



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

CAMBIOS EN LA CONECTIVIDAD DEL COMPLEJO
PRE-BÖTZINGER EN CONDICIONES DE HIPOXIA

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
Méd. Cir. ANDRÉS NIETO POSADAS

DIRECTOR DE TESIS
DR. JOSÉ FERNANDO PEÑA ORTEGA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA, UNAM

COMITÉ TUTOR
DRA. ELVIRA GALARRAGA PALACIO
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

DR. HUGO MERCHANT NANCY
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

JURIQUILLA, QUERÉTARO SEPTIEMBRE 2015



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.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi profundo agradecimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), especialmente al Instituto de Neurobiología (INB), por todo el apoyo brindado en mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico que me otorgó: No. de Becario: 350947/239711.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM.

Al Dr. José Fernando Peña Ortega por haberme proporcionado orientación y apoyo durante mi formación académica así como un entorno científico crítico, el cual me permitió crecer académica y personalmente.

A los miembros de mi comité tutor, la Dra. Elvira Galarraga Palacio y a el Dr. Hugo Merchant Nancy, por su asesoría y comentarios a lo largo del desarrollo de mi doctorado.

A Ana Julia Rivera Angulo, M en C. Ernesto Flores Martínez y al M. en C. Jonathan Julio Ismael Lorea Hernández por su invaluable apoyo para el desarrollo de gran parte de los datos presentados en esta tesis. Ana y Jon por su apoyo en la preparación de rebanadas y registro de las mismas y a Ernesto por su apoyo en la programación de MATLAB.

Al Dr. José Bargas Díaz y a Jesús Esteban Pérez Ortega por sus observaciones y contribuciones en el desarrollo de parte de este proyecto.

A mis compañeros y amigos del INB, Dra. Vania Carmona Alcocer, Dr. Benito Ordaz Sánchez, Dr. Eduardo Blanco Hernández, Dr. Hugo Belleza Tapia, M. en C. Leonor Casanova Rico, M en C. Reynaldo Alvarado Martínez, Rigo Hernández Calderón, M en C. Stephanie Vargas Abonce, Arturo González Isla, Karla Salgado Puga, Abraham Márquez Ramos.

Para el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo de los donativos de CONACyT (181323, 246888 y 235789), de la Alzheimer's Association (NIRG-11-205443) y de DGAPA-UNAM (IN200715) otorgados al Dr. José Fernando Peña Ortega.

A *Astrid y Javier*

Índice

	Página
Índice	1
Abreviaturas	3
Resumen	6
Abstract	8
1.-Introducción	10
La Respiración	10
Control de los músculos respiratorios	12
Clasificación de las neuronas respiratorias	15
El Complejo Pre-Bötzinger: Circuito generador de la respiración	16
Ritmos respiratorios generados por el Complejo Pre-Bötzinger	18
Modelos de la Generación del ritmo respiratorio	28
Cambios en la transmisión sináptica durante la hipoxia: Papel de la adenosina	38
El receptor de adenosina tipo A ₁ y la respiración	43
2.-Planteamiento del problema	46
3.-Hipótesis	48
4.-Objetivo general	48
5.-Objetivos particulares.	48
6.-Materiales y Métodos	49
Animales	49
Obtención de rebanadas coronales de tallo cerebral	49
Registros de rebanadas con multielectrodos	50
Registros de Patch-Clamp.	55
Análisis de la cinética de las ráfagas respiratorias	57
Análisis de los sinápticos espontáneos y poblacionales	58
Estadística	59
Fármacos	60
7.-Resultados	61
Cambios en la configuración del preBötC en condiciones de	

hipoxia, evaluados con arreglos de multielectrodos	61
Cambios en la transmisión sináptica excitadora en el preBötC en condiciones de hipoxia	69
8.-Discusión	77
Reconfiguración de los ensambles neuronales del preBötC en condiciones de hipoxia	78
Cambios en la tasa de disparo de las neuronas respiratorias producidos por la hipoxia	80
Cambios en la conectividad funcional de los elementos o neuronas respiratorias del preBötC durante la reconfiguración	83
Disminución diferencial de la transmisión sináptica del preBötC en condiciones de hipoxia	87
Consideraciones finales	89
9.-Conclusiones	91
10.-Bibliografía	91
11.-Apéndice131

Abreviaturas

8-SPT : 8 sulfofenil teofilina.

A₁: receptor tipo 1 de adenosina.

A5: área noradrenérgica 5.

AMP: Adenosín-monofosfato.

AMPc: Adenosín-monofosfato cíclico.

ATP: Adenosín-trifosfato.

CaMKII: cinasa II dependiente de Ca²⁺/calmodulina.

CB: complejo Böttinger.

CO₂: dióxido de carbono.

CRV: columna respiratoria ventral.

DPCPX: 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine

Gα_i: proteína Gα_i.

Gα_{olf}: proteína Gα_{olf}.

Gα_s: proteína Gα_s.

GABA: ácido gamma-amino butírico.

GIRK: canales de potasio acoplados a proteínas G.

GRD: grupo respiratorio dorsal.

GRP: grupo respiratorio pontino.

GRpF: grupo respiratorio parafacial.

GRV: grupo respiratorio ventral.

GRVc: grupo respiratorio ventral caudal.

GRVr: grupo respiratorio ventral rostral.

I_{CAN}: corriente catiónica inespecífica activada por calcio.

IK_{ATP}: canales de potasio sensibles a ATP.

I_{K-Leak}: corriente de fuga de potasio.

I_{NaP}: corriente persistente de sodio.

Ins-Cd: neuronas marcapasos insensibles a cadmio.

ISI: Intervalo inter-espiga, por sus siglas en inglés.

K_{ATP}: canales de potasio sensibles a ATP.

K_{Ca}: canales de potasio activados por calcio.

KF: núcleo Kölliker-Fuse.

K_v: canales de potasio activados por voltaje.

MUA: actividad multi-unitaria, por sus siglas en inglés.

NCPA: N6-Ciclopentil adenosina.

NAc: núcleo ambiguo caudal.

NAr: núcleo ambiguo rostral.

NK1: neurokinina tipo 1.

NK1R: receptor de neurokinina tipo 1 (receptor a sustancia P).

NMDA: N-metil-D-aspartato.

NRL: núcleo reticular lateral.

NRT: núcleo retrotrapezoide.

NTS: núcleo del tracto solitario.

O₂: Oxígeno.

PB: núcleo parabraquial.

PEPS: potencial excitatorio post sináptico.

PGi: núcleo reticular paragigantocellular.

PIPS: potencial inhibitorio post sináptico.

PKA: proteína cinasa A, por sus siglas en inglés.

PKC: proteína cinasa C, por sus siglas en inglés.

preBötC: complejo Pre-Bötzing, por sus abreviatura internacional y sus siglas en inglés.

rAMPA: receptor del Ácido alfa-Amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol Propiónico.

R-PIA: (R)-N6-(2- fenil isopropil)- adenosina.

RNAM: ácido ribonucleico mensajero.

RTN/GRPF: núcleo retrotrapezoide/Grupo Respiratorio paraFacial.

Sen-Cd: neuronas marcapasos sensibles a cadmio.

SIDS: Síndrome de muerte súbita del lactante, por sus siglas en inglés.

SNC: Sistema Nervioso Central.

Sst: somatostatina.

SUA: actividad unitaria, por sus siglas en inglés.

TASK: canales de potasio con dos dominios de poro.

TTX : tetrodotoxina.

μM: micromolar.

VII: núcleo facial.

VGCC: canales de Ca²⁺ activados por voltaje, por sus siglas en inglés.

Resumen

La respiración es una de las funciones más importantes en los animales que, en los mamíferos, es generada por el complejo pre-Bötzinger (preBötC) del tallo cerebral. El preBötC es capaz de generar distintos ritmos respiratorios dependiendo de la disponibilidad de oxígeno: la eupnea durante la oxigenación normal (normoxia) y, en condiciones de hipoxia, este circuito es capaz de reconfigurarse, al reorganizar la actividad de las neuronas respiratorias, para generar boqueos. Los mecanismos involucrados en esta reconfiguración han sido ampliamente investigados mediante estudios unicelulares. Sin embargo, los cambios globales que ocurren a nivel del circuito y los neuromoduladores que lo subyacen aún no han sido identificados. Dado que una falla en la generación de boqueos se ha relacionado con la muerte súbita del lactante, el estudio de los mecanismos de la generación de los boqueos tiene relevancia clínica. En este trabajo se estudió la conformación del preBötC en la normoxia y su reconfiguración durante la hipoxia mediante el registro del preBötC con matrices de multielectrodos y la evaluación de la conectividad funcional de los elementos respiratorios mediante correlogramas cruzados de los trenes de disparo de los mismos. Los resultados mostraron que la hipoxia produce una reducción en la fuerza o magnitud de la conectividad funcional dentro del preBötC sin reducir el número de conexiones y sin reducir el número de neuronas activas. La reducción en la fuerza de las interacciