobre la frecuencia del ritmo respiratorio. Se normalizaron los datos con respecto al 100% de su valor basal. El grupo con Lip-CLO+HI no muestra cambios en la frecuencia, misma que es menor a la registrada en el grupo con HI. ++ denota una diferencia significativa con respecto al grupo con HI (100 %; $p > 0.001$), Las diferencias significativas con respecto al control se denotan con * ($p < 0.05$), ** ($p > 0.001$), prueba U de Mann-Whitney.

9- DISCUSIÓN

Los resultados muestran que la aplicación de un protocolo de HI a rebanadas de tallo cerebral que contienen al CPB producen una LTF *in vitro*, que se caracteriza por un aumento de la frecuencia del ritmo respiratorio acompañado de una disminución de su amplitud. La activación específica de la microglía, por medio de optogenética, deprime esta LTF *in vitro*. Además, la ausencia total del receptor CX3CR1, no sólo evita la LTF *in vitro*, sino que genera una disminución de larga duración de la frecuencia del ritmo respiratorio. Por su parte, la reducción parcial de la expresión de dicho receptor (como la que se presenta en los animales heterocigotos CX3CR1^{+/-}), inhibe la LTF *in vitro*. Finalmente, el bloqueo de la LTF *in vitro* también se observó al aplicar el inmunógeno LPS, que se ha utilizado clásicamente como un activador de la microglía (Peña-Ortega, 2017). Interesantemente, en contra de lo esperado, la microgliotoxina clodronato liposomal (Lorea-Hernández et al., 2016), también inhibe la LTF *in vitro*.

La aplicación de la HI al CPB *in vitro* produjo un aumento en la frecuencia del ritmo respiratorio de manera similar a lo reportado por Blitz y Ramirez en la misma preparación (2002). De hecho, el protocolo utilizado en nuestros experimentos es idéntico al utilizado por ellos. El que la LTF inducida por la HI se refleje en un aumento en la frecuencia del ritmo respiratorio no es un fenómeno exclusivo de preparaciones *in vitro* como la rebanada de tallo cerebral (Blitz y Ramirez, 2002) o preparaciones *in situ* de animales descerebrados (Tadjalli et al., 2007), sino que también ha sido reportado *in vivo* en roedores neonatos anestesiados (Reid y Solomon, 2014), en ratas despiertas de 2 meses de edad (McGuire y Ling, 2005), en ratas adultas anestesiadas (Bach y Mitchell, 1996; 2000; Baker y Mitchell 2000; Baker-Herman y Mitchell 2002; Peng y Prabhakar 2003; Golder y Mitchell 2005; Doperalski y Fuller 2006; Zabka et al. 2001; 2003; 2005; 2006; MacFarlane y Mitchell 2007; Mahamed y Mitchell 2008; Baker-Herman y Mitchell, 2008), así como en ratas adultas (McGuire et al. 2002; 2003; 2004; McGuire y Ling 2005) y en ratones adultos (Hickner et al., 2014) despiertos. Sin embargo, es importante mencionar que la mayoría de los reportes de LTF inducida en animales adultos no se asocian a cambios notables (mayores al 15 %) en la frecuencia (Bach and Mitchell, 1996; Mitchell et al., 2001; Baker-Herman y Mitchell, 2008; Ryan

and Nolan, 2009). Una posibilidad que explique los cambios en frecuencia durante la LTF observados en nuestro estudio y en los de otros investigadores también llevados a cabo en animales neonatos (Blitz y Ramirez, 2002; Reid y Solomon, 2014) es, justamente, diferencias en la circuitería asociadas con la edad. Es bien sabido que los circuitos neuronales involucrados en la generación y el control de la respiración sufren de cambios durante el desarrollo posnatal, que incluyen cambios en las propiedades intrínsecas y sinápticas de las neuronas respiratorias (Viana et al., 1995; Gozal et al., 2001). Lo anterior, por supuesto, influencia la respuesta diferencial de los circuitos respiratorios a distintas condiciones de hipoxia durante el desarrollo posnatal (Jacobi y Thach, 1989; Fewell et al., 2000; Gozal et al., 2002; Ramirez et al., 1996; Peña et al., 2008) y pudiera contribuir a las diferencias en la LTF que se observan en nuestro estudio comparado con lo obtenido con animales adultos. Otra posibilidad de por qué observamos una respuesta en la frecuencia durante la LTF *in vitro*, misma que no es tan comúnmente observada *in vivo* (McGuire y Ling, 2005; Reid y Solomon, 2014; Hicker et al., 2014), es que la influencia vagal *in vivo* ejerce una retroalimentación negativa muy poderosa que puede ser capaz de “enmascarar” el incremento en la frecuencia respiratoria *in vivo*, en condiciones donde la amplitud de la inspiración ha aumentado en respuesta a la HI (Mateika and Fregosi, 1997; Baker-Herman y Mitchell, 2008). De hecho, otro hallazgo novedoso de nuestros experimentos es que la LTF *in vitro* cursa con un decremento en la amplitud del ritmo respiratorio, que es un cambio contrario a lo observado *in vivo* (Bach y Mitchell, 1996; Mitchell et al., 2001; Baker-Herman y Mitchell, 2008; Ryan y Nolan, 2009).

Como ya se mencionó, contrario a lo observado en nuestros experimentos, el rasgo más común de la LTF *in vivo* es un aumento en la amplitud (mayor al 60 %) de los esfuerzos inspiratorios, ya sean registrados directamente de las salidas motoras inspiratorias o de la actividad diafragmática (Bach y Mitchell, 1996; 2000; Baker y Mitchell 2000; Mitchell et al., 2001; Doperalski y Fuller 2006; Zabka et al. 2001; 2003; 2005; 2006; MacFarlane y Mitchell 2007; Baker-Herman y Mitchell, 2008; Mahamed and Mitchell 2008; Ryan y Nolan, 2009). De hecho, como también ya se mencionó, debido a los mecanismos de retroalimentación negativa tanto periféricos, como centrales, es muy probable que este aumento en amplitud de la inspiración restrinja el

probable aumento en la frecuencia producido por la HI *in vivo* (Mateika y Fregosi, 1997; Reid y Solomon, 2014). La explicación de cómo es posible que la LTF *in vivo* se manifieste como un aumento en la amplitud de los esfuerzos inspiratorios cuando muy probablemente los comandos generados por el CPB se reducen en amplitud, se basa en las observaciones de que la HI induce cambios plásticos potenciadores directamente sobre las salidas motoras (McGuire et al., 2005), lo que pudiera compensar, e incluso sobrepasar, una disminución de los comandos motores y pre-motores (Xing et al., 2013). Por ejemplo, se ha observado que la HI aumenta la eficiencia de la transmisión glutamatérgica que reciben las motoneuronas respiratorias (Füller et al., 2003) y la neuromodulación serotoninérgica a estas mismas motoneuronas (Golder y Mitchell, 2005). Además, un aumento en la excitabilidad de las motoneuronas facilita la LTF *in vivo* (Sandhu et al., 2010). Otra posibilidad, que no se excluye con la anterior, es que la HI aumenta la actividad de circuitos pre-motores más allá del CPB (EIMallah et al., 2016), lo que pudiera compensar la disminución de la amplitud de los comandos de salida del CPB durante la LTF. De esta manera, a pesar de la disminución en la amplitud de la actividad poblacional en el CPB durante la LTF, es probable que la potenciación simultánea en circuitos premotores y en las motoneuronas respiratorias mismas sean los responsables del aumento de la amplitud a nivel sistémico (Füller et al., 2003; Golder y Mitchell, 2005; EIMallah et al., 2016).

El aumento en la frecuencia acompañado de la disminución de la amplitud del ritmo respiratorio durante la LTF *in vivo* no es un fenómeno excepcional. De hecho, existen varios procesos de neuromodulación del CPB que involucran un aumento en la frecuencia del ritmo respiratorio acompañado de una disminución de la amplitud de sus ráfagas poblacionales (Shao y Feldman, 2001; 2002; Del Negro et al., 2002; Peña y Ramirez, 2002; 2004; Hatori et al., 2006; Peña-Ortega, 2012; Zanella et al., 2014). Este fenómeno aparentemente opuesto ocurre después de la excitación colinérgica a través de receptores muscarínicos (Shao y Feldman, 2000) y nicotínicos (Shao y Feldman, 2001; 2002; Hatori et al., 2006). Lo mismo ocurre en condiciones de excitación del CPB por serotonina (Peña y Ramirez, 2002), sustancia P (Peña y Ramirez, 2002; 2004), noradrenalina (Zanella et al., 2014), el bloqueo de canales de potasio (Krey et al., 2010), el incremento en la concentración extracelular de potasio (Del Negro et al.,

2002), etcétera (Peña-Ortega, 2012). Los cambios en la frecuencia del ritmo respiratorio han sido asociados a una modulación de las neuronas marcapasos (Shao y Feldman, 2001; Peña y Ramirez, 2002; 2004; Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2005; Pace et al., 2007; Tryba et al., 2008; Peña-Ortega, 2012), mientras que los cambios en la amplitud se han asociado a cambios en el reclutamiento de neuronas respiratorias “seguidoras” (Peña et al., 2004; Elsen et al., 2008; Nieto-Posadas et al., 2014; Peña-Ortega, 2012) y/o al número de elementos activos en la red (Peña et al., 2004; Gray et al., 2001; Tan et al., 2008; Peña-Ortega, 2012). Los mismos mecanismos podrían estar participando en el aumento en la frecuencia y la disminución de la amplitud del ritmo respiratorio observado después de la HI en nuestros experimentos. Es decir, la HI podría estar aumentando la actividad de las neuronas marcapaso y, de manera simultánea, reduciendo el reclutamiento de neuronas “seguidoras” o el número de elementos activos en la red. Será necesario llevar a cabo los registros específicos para probar la validez de estas postulaciones.

Existe una gran cantidad de evidencia que muestra que las condiciones inflamatorias periféricas modulan la LTF *in vivo* (Vinit et al., 2010; Huxtable et al., 2011; 2013; 2015; Agosto-Marlin et al., 2016). Las condiciones inflamatorias periféricas generan consistentemente neuroinflamación y, en consecuencia, activación de la microglía en el SNC (Schnyderig et al., 2007; Guo and Schluesener, 2006; Huxtable et al., 2013; 2015). Por ello, en este trabajo nos interesamos en saber si la activación de la microglía modula la LTF del CPB *in vitro* (Blitz y Ramirez, 2002). Las herramientas optogenéticas se han utilizado extensamente para el control de la actividad neuronal (Boyden et al., 2005; Airan et al., 2007; Yawo et al., 2013) y, más recientemente, se está utilizando para la modulación de las células gliales (Figueiredo et al., 2011; Yawo et al., 2013; Ji y Wang, 2015; Cho et al., 2016). En el caso de la microglía, solo existen dos reportes de activación optogenética: en el primero Tanaka y colaboradores (2012) muestran que la microglía puede expresar ChR2 y que ésta puede ser activada por luz azul. Adicionalmente, Sawada y colaboradores (2012) han demostrado que la activación optogenética de la microglía produce la expresión de citosinas pro-inflamatorias y de la sintasa de NO. Resultados preliminares de nuestro laboratorio indican que en las rebanadas de tallo cerebral, la activación optogenética produce la liberación de

peróxido de hidrógeno (Pardo-Peña, comunicación personal) y el análisis morfológico presentado en esta tesis muestra que existe un cambio morfológico que sugiere una activación microglial después de la activación de la ChR2. Interesantemente, la activación optogenética de la microglía evita la LTF en respuesta a la HI, lo que nos permite aceptar la primera hipótesis de esta tesis. Este hallazgo se ve reforzado por nuestra observación de que el activador farmacológico clásico de la microglía, el LPS, produce un efecto similar o comparable al de la activación optogenética y a lo observado tras la aplicación de LPS periféricamente *in vivo* (Vinit et al., 2010; Huxtable et al., 2011; 2013; 2015; Agosto-Marlin et al., 2016). Además, como se discutirá a continuación, una manipulación genética que lleva a la microglía a un estado pro-inflamatorio también produce efectos similares.

En los grupos de animales transgénicos, tanto en los experimentos con animales homocigotos CX3CR1^{-/-}, como los experimentos realizados con animales heterocigotos para el receptor CX3CR1 ^{-/+}, encontramos que la actividad basal del circuito está inalterada, pero tras aplicar el protocolo de HI, la LTF no se genera. Lo anterior indica que una deficiencia en la función normal de la microglía también afecta al generador de los ritmos respiratorios sobre todo en los que respecta a su plasticidad en respuesta a la HI. La disminución de la señalización mediada por el receptor de fractalquina induce cambios morfológicos en la microglía típicos del estado activado (Mendiola et al., 2016) y genera un incremento en la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Feng et al., 2015). Es muy probable que la alteración de la actividad microglial debida a la disminución de la señalización mediada por el receptor de fractalquina lleve a la microglía a un estado pro-inflamatorio (Vukovic et al., 2012; Mendiola et al., 2016), posiblemente de manera similar al que produce su activación optogenética y/o la presencia del LPS.

Un resultado sorprendente de esta tesis fue que la LTF también es inhibida después de la eliminación de la microglía con clodronato liposomal (Rooijen y Sanders 1994). El clodronato liposomal, es un fármaco que selectivamente elimina a células de la estirpe mieloide (Rooijen et al., 1996), en el SNC sólo la microglía pertenece a este linaje celular. Al aplicar el clodronato liposomal, la microglía lo fagocita y, una vez dentro de la célula, las vesículas lipídicas son escindidas por enzimas lisosomales, dejando libre

al clodronato, el cual activa vías de apoptosis que llevan a las células microgliales a la muerte (Rooijen et al., 1996). El hecho de que la eliminación de la microglía inhibe la LTF indica que la actividad basal de la microglía es necesaria para generar la respiración en respuesta a la HI se produzca. De esta manera, si bien validamos la hipótesis de que la activación de la microglía inhibe la LTF, los resultados con clodronato liposomal nos permiten plantear la hipótesis alternativa de que la microglía es necesaria para la LTF. Finalmente, nos permitimos especular acerca de los mecanismos celulares que pudieran, o no, participar en los fenómenos descritos en estas hipótesis.

En cuanto a que la activación de la microglía inhibe a la LTF, estos hallazgos se pueden explicar por las observaciones de que la activación de la microglía reduce la producción y liberación del BDNF (Tanaka et al., 2006; Schnydrig et al., 2007; Guan y Fang, 2006), mismo que es necesario y suficiente para la generación de la LTF *in vivo* (Baker-Herman et al., 2004). Otra posibilidad es que la activación de la microglía lleva a la sobreproducción de IL-1 β , cuya liberación está directamente relacionada con fallas en la respiración (Olsson et al., 2003; Hofstetter y Herlenius, 2005; Gresham et al., 2011). Además, la IL-1 β es un potente inhibidor de la respuesta respiratoria a la hipoxia (Stoltenberg et al., 1994; Frøen et al., 2000; Olsson et al., 2003; Hofstetter y Herlenius, 2005, Herlenius, 2011). En cuanto a la necesidad de la microglía para la generación de la LTF, estos hallazgos se pueden explicar por las observaciones de que la LTF *in vivo* requiere de la generación de ROS (MacFarlane et al., 2008) y la fuente principal de las ROS es justamente la microglía (Qin et al., 2005; Domercq et al., 2007).

Los hallazgos de esta tesis tienen relevancia clínica pues el síndrome de muerte súbita del lactante (SMSL) y las apneas son condiciones patológicas que se han asociado fuertemente con alteraciones en la actividad respiratoria (Raza y Blackwell, 1999; Herlenius, 2011) y el SMSL representa un riesgo considerable entre la población neonata (Mathew, 2011). Diferentes evidencias experimentales han sugerido una asociación entre distintas alteraciones respiratorias con la presencia de procesos infecciosos y de la respuesta inmunológica que estos generan (Raza y Blackwell, 1999; Hofstetter et al., 2007; Herlenius, 2011; Greer, 2012; Neary et al., 2012). Específicamente, hay una estrecha relación entre la presencia de inflamación con

alteraciones respiratorias, apneas y con el SMSL (Raza y Blackwell, 1999; Hofstetter et al., 2007; Herlenius, 2011; Greer, 2012; Neary et al., 2012). El hallazgo de que la microglía modula la plasticidad del circuito generador de la respiración contribuye a entender mejor los fenómenos patológicos descritos y aporta indicios acerca de estrategias terapéuticas para los mismos, entre las cuales se podría incluir la participación de la microglía, sin embargo, esto aún permanece sin ser estudiado y comprendido en su totalidad.

10- CONCLUSIONES

1. La aplicación del protocolo de HI induce la producción de la LTF *in vitro*, la cual consiste en un incremento de la frecuencia acompañado de un decremento en la amplitud.
2. La activación de la microglía con herramientas específicas como la optogenética, así como con herramientas farmacológicas como el uso del LPS, deprimen la LTF *in vitro*.
3. La ausencia del receptor CX3CR1 produce una disminución de larga duración de la frecuencia del ritmo respiratorio *in vitro*, después de la exposición a HI.
4. La disminución de la expresión del receptor CX3CR1 impide el establecimiento de la LTF *in vitro* tras HI.
5. La función basal de la microglía es necesaria para el establecimiento de la LTF *in vitro* ya que al eliminarla con clodronato liposomal, la actividad basal del circuito cambia, y tras la aplicación del HI no se genera la LTF *in vitro*.
6. Cualquier disrupción en la actividad normal de la microglía (p.e. la activación de la microglía, y la ausencia total o parcial del receptor CX3CR1) conlleva al fallo en el establecimiento de la LTF *in vitro*.

11- BIBIOGRAFÍA

- Agosto-Marlin IM, Nichols NL, Mitchell GS (2016) Adenosine-dependent phrenic motor facilitation is inflammation resistant. *J Neurophysiol*; 117(2):836-845.
- Airan RD, Hu ES, Vijaykumar R, Roy M, Meltzer LA, Deisseroth K. (2007). Integration of light-controlled neuronal firing and fast circuit imaging. *Curr Opin Neurobiol*; 17(5):587-92. Review.
- Almendros I, Wang Y, Gozal D (2014) The polymorphic and contradictory aspects of intermittent hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 307(2):L129-40. Review.
- Anderson PB, Perry VH, Gordon S (1992) The acute inflammatory response to Lipopolysaccharide in CNS parenchyma differs from that in other body tissues. *Neurosci*; 48(1):169-86.
- Ashwell, K (1991) The distribution of microglia and cell death in the fetal rat forebrain. *Develop brain res*; 58(1), 1-12.
- Asrican B, Augustine GJ, Berglund K, Chen S, Chow N, Deisseroth K, Feng G, Gloss B, Hira R, Hoffmann C, Kasai H, Katarya M, Kim J, Kudolo J, Lee LM, Lo SQ, Mancuso J, Matsuzaki M, Nakajima R, Qiu L, Tan G, Tang Y, Ting JT, Tsuda S, Wen L, Zhang X, Zhao S (2013) Next-generation transgenic mice for optogenetic analysis of neural circuits. *Front Neural Circuits*; 7:160.
- Bach KB, Mitchell GS (1996) Hypoxia-induced long-term facilitation of respiratory activity is serotonin dependent. *Respir Physiol*; 104(2-3):251-60
- Bach KB, Mitchell GS (2000) Effects of phrenicotomy and exercise on hypoxia-induced changes in phrenic motor output. *J Appl Physiol (1985)*; 89(5):1884-91.
- Bachstetter AD, Morganti JM, Jernberg J, Schlunk A, Mitchell SH, Brewster KW, Hudson CE, Cole MJ, Harrison JK, Bickford PC (2011) Fractalkine and CX 3 CR1 regulate hippocampal neurogenesis in adult and aged rats. *Neurobiol Aging*; 32:2030–44.
- Baker TL, Mitchell GS (2000) Episodic but not continuous hypoxia elicits long-term facilitation of phrenic motor output in rats. *J Physiol*; 529(1):215-9.
- Baker-Herman TL, Fuller DD, Bavis RW, Zabka AG, Golder FJ, Doperalski NJ, Johnson RA, Watters JJ, Mitchell GS (2004) BDNF is necessary and sufficient for spinal respiratory plasticity following intermittent hypoxia. *Nat Neurosci*; 7(1):48-55.
- Baker-Herman TL, Mitchell GS (2002) Phrenic long-term facilitation requires spinal serotonin receptor activation and protein synthesis. *J Neurosci*; 22(14):6239-46.
- Baker-Herman TL, Mitchell GS (2008) Determinants of frequency long-term facilitation following acute intermittent hypoxia in vagotomized rats. *Respir Physiol Neurobiol*; 162(1):8-17.
- Banks WA., Farr SA., Morley JE (2003) Entry of blood-borne cytokines into the central nervous system: effects on cognitive processes. *Neuroimmunomodulation*; 10(6):319-27.
- Barger SW, Goodwin ME, Porter MM, y Beggs ML (2007) Glutamate release from activated microglia requires the oxidative burst and lipid peroxidation. *J neurochem*; 101(5):1205-1213.
- Biedroń R, Peruń A, Józefowski S (2016) CD36 Differently Regulates Macrophage responses to Smooth and Rough-Lipopolysaccharide. *PLOS ONE*; 11(4):e0153558.

- Bilbo SD, Schwarz JM (2012) LPS elicits a much larger and broader inflammatory response than *Escherichia coli* infection within the hippocampus of neonatal rats. *Neurosci Lett*; 497(2):110-5.
- Blitz DM, y Ramirez JM (2002) Long-Term Modulation of Respiratory Network Activity Following Anoxia In Vitro *J Neurophysiol*; 87: 2964–2971
- Boje KM y Prince KA. (1992) Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. *Brain Research*; 587(2):250-6.
- Bouvier J, Autran S, Dehorter N, Katz DM, Champagnat J, Fortin G, Thoby-Brisson M. (2008). Brain-derived neurotrophic factor enhances fetal respiratory rhythm frequency in the mouse preBötzing complex in vitro. *Eur J Neurosci*; 28(3):510-20.
- Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci*; 8(9):1263-8.
- Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, Landa G, Talpalar A E, Pluchino, S, y Schwartz M. (2006). Microglia activated by IL-4 or IFN- γ differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Molecular and Cellular Neuroscience*; 31(1):149-160.
- Caggiano AO, Kraig RP (1999) Prostaglandin E receptor subtypes in cultured rat microglia and their role in reducing lipopolysaccharide-induced interleukin-1beta production. *J Neurochem*; 72(2):565-75.
- Cardona AE, Piro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM, Huang D, Kidd G, Dombrowski S, Dutta R, Lee JC, Cook DN, Jung S, Lira SA, Littman DR, Ransohoff RM. (2006). Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci*. 9:917–924.
- Cardoso FL, Herz J, Fernandes A, Rocha J, Sepodes B, Brito MA, McGavern DB, Brites D (2015) Systemic inflammation in early neonatal mice induces transient and lasting neurodegenerative effects. *J Neuroinflammation*; 12:82.
- Cho WH, Barcelon E, Lee SJ. (2016). Optogenetic Glia Manipulation: Possibilities and Future Prospects. *Exp Neurol*; 25(5):197-204.
- Clark AK, Malcangio M (2014) Fractalkine/CX3CR1 signaling during neuropathic pain. *Front Cell Neurosci*; 8:121.
- Colton C, Wilt S, Gilbert D, Chernyshev O, Snell J, Dubois-Dalcq M (1996) Species differences in the generation of reactive oxygen species by microglia. *Mol Chem Neuropathol*; 28(1-3):15-20.
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci*; 8(6):752-8.
- Del Negro CA, Kam K, Hayes JA, Feldman JL (2009) Asymmetric control of inspiratory and expiratory phases by excitability in the respiratory network of neonatal mice in vitro. *J Physiol*; 587(6):1217-31.
- 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(2):446-53.
- Del Negro CA, Wilson CG, Butera RJ, Rigatto H, Smith JC. (2002). Periodicity, mixed-mode oscillations, and quasiperiodicity in a rhythm-generating neural network. *Biophys J*; 82(1 Pt 1):206-14

- Dick TE, Dutschmann M, Feldman JL, Fong AY, Hülsmann S, Morris KM, Ramirez JM, Smith JC (2016) Facts and challenges in respiratory neurobiology. *Respir Physiol Neurobiol*; pii: S1569-9048(15)00027-0.
- Dissing-Olesen L, LeDue JM, Rungta RL, Hefendehl JK, Choi HB, MacVicar BA (2014) Activation of neuronal NMDA receptors triggers transient ATP-mediated microglial process outgrowth. *J Neurosci*; 34(32):10511-27.
- Domercq M, Sánchez-Gómez MV, Sherwin C, Etxebarria E, Fern R, Matute C (2007) System xc- and glutamate transporter inhibition mediates microglial toxicity to oligodendrocytes. *J Immunol*; 178(10):6549-56.
- Dong Y, Benveniste EN (2001) Immune function of astrocytes. *Glia* ;36(2):180-90. Review.
- Doperski NJ, Fuller DD (2006) Long-term facilitation of ipsilateral but not contralateral phrenic output after cervical spinal cord hemisection. *Exp Neurol*; 200(1):74-81.
- Douglas G, Haldane JS (1908) The regulation of normal breathing. *This Journal*, xxxii. p. 420-440. 1908.
- Dutschmann M, Bischoff AM, Büsselberg D, Richter DW (2003) Histaminergic modulation of the intact respiratory network of adult mice. *Pflugers Arch*; 445(5):570-6.
- Elkabes S, DiCicco-Bloom EM, y Black IB (1996) Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *The journal of neuroscience*; 16(8),2508-2521.
- EIMallah MK, Stanley DA, Lee KZ, Turner SM, Streeter KA, Baekey DM, Fuller DD (2016) Power spectral analysis of hypoglossal nerve activity during intermittent hypoxia-induced long-term facilitation in mice. *J Neurophysiol*; 115(3):1372-80.
- Elsen FP, Shields EJ, Roe MT, Vandam RJ, Kelty JD (2008) Carbenoxolone induced depression of rhythmogenesis in the pre-Bötzinger Complex. *BMC Neurosci*; 9:46.
- Erblich B, Zhu L, Etgen AM, Dobrenis K, y Pollard JW (2011) Absence of colony stimulation factor-1 receptor results in loss of microglia, disrupted brain development and olfactory deficits. *PLOS ONE*; 6, e26317.
- Esen N, Kielian T (2007) Effects of low dose GM-CSF on microglial inflammatory profiles to diverse pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). *J Neuroinflammation*; 20;4:10.
- Ezure K (1990) Synaptic connections between medullary respiratory neurons and considerations on the genesis of respiratory rhythm. *Prog Neurobiol*; 35(6):429-50.
- Feldman JL, Del Negro CA, Gray PA (2013) Understanding the rhythm of breathing: so near, yet so far. *Annu Rev Physiol*; 75:423-52. Review.
- Feldman JL, Mitchell GS y Nattie EE (2003) Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. *Annual review of neuroscience*; 26, 239.
- Feldman JL, Smith JC (1989) Cellular mechanisms underlying modulation of breathing pattern in mammals. *Ann N Y Acad Sci*; 563:114-30. Review.
- Feng X, Szulzewsky F, Yerevanian A, Chen Z, Heinzmann D, Rasmussen RD, Alvarez-Garcia V, Kim Y, Wang B, Tamagno I, Zhou H, Li X, Kettenmann H, Ransohoff RM, Hambardzumyan D (2015) Loss of CX3CR1 increases accumulation of inflammatory monocytes and promotes gliomagenesis. *Oncotarget*; 6(17):15077-94.

- 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(1):R39-46
- Figueiredo M, Lane S, Tang F, Liu BH, Hewinson J, Marina N, Kasymov V, Souslova EA, Chudakov DM, Gourine AV, Teschemacher AG, Kasparov S (2011) Optogenetic experimentation on astrocytes. *Exp Physiol*; 96(1):40-50.
- Fleisch H. (1988) Bisphosphonates: a new class of drugs in diseases of bone and calcium metabolism. *Handbook Exp. Pharmacol*; 83, 441.
- Frøen JF, Akre H, Stray-Pedersen B, Saugstad OD (2000) Adverse effects of nicotine and interleukin-1beta on autoresuscitation after apnea in piglets: implications for sudden infant death syndrome. *Pediatrics*; 105(4):E52
- Fulci G, Dmitrieva N, Gianni D, Fontana EJ, Pan X, Lu Y, Kaufman CS, Kaur B, Lawler SE, Lee RJ, Marsh CB, Brat DJ, van Rooijen N, Stemmer-Rachamimov AO, Hochberg FH, Weissleder R, Martuza RL, Chiocca EA (2007) Depletion of peripheral macrophages and brain microglia increases brain tumor titers of oncolytic viruses. *Cancer Res*; 67(19):9398-406.
- Fuller DD, Bach KB, Baker TL, Kinkead R, Mitchell GS (2000) Long term facilitation of phrenic motor output. *Respir Physiol*; 121(2-3):135-46. Review.
- Fuller DD, Johnson SM, Olson EB Jr, Mitchell GS (2003) Synaptic pathways to phrenic motoneurons are enhanced by chronic intermittent hypoxia after cervical spinal cord injury. *J Neurosci*; 23(7):2993-3000
- Funk GD, Vishaal R, Alvares TS, Revill AL, Zhang Y, Nathan Y, Chu V (2015) Neuroglia and their roles in central respiratory control; an overview. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*; 186:83-95.
- Garcia AJ 3rd, Khan SA, Kumar GK, Prabhakar NR, Ramirez JM (2011) Hydrogen peroxide differentially affects activity in the pre-Bötzing complex and hippocampus. *J Neurophysiol*; 106(6):3045-55.
- Garcia AJ, Naama RK, Atsushi D, Ramirez JM (2013) Post-Hypoxic Recovery of Respiratory Rhythm Generation Is Gender Dependent. *PLOS ONE*; 8(4):e60695.
- Ginhoux F (2010) Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*; 330, 841–845.
- Ginhoux F, Williams M (2016) Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity*; 44(3):439-49. Review.
- Ginhoux F, Prinz M (2015) Origin of Microglia: Current Concepts and Past Controversies. *Cold Spring Harb Perspect Biol*; a020537
- Giulian D, Baker T, Shih CL, Lachman L (1986) Interleukin i of the central nervous system is Produced by ameboid microglia. *The Rockefeller University Press*; 0022-1007/86/08/0594/11
- Giulian D. y Vaca K (1993) Inflammatory glia mediate delayed neuronal damage after ischemia in the central nervous system. *Stroke*; 1-84-I-90.
- Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA (1999) Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron*; 23(2):257-71
- Goldberg AN, Schwab RJ (1998) Identifying the patient with sleep apnea: upper airway assessment and physical examination. *Otolaryngol Clin North Am*; 31(6):919-30.

- Golder FJ, Mitchell GS (2005) Spinal synaptic enhancement with acute intermittent hypoxia improves respiratory function after chronic cervical spinal cord injury. *J Neurosci*; 25(11):2925-32.
- Goodridge HS y Underhill DM (2012) Information processing during phagocytosis. *Nature Reviews Immunology*; 12(7), 492-502
- Gozal E, Gozal D (2001) Respiratory plasticity following intermittent hypoxia: developmental interactions. *J Appl Physiol* (1985); 90(5):1995-9. Review.
- Gozal E, Gozal D, Pierce WM, Thongboonkerd V, Scherzer JA, Sachleben LR Jr, Brittan KR, Guo SZ, Cai J, Klein JB (2002) Proteomic analysis of CA1 and CA3 regions of rat hippocampus and differential susceptibility to intermittent hypoxia. *J Neurochem*; 83(2):331-45.
- Graeber, MB, Li W, Rodriguez ML (2011) Role of microglia in CNS inflammation. *FEBS letters*; 585(23), 3798-3805.
- Gray PA, Janczewski, WA, Mellen N, McCrimmon DR, Feldman JL (2001) Normal breathing requires preBotzinger complex neurokinin-1 receptor-expressing neurons. *Nature Neurosci*; 4, 927–930
- Greer JJ (2012) Control of breathing activity in the fetus and newborn. *Compr Physiol*; 2(3):1873-88.. Review.
- Gresham K, Boyer B, Mayer C, Foglyano R, Martin R, Wilson CG (2011) Airway inflammation and central respiratory control: results from in vivo and in vitro neonatal rat. *Respir Physiol Neurobiol*; 178(3):414-21.
- Guan Z, Fang J (2006) Peripheral immune activation by lipopolysaccharide decreases neurotrophins in the cortex and hippocampus in rats. *Brain Behav Immun*; 20(1):64-71.
- Guilleminault C, Eldridge FL, Simmon FB, Dement WC. Sleep apnea syndrome (1975) Can it induce hemodynamic changes?. *West J Med*; 123(1):7-16.
- Guilleminault C, Partinen M (1990) Obstructive sleep apnea syndrome. *Clinical research and treatment. New York: Raven Press*; 49-69
- Guilleminault C, Partinen M, Hollman K, Powell N, Stoohs R (1995) Familial Aggregates in Obstructive Sleep Apnea Syndrome. *Chest*, 107: 1545-1551.
- Guo LH, Schluesener HJ (2006) Acute but not chronic stimulation of glial cells in rat spinal cord by systemic injection of lipopolysaccharide is associated with hyperalgesia. *Acta Neuropathol*; 112(6):703-13.
- Guyenet PG, Wang H (2001) Pre-Bötzing neurons with preinspiratory discharges "in vivo" express NK1 receptors in the rat. *J Neurophysiol*; 86(1):438-46.
- Harrison JK, Jiang Y, Chen S, Xia Y, Maciejewski D, McNamara RK, Streit WJ, Salafranca MN, Adhikari S, Thompson DA, Botti P, Bacon KB, Feng L (1998) Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 95(18):10896-901
- Hatori E, Sakuraba S, Kashiwagi M, Kuribayashi J, Tsujita M, Hosokawa Y, Takeda J, Kuwana S (2006) Association of nicotinic acetylcholine receptors with central respiratory control in isolated brainstem-spinal cord preparation of neonatal rats. *Biol Res*; 39(2):321-30.
- Häusler K. G, Prinz M, Nolte C, Weber JR, Schumann RR, Kettenmann H, Hanisch UK (2002) Interferon- γ differentially modulates the release of cytokines and chemokines in lipopolysaccharide-and

- pneumococcal cell wall-stimulated mouse microglia and macrophages. *European Journal of Neuroscience*; 16(11), 2113-2122.
- Hayden MS, y Sankar GS (2008) Shared Principles in NF- κ B Signaling. *Cell*; 132(3):344-62.
- Herlenius E (2011) An inflammatory pathway to apnea and autonomic dysregulation. *Respir Physiol Neurobiol*; 178(3):449-57. Review.
- Hernández AB., Patil SP (2016) Pathophysiology of central sleep apneas. *Sleep Breath*; 20:467–482.
- Hetier E, Ayala J, Denkfle P, Bousseau A, Rouget P, Mallat M, y Prochiantz A (1988) Brain Macrophages Synthesize Interleukin-1 and Interleukin-1 mRNAs In Vitro. *Journal of Neuroscience Research*; 21:391-397.
- Hickner S, Hussain N, Angoa-Perez M, Francescutti DM, Kuhn DM, Mateika JH (2014) Ventilatory long-term facilitation is evident after initial and repeated exposure to intermittent hypoxia in mice genetically depleted of brain serotonin *J. Appl. Physiol*; 116:240–250.
- Hodges MR, Tattersall GJ, Harris MB, McEvoy SD, Richerson DN, Deneris ES, Johnson RL, Chen ZF, Richerson GB (2008) Defects in breathing and thermoregulation in mice with near-complete absence of central serotonin neurons. *J. Neuroscience*; 28, 2495–2505.
- Hodgkin AL, Huxley AF (1945) Resting and action potentials in single nerve fibres. *J Physiol*; 104(2):176-95.
- Hofstetter AO, Herlenius E (2005) Interleukin-1 β depresses hypoxic gasping and autoresuscitation in neonatal DBA/1lacJ mice. *Respiratory Physiology and Neurobiology*; 146 135–146.
- Hofstetter AO, Saha S, Siljehav V, Jakobsson PJ, Herlenius E (2007) The induced prostaglandin E2 pathway is a key regulator of the respiratory response to infection and hypoxia in neonates. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 104(23):9894-9.
- Hofstetter AO, Sipra SS, Siljehav V, Jakobsson PJ, Eric Herlenius E (2007) The induced prostaglandin E2 pathway is a key regulator of the respiratory response to infection and hypoxia in neonates. *PNAS*; 23, 9894–9899
- Hofstetter S, Leifsdottir AM, y Herlenius, E (2015) Prostaglandin E 2 Mediates Cardiorespiratory Disturbances during Infection in Neonates. *The Journal of pediatrics*; 167(6):1207-13.e3.
- Hu H, Brahmabhatt A, Upadhyaya i, Vega D, Hill AA (2012) Prenatal nicotine exposure alters the response of the mouse in vitro respiratory rhythm to hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol*; 181 234–247
- Huxtable AG, Smith SM, Peterson TJ, Watters JJ, Mitchell GS (2015). Intermittent Hypoxia-Induced Spinal Inflammation Impairs Respiratory Motor Plasticity by a Spinal p38 MAP Kinase-Dependent Mechanism. *J Neurosci*; 35(17):6871-80.
- Huxtable AG, Smith SM, Vinit S, Watters JJ, Mitchell GS (2013) Systemic LPS induces spinal inflammatory gene expression and impairs phrenic long-term facilitation following acute intermittent hypoxia. *Journal of Applied Physiology*; 114(7),879-887.
- Huxtable AG, Vinit S, Windelborn JA, Crader SM, Guenther CH, Watters JJ, Mitchell GS (2011) Systemic inflammation impairs respiratory chemoreflexes and plasticity. *Respir Physiol Neurobiol*; 178(3):482-9. Review.
- Jacobi MS, Thach BT (1989) Effect of maturation on spontaneous recovery from hypoxic apnea by gasping. *J Appl Physiol*; 66:2384–2390

- Janczewski WA, Tashima A, Hsu P, Cui Y, Feldman JL (2013) Role of inhibition in respiratory pattern generation. *J Neurosci*; 33(13):5454-65.
- Ji K, Akgul G, Wollmuth LP, Tsirka SE (2013) Microglia actively regulate the number of functional synapses. *PLOS ONE*; 8(2): e56293.
- Ji ZG, Wang H (2015) Optogenetic control of astrocytes: is it possible to treat astrocyte-related epilepsy? *Brain Res Bull*; 110:20-5.
- Jin XH, Wang LN, Zuo JL, Yang JP, Liu SL (2014) P2X4 receptor in the dorsal horn partially contributes to brain-derived neurotrophic factor oversecretion and toll like receptor-4 receptor activation associated with bone cancer pain. *J Neurosci Res*; 92(12):1690-702.
- 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(4):1772-6.
- Johnson SM, Smith JC, Funk GD y Feldman JL (1994) Pacemaker behavior of respiratory neurons in medullary slices from neonatal rat. *J Neurophysiol*; 72:2598-2608
- Jolivel V, Bicker F, Binamé F, Ploen R, Keller S, Gollan R, Jurek B, Birkenstock J, Poisa-Beiro L, Bruttger J, Opitz V, Thal SC, Waisman A, Bäuerle T, Schäfer MK, Zipp F, Schmidt MH. (2015). Perivascular microglia promote blood vessel disintegration in the ischemic penumbra. *Acta Neuropathol*; 129(2):279-95.
- Katayama T, Kobayashi Okamura, T, Yamasaki-Katayama Y, Kibayashi T, Kimura H, Minami M (2012) Accumulating microglia phagocytose injured neurons in hippocampal slice cultures: involvement of p38 MAP kinase. *PLOS ONE*; 7(7), e40813.
- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A (2011) Physiology of Microglia. *Physiol Rev*; 91: 461–553.
- Koch H, Caughie C, Elsen FP, Doi A, Garcia AJ 3rd, Zanella S, Ramirez JM (2015) Prostaglandin E2 differentially modulates the central control of eupnoea, sighs and gasping in mice. *J Physiol*; 593(1):305-19.
- Koennecke LA, Zito MA, Proescholdt MG, van Rooijen N, Heyes MP (1999) Depletion of systemic macrophages by liposome-encapsulated clodronate attenuates increases in brain quinolinic acid during CNS-localized and systemic immune activation. *J Neurochem*; 73(2):770-9.
- Koshinaga M, Whittemore SR (1995) The temporal and spatial activation of microglia in fiber tracts undergoing anterograde and retrograde degeneration following spinal cord lesion. *J. Neurotrauma*; 12, 209–222.
- Kottick A, Del Negro Christopher A (2015) Synaptic Depression Influences Inspiratory–Expiratory Phase Transition in Dbx1 Interneurons of the preBötzinger Complex in Neonatal Mice. *J Neurosci*; 35(33):11606 –11611
- Kreutzberg G.W (1995) Microglia, the first line of defense in brain pathologies. *Arzneim. Forsch*; 45, 357– 360.
- Krey RA, Goodreau AM, Arnold TB, Del Negro CA (2010) Outward Currents Contributing to Inspiratory Burst Termination in preBötzinger Complex Neurons of Neonatal Mice Studied in Vitro. *Front Neural Circuits*; 4:124.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci*; 16(6):2027-33

- Kumamaru H, Saiwai H, Kobayakawa K, Kubota K, van Rooijen N, Inoue K, Iwamoto Y, Okada S (2012) Liposomal clodronate selectively eliminates microglia from primary astrocyte cultures. *J. of neuroinflammation*; 9:116.
- Laflamme N, Lacroix S, Rivest S (1999) An essential role of interleukin-1h in mediating NF- κ B activity and COX-2 transcription in cells of the blood-brain barrier in response to a systemic and localized inflammation but not during endotoxemia. *J. Neurosci*; 19, 10923– 10930.
- Lam SY, Liu Y, Ng KM, Lau CF, Liong EC, Tipoe GL, Fung ML (2012) Chronic intermittent hypoxia induces local inflammation of the rat carotid body via functional upregulation of proinflammatory cytokine pathways. *Histochem Cell Biol*; 137(3):303-17.
- Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*; 39(1):151-70.
- Lieske M, Thoby-Brisson P, Telgkamp, Ramirez JM (2000) Reconfiguration of the neural network controlling multiple breathing patterns: eupnea, sighs and gasps. *Nature neuroscience*; 3: 600-607.
- Lorea-Hernández JJ, Morales T, Rivera-Angulo AJ, Alcantara-Gonzalez D, Peña-Ortega F (2016) Microglia modulate respiratory rhythm generation and autoresuscitation. *Glia*; 64(4):603-19.
- Lumsden T (1923) The regulation of respiration Part I. *Journ.* 57; pp. 81-91 354.
- MacFarlane PM, Mitchell GS (2008) Respiratory long-term facilitation following intermittent hypoxia requires reactive oxygen species formation. *Neuroscience*; 152(1): 189–197.
- MacFarlane PM, Wilkerson JE, Lovett-Barr MR, Mitchell GS (2008) Reactive oxygen species and respiratory plasticity following intermittent hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol*; 164(1-2):263-71. Review.
- Maciejewski-Lenoir D, Chen S, Feng L, Maki R, Bacon KB. (1999). Characterization of fractalkine in rat brain cells: migratory and activation signals for CX3CR1-expressing microglia. *J Immunol*; 163(3):1628-35.
- Maggi L, Scianni M, Branchi I, D'Andrea I, Lauro C, Limatola C (2011) CX3CR1 deficiency alters hippocampal-dependent plasticity phenomena blunting the effects of enriched environment. *Front Cell Neurosci*; 5:22.
- Mahamed S, Mitchell GS (2008) Simulated apnoeas induce serotonin-dependent respiratory long-term facilitation in rats. *J Physiol*; 586(8):2171-81.
- Mascarucci, P., Perego, C., Terrazzino, S., De Simoni, M.G (1998) Glutamate release in the nucleus tractus solitarius induced by peripheral lipopolysaccharide and interleukin-1h. *Neuroscience*; 86, 1285– 1290.
- Mateika JH, Fregosi RF (1997) Long-term facilitation of upper airway muscle activities in vagotomized and vagally intact cats. *J Appl Physiol (1985)*; 82(2):419-25.
- Mathew OP (2011) Apnea of prematurity: pathogenesis and management strategies. *J Perinatol*; 31(5):302-10. Review.
- McGuire M, Ling L (2005) Ventilatory long-term facilitation is greater in 1- vs. 2-mo-old awake rats. *J Appl Physiol (1985)*; 98(4):1195-201
- McGuire M, Zhang Y, White DP, Ling L (2002) Effect of hypoxic episode number and severity on ventilatory long-term facilitation in awake rats. *J Appl Physiol (1985)*; 93(6):2155-61.
- McGuire M, Zhang Y, White DP, Ling L (2003) Chronic intermittent hypoxia enhances ventilatory long-term facilitation in awake rats. *J Appl Physiol (1985)*; 95(4):1499-508.

- McGuire M, Zhang Y, White DP, Ling L (2005) Phrenic long-term facilitation requires NMDA receptors in the phrenic motonucleus in rats. *J Physiol*; 567(Pt 2):599-611.
- McKay LC, Janczewski WA, Feldman JL (2004) Episodic hypoxia evokes long-term facilitation of genioglossus muscle activity in neonatal rats. *J Physiol*; 557.1 pp 13–18
- McRae A., Bona E., Hagberg H (1996) Microglia-astrocyte interactions after cortisone treatment in a neonatal hypoxia-ischemia model. *Developmental Brain Research*; 94-44-51
- Mellen NM, Thoby-Brisson M (2012) Respiratory circuits: development, function and models. *Current Opinion in Neurobiology*; 22:676–685
- Mendiola AS, RGarza R, Cardona SM, Mythen SA, Lira SA, Akassoglou K, Cardona AE (2016) Fractalkine Signaling Attenuates Perivascular Clustering of Microglia and Fibrinogen Leakage during Systemic Inflammation in Mouse Models of Diabetic Retinopathy. *Front Cell Neurosci*; 10: 303.
- Meucci O, Fatatis A, Simen AA, Miller RJ (2001) Expression of CX3CR1 chemokine receptors on neurons and their role in neuronal survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 97(14):8075-80.
- Michelucci A, Heurtaux T, Grandbarbe L, Morga E, Heuschling P (2009) Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: Effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta. *J Neuroimmunol*; 210(1-2):3-12.
- Millhorn DE, Eldridge FL, Waldrop TG (1980) Prolonged stimulation of respiration by endogenous central serotonin. *Respir. Physiol*; 42, 171–188.
- Millhorn, DE (1986) Stimulation of raphe (obscurus) nucleus causes long-term potentiation of phrenic nerve activity in cat. *J. Physiol*; 381, 169–179.
- Milligan ED, Sloane EM, Watkins LR (2008) Glia in Pathological Pain: A Role for Fractalkine. *J Neuroimmunol*; 198(1-2): 113–120.
- Ming Z, Wotton CA, Appleton RT, Ching JC, Loewen ME, Sawicki G y Bekar LK (2015) Systemic lipopolysaccharide-mediated alteration of cortical neuromodulation involves increases in monoamine oxidase-A and acetylcholinesterase activity. *Journal of Neuroinflammation*; 12:37
- Mitchell GS (2004) Back to the future: carbon dioxide chemoreceptors in the mammalian brain. *Nat Neurosci*; 7(12):1288-90
- Mitchell GS, Baker TL, Nanda SA, Fuller DD, Zabka AG, Hodgeman BA, Bavis RW, Mack KJ, Olson EB Jr (2001) Invited review: Intermittent hypoxia and respiratory plasticity. *J Appl Physiol (1985)*; 90(6):2466-75. Review.
- Mitchell GS, Fregosi RF. (1994). Long-term facilitation of inspiratory intercostal nerve activity following carotid sinus nerve stimulation in cats. *J Physiol*; 477 (Pt 3):469-79.
- Mitchell GS, Golder FJ, Ranganathan L, Satriotomo I, Hoffman M, Lovett-Barr MR, Watters JJ, Baker-Herman TL (2008) Spinal adenosine A2a receptor activation elicits long-lasting phrenic motor facilitation. *J Neurosci*; 28(9):2033-42.
- Mitchell GS, Jiang C, Lipski J (1991) Prolonged augmentation of respiratory discharge in hypoglossal motoneurons following superior laryngeal nerve stimulation. *Brain Res*; 538(2):215-25.
- Mitchell GS, Johnson SM (2003) Neuroplasticity in respiratory motor control. *J. Appl. Physiol*; 94 (1), 358–374.

- Morgado-Valle C, Baca SM, Feldman JL (2010) Glycinergic pacemaker neurons in preBötzing complex of neonatal mouse. *J Neurosci*; 30(10):3634-9.
- Morgado-Valle C, Feldman JL (2007) NMDA receptors in preBotzinger complex neurons can drive respiratory rhythm independent of AMPA receptors. *J Physiol*; 582:359—68
- Morgan WW, Kamp CW (1983) Effect of strychnine and of bicuculline on dopamine synthesis in retinas of dark-maintained rats. *Brain Res*; 278-362-365
- Morris KF, Arata A, Shannon R, Lindsey BG (1996) Longterm facilitation of phrenic nerve activity in cats: responses and short-time scale correlations of medullary neurones. *J. Physiol*; 490.2, 463–480.
- Morris KF, Baekey DM, Nuding SC, Segers LS, Shannon R, Lindsey BG (2003) Neural network plasticity in respiratory control. *J. Appl. Physiol*; 94 (3), 1242–1252.
- Morris KF, Baekey DM, Shannon R, Lindsey BG (2000) Respiratory neural activity during long-term facilitation. *Respir. Physiol*; 121, 119–133.
- Nakamura Y, Si QS, Kataoka K (1999) Lipopolysaccharide-induced microglial activation in culture: temporal profiles of morphological change and release of cytokines and nitric oxide. *Neurosci Res*; 35(2):95-100.
- Neary MT, Mohun TJ, Breckenridge RA (2012) A mouse model to study the link between hypoxia, long QT interval and sudden infant death syndrome. *Dis Model Mech*; 6(2):503-7.
- Nguyen VT, Benveniste EN (2002) Critical role of tumor necrosis factor-alpha and NF-kappa B in interferon-gamma -induced CD40 expression in microglia/macrophages. *J Biol Chem*; 277(16):13796-803.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*; 308(5726), 1314-1318.
- O'Neill LA, Kaltschmidt C (1997) NF-κB: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neuroscience*; 20:252–258
- Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S (2004) Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem*; 88, 844–856
- Olson EB, Bohne CJ, Dwinell MR, Podolsky A, Vidruk EH, Fuller DD, Powell FL, Mitchel GS (2001) Ventilatory long-term facilitation in unanesthetized rats the American Physiological Society. *J Appl Physiology*; 91: 709–716.
- Olsson A, Kayhan G, Lagercrantz H, Herlenius E (2003) IL-1 beta depresses respiration and anoxic survival via a prostaglandin-dependent pathway in neonatal rats. *Pediatr Res*; 54(3):326-31.
- Pace RW, Mackay DD, Feldman JL, Del Negro CA (2007) Inspiratory bursts in the preBötzing complex depend on a calcium-activated non-specific cation current linked to glutamate receptors in neonatal mice. *J Physiol*; 582(Pt 1):113-25.
- Pan YL, Zhou C, Dolich H, Deeds S, Gonzalo J, Vath JA, Gosselin J, Dussault MJ, Woolf B, Alperin E, Culpepper G, Gutierrez-Ramos J, Gearing D (1997) Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature*; 387, 611-617.
- Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Gross CT (2011) Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*; 333(6048), 1456-1458.

- Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR 3rd, Lafaille JJ, Hempstead BL, Littman DR, Gan WB (2013) Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell*; 155(7):1596-609.
- Pekny M, Pekna M (2014) Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol Rev*; 94(4):1077-98. Review.
- Peña F (2009) Neuronal network properties underlying the generation of gasping. *Clin Exp Pharmacol Physiol*; 36(12):1218-28. Review.
- Peña F, Aguilera MA (2007) Effects of riluzole and flufenamic acid on eupnea and gasping of neonatal mice in vivo. *Neurosci Lett*; 415(3):288-93.
- Peña F, García O (2006) Breathing generation and potential pharmacotherapeutic approaches to central respiratory disorders. *Curr Med Chem*; 13(22):2681-93. Review.
- Peña F, Meza-Andrade R, Paez-Zayas V, Gonzalez-Marín MC (2008) Gasping generation in developing Swiss-Webster mice in vitro and in vivo. *Neurochem Res*; 33:1492–500.
- 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(1):105-17.
- Peña F, Ramirez JM (2002) Endogenous activation of serotonin-2A receptors is required for respiratory rhythm generation in vitro. *J Neurosci*; 22(24):11055-64.
- 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.
- Peña-Ortega F (2012) Tonic neuromodulation of the inspiratory rhythm generator. *Front Physiol*; 3:253.
- Peña-Ortega F (2017) Pharmacological tools to activate microglia and their possible use to study neural network patho-physiology. *Curr Neuropharmacol*. Volume 15, 8 Issues
- Peña-Ortega F, Rivera-Angulo AJ, Lorea-Hernández JJ (2016) Pharmacological Tools to Study the Role of Astrocytes in Neural Network Functions. *Adv Exp Med Biol*; 949:47-66.
- Peng YJ, Prabhakar NR (2003) Reactive oxygen species in the plasticity of respiratory behavior elicited by chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol (1985)*; 94(6):2342-9.
- Perry VH (2003) The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. *Brain Behav. Immun*; 18, 407– 413.
- Perry VH, Nicoll JA, Holmes C (2010) Microglia in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neurology*, 6(4), 193-201.
- Picardo MC, Weragalaarachchi KT, Akins VT, Del Negro CA (2013) Physiological and morphological properties of Dbx1-derived respiratory neurons in the pre-Botzinger complex of neonatal mice. *J Physiol*; 591(10):2687-703.

- Pocock JM, Kettenmann H (2007) Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends in neurosciences*; 30(10), 527-535.
- Pokorski (2016). Advances in Experimental Medicine and Biology. *Neuroscience and Respiration*, Volume 884, ISBN 978-3-319-24484-6 (eBook)
- Pozner A, Xu B, Palumbos S, Gee JM, Tvrđik P, Capecchi MR (2015) Intracellular calcium dynamics in cortical microglia responding to focal laser injury in the PC:G5-tdT reporter mouse. *Front Mol Neurosci*; 8:12.
- Prabhakar P, Reeta KH, Maulik SK, Dinda AK, Gupta YK (2015) Protective effect of thymoquinone against high-fructose diet-induced metabolic syndrome in rats. *Eur J Nutr*; 54(7):1117-27.
- Pyatin VF, Miroshnichenko IV (2001) Effects of nitric oxide on respiratory activity in bulbospinal preparation from rat fetus. *Bull Exp Biol Med*; 132(2):723-6.
- Qin L, Li G, Qian X, Liu Y, Wu X, Liu B, Hong JS, Block ML (2005) Interactive role of the toll-like receptor 4 and reactive oxygen species in LPS-induced microglia activation. *Glia*; 52(1):78-84.
- Raghuraman R, Rangarajan P, Dheen T, Sreedharan S (2016) Role of microglia in long-term potentiation and synaptic tagging. SFN, 2016, Resumen
- Ragozzino D, Angelantonio S, Trettel F, Bertollini C, Maggi L, Gross C, Eusebi F (2006) Chemokine fractalkine/CX3CL1 negatively modulates active glutamatergic synapses in rat hippocampal neurons. *J Neurosci*; 26(41), 10488-10498.
- Ramirez JM, Doi A, Garcia AJ 3rd, Elsen FP, Koch H, Wei AD (2012) The cellular building blocks of breathing. *Compr Physiol*; 2(4):2683-731. Review.
- Ramirez JM, Richter DW (1996) The neuronal mechanisms of respiratory rhythm generation. *Curr Opin Neurobiol*; 6(6):817-25. Review.
- Ramírez-Jarquín JO, Lara-Hernández S, López-Guerrero JJ, Aguilera Miguel A, Rivera-Angulo AJ, Sampieric A, Vaca L, Ordaz Be, Peña-Ortega F (2012) Somatostatin modulates generation of inspiratory rhythms and determines asphyxia survival. *Peptides*; 34 (2012) 360–372.
- Ransohoff RM, Liu L, Cardona AE (2007) Chemokines and chemokine receptors: multipurpose players in neuroinflammation. *Int Rev Neurobiol*; 82:187–204.
- Raza MW, Blackwell C (1999). Sudden infant death syndrome, virus infections and cytokines. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*; 25 85-96.
- Reid IM, Solomon IC (2014) Intermittent hypoxia-induced respiratory long-term facilitation is dominated by enhanced burst frequency, not amplitude, in spontaneously breathing urethane-anesthetized neonatal rats. *Prog Brain Res*; 212:221-35.
- Rivera-Angulo AJ. y Peña-Ortega F (2014) Isocitrate Supplementation Promotes Breathing Generation, Gasping, and Autoresuscitation in Neonatal Mice. *J Neurosci res*; 92:375–388.
- Rogers JT, Morganti JM, Bachstetter AD, Hudson CE, Peters MM, Grimmig BA, Weeber EJ, Bickford PC, Gemma C (2011) CX3CR1 deficiency leads to impairment of hippocampal cognitive function and synaptic plasticity. *J Neurosci*; 31(45):16241-50.
- Röhl C, Sievers J (2005) Microglia is activated by astrocytes in trimethyltin intoxication. *Toxicol Appl Pharmacol*; 204(1):36-45.

- Rooijen N, Sanders A (1994) Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods*; 174(1-2):83-93.
- Rooijen N, Sanders A, van den Berg TK (1996) Apoptosis of macrophages induced by liposome-mediated intracellular delivery of clodronate and propamidine. *J Immunol Methods*; 193(1):93-9.
- Ryan S, Nolan P (2009) Episodic hypoxia induces long-term facilitation of upper airway muscle activity in spontaneously breathing anaesthetized rats. *J Physiol*; 587(Pt 13):3329-42.
- Sandhu MS, Lee KZ, Fregosi RF, Fuller DD (2010) Phrenicotomy alters phrenic long-term facilitation following intermittent hypoxia in anesthetized rats. *J Appl Physiol (1985)*; 109(2):279-87.
- Sawada M (2012) Strategies of myelin regeneration with optogenetically controlled glial cells. *Rinsho Shinkeigaku*; 52(11):1357-9. Japonés.
- Sawada M, Kondo N, Suzumura A, Marunouchi T (1989) Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. *Brain Res*; 491 394-397
- Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA, Stevens B (2012) Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron*; 74:691–705.
- Scheffel J, Regen T, Van Rossum D, Seifert S, Ribes S, Nau R, Hanisch UK (2012) Toll-like receptor activation reveals developmental reorganization and unmasks responder subsets of microglia. *Glia*; 60(12), 1930-1943.
- Schnydrig S, Korner L, Landweer S, Ernst B, Walker G, Otten U, Kunz D (2007) Peripheral lipopolysaccharide administration transiently affects expression of brain-derived neurotrophic factor, corticotropin and proopiomelanocortin in mouse brain. *Neurosci Lett*; 429(1):69-73.
- Schütze S, Machleidt T, Krönke M (1992) Mechanisms of tumor necrosis factor action. *Semin Oncol*; 19(2 Suppl 4):16-24.
- Shaked I, Porat Z, Gersner R, Kipnis J, Schwartz M (2004) Early activation of microglia as antigen-presenting cells correlates with T cell-mediated protection and repair of the injured central nervous system. *Journal of neuroim*; 146(1), 84-93.
- 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(4):1853-60.
- Shao XM, Feldman JL (2001) Mechanisms underlying regulation of respiratory pattern by nicotine in preBötzinger complex. *J Neurophysiol*; 85(6):2461-7.
- Shao XM, Feldman JL (2002) Pharmacology of nicotinic receptors in preBötzinger complex that mediate modulation of respiratory pattern. *J Neurophysiol*; 88(4):1851-8.
- Shemer A, Erny D, Jung S, Prinz M (2015) Microglia plasticity during health and disease: an immunological perspective. *Trends Immunol*; 36:614–24.
- Sierra A, Encinas JM, Deudero JJ, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS, Maletic-Savatic, M (2010) Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell stem cell*; 7(4), 483-495.

- Smith J, Ellenberger H, Ballanyi K, Richter D, Feldman JL (1991) Pre-Bötzinger Complex: A Brainstem Region That May Generate Respiratory Rhythm in Mammals. *Science*; 254(5032): 726–729.
- Smith JA, Das A, Ray SK, Banik NL (2012) Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull*; 87:10–20.
- Smith S. M, Friedle SA, Watters JJ (2013) Chronic intermittent hypoxia exerts CNS region-specific effects on rat microglial inflammatory and TLR4 gene expression. *PLOS ONE*; 8, e81584
- Solà-Soler J y Fiz José (2015) Cardiorespiratory Phase Synchronization in OSA subjects during wake and sleep states. *IEEE*; 978-1-4244-9270-1/15, páginas 7708-7711
- Stoltenberg L, Sundar T, Almaas R, Storm H, Rognum TO, Saugstad OD (1994) Changes in apnea and autoresuscitation in piglets after intravenous and intrathecal interleukin-1 beta injection. *J Perinat Med*; 22(5):421-32.
- 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(4):499-512.
- Sun H, Liang R, Yang B, Zhou Y, Liu M, Fang F, Ding J, Fan Y, Hu G (2016) Aquaporin-4 mediates communication between astrocyte And microglia: implications of neuroinflammation in Experimental parkinson's disease. *Neuroscience*; 317-65–75
- Tadjalli A, Duffin J, Li YM, Hong H, Peever J (2007) Inspiratory activation is not required for episodic hypoxia-induced respiratory long-term facilitation in postnatal rats. *J Physiol*; 585(Pt 2):593-606.
- 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*; 11(5):538-40.
- Tanaka KF, Matsui K, Sasaki T, Sano H, Sugio S, Fan K, Hen R, Nakai J, Yanagawa Y, Hasuwa H, Okabe M, Deisseroth K, Ikenaka K, Yamanaka A (2012) Expanding the repertoire of optogenetically targeted cells with an enhanced gene expression system. *Cell Rep*; 2(2):397-406.
- Tanaka S, Ide M, Shibutani T, Ohtaki H, Numazawa S, Shioda S, Yoshida T (2006) Lipopolysaccharide-induced microglial activation induces learning and memory deficits without neuronal cell death in rats. *J Neurosci Res*; 83(4):557-66.
- Taylor RA, Hammond MD, Ai Y, Sansing LH (2015) CX3CR1-null Microglia Fail to Transition to an M2 Phenotype after Intracerebral Hemorrhage. *Stroke*; 46, A114-A114.
- Tremblay M.È, Lowery RL, Majewska AK (2010) Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLOS biology*; 8(11), 2693.
- Tremblay MÈ, Stevens B, Sierra A, Wake H, Bessis A, Nimmerjahn A (2011) The role of microglia in the healthy brain. *J Neurosci*; 31(45), 16064-16069.
- Truman LA, Ford CA, Pasikowska M, Pound JD, Wilkinson SJ, Dumitriu IE, Gregory CD (2008) CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. *Blood*; 112(13), 5026-5036.
- 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(5):2114-25.

- Tryba AK, Peña F, Ramirez JM (2003) Stabilization of bursting in respiratory pacemaker neurons. *J Neurosci*; 23:3538–3546
- Van Dam A.M, Bauer J, Tilders FJ, Berkenbosch F (1995) Endotoxin-induced appearance of Immunoreactive interleukin-1/3 in ramified Microglia in rat brain: a light and Electron microscopic study. *Neuroscience*; 65-3:815-826
- Viana F, Bayliss DA, Berger AJ (1995) Repetitive firing properties of developing rat brainstem motoneurons. *J Physiol*; 486 (Pt 3):745-61.
- Vinit S, Windelborn JA, Mitchell GS (2011) Lipopolysaccharide attenuates phrenic long-term facilitation following acute intermittent hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol*; 176(3):130-5.
- Vukovic J, Colditz MJ, Blackmore DG, Ruitenber MJ, Bartlett PF (2012) Microglia modulate hippocampal neural precursor activity in response to exercise and aging. *J Neurosci*; 32(19):6435-43.
- Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J (2009) Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci*; 29(13), 3974-3980.
- Wang H, Stornetta RL, Rosin DL, Guyenet PG (2001) Neurokinin-1 receptor-immunoreactive neurons of the ventral respiratory group in the rat. *J Comp Neurol*; 434(2):128-46.
- Watanabe HC, Welke K, Schneider F, Tsunoda S, Zhang F, Deisseroth K, Hegemann P, Elstner M (2012) Structural model of channelrhodopsin. *J Biol Chem*; 287(10):7456-66.
- Wiley RG, Lappi DA (1997) Destruction of neurokinin-1 receptor expressing cells in vitro and in vivo using substance P-saporin in rats. *Neurosci Lett*; 230(2):97-100.
- Wilkerson JE, Macfarlane PM, Hoffman MS, Mitchell GS (2007) Respiratory plasticity following intermittent hypoxia: roles of protein phosphatases and reactive oxygen species. *Biochem Soc Trans*; 35(Pt 5):1269-72.
- Winter SM, Fresemann J, Schnell C, Oku Y, Hirrlinger J, Hülsmann S (2009) Glycinergic interneurons are functionally integrated into the inspiratory network of mouse medullary slices. *Pflugers Arch*; 458(3):459-69.
- Wolf Y, Yona S, Kim KW, Jung S (2013) Microglia, seen from the CX3CR1 angle. *Front Cell Neurosci*; 7:26.
- Wu JL, Stevens B, Duan S, MacVicar B (2013) Microglia in Neuronal Circuits. *Neural Plasticity* 2013:586426.
- Wu Z, Zhang J, Nakanishi H (2005) Leptomeningeal cells activate microglia and astrocytes to induce IL-10 production by releasing pro-inflammatory cytokines during systemic inflammation. *Journal of Neuroimmunology*; 167 -90 – 98.
- Xing T, Fong AY, Bautista TG, Pilowsky PM (2013) Acute intermittent hypoxia induced neural plasticity in respiratory motor control. *Clin Exp Pharmacol Physiol*; 40(9):602-9. Review
- Yawo H, Asano T, Sakai S, Ishizuka T (2013) Optogenetic manipulation of neural and non-neural functions. *Dev Growth Differ*; 55(4):474-90. Review.
- Zabka AG, Behan M, Mitchell GS (2001) Long term facilitation of respiratory motor output decreases with age in male rats. *J Physiol*; 531(Pt 2):509-14.
- Zabka AG, Mitchell GS, Behan M (2005) Ageing and gonadectomy have similar effects on hypoglossal long-term facilitation in male Fischer rats. *J Physiol*; 563(Pt 2):557-68.

- Zabka AG, Mitchell GS, Behan M (2006) Conversion from testosterone to oestradiol is required to modulate respiratory long-term facilitation in male rats. *J Physiol*; 576(Pt 3):903-12.
- Zabka AG, Mitchell GS, Olson EB Jr, Behan M (2003) Selected contribution: chronic intermittent hypoxia enhances respiratory long-term facilitation in geriatric female rats. *J Appl Physiol (1985)*; 95(6):2614-23; discusión 2604.
- Zanella S, Doi A, Garcia AJ 3rd, Elsen F, Kirsch S, Wei AD, Ramirez JM (2014) When norepinephrine becomes a driver of breathing irregularities: how intermittent hypoxia fundamentally alters the modulatory response of the respiratory network. *J Neurosci*; 34(1):36-50.
- Zavala-Tecuapetla C, Tapia D, Rivera-Angulo AJ, Galarraga E, Peña Ortega F (2014) Morphological Characterization of Respiratory Neurons in the Pre-Bötzinger Complex. *Prog Brain Res*; 209:39-56.
- Zhan Y, Paolicelli RC, Sforzini F, Weinhard L, Bolasco G, Pagani F, Vyssotski AL, Bifone A, Gozzi A, Ragozzino D, Gross CT (2014) Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. *Nat Neurosci*; 17(3):400-6.
- Zhang Z., Wang B, Xiaoke H, Wu W, Chai W. Peng CK (2016) Effects of slow and regular breathing exercise on cardiopulmonary coupling and blood pressure. *Med Biol Eng Comput*; 55(2):327-341.
- 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(1-2):113-25.
- Zhuang ZY, Kawasaki Y, Tan PH, Wen YR, Huang J, Ji RR (2007) Role of the CX3CR1/p38 MAPK pathway in spinal microglia for the development of neuropathic pain following nerve injury-induced cleavage of fractalkine. *Brain Behav Immun*; 21(5): 642–651.
- Ziebell J, Adelson D, Jonathan Lifshitz J (2015) Microglia: dismantling and rebuilding circuits after acute neurological injury. *Metab Brain Dis*; 30(2):393-400

13- LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Rebanada de tallo cerebral que muestra la localización del CPB
- Figura 2.** Registro de la actividad extracelular del Complejo Pre Bötzing (CPB) y protocolo de hipoxia sostenida
- Figura 3.** Protocolo de HI
- Figura 4.** Inducción de la LTF en rebanadas de tallo cerebral.
- Figura 5.** La microglía y sus perfiles de activación, interleucinas que participan en las respuestas pro y anti-inflamatorias.
- Figura 6.** Dinámica de los procesos microgliales determinada con videomicroscopía de dos fotones.
- Figura 7.** La falta del receptor CX3CR1 impide la generación de LTP
- Figura 8.** Ilustración esquemática de la expresión dirigida de canalrhodopsina a través de un enfoque Cre-LoxP.
- Figura 9.** Estabilidad de la actividad de campo del circuito generador de la respiración
- Figura 10.** Inducción de la LTF en respuesta a la HI.
- Figura 11.** Efecto de la activación optogenética de la microglía sobre la actividad del circuito generador de la respiración en un modelo de ratón transgénico que expresa ChR2 en la microglía.
- Figura 12.** Respuesta del CPB ante la HI cuando la microglía es activada optogenéticamente
- Figura 13.** Estabilidad de la actividad de campo del circuito generador de la respiración en un modelo de ratón transgénico carente del receptor de fractalquina (CX3CR1^{-/-}).
- Figura 14.** Respuesta del circuito generador de la respiración a la HI en ratones transgénicos CX3CR1^{-/-} y CX3CR1^{-/+}.
- Figura 15.** Efecto del LPS sobre la amplitud y la frecuencia de la actividad del generador de la respiración.
- Figura 16** Efecto de clodronato liposomal sobre la microglía

Figura 17. Efecto de un depletador de la microglía sobre la amplitud y la frecuencia del ritmo respiratorio.

Figura 18. Respuesta del CPB ante la HI cuando la microglía es eliminada.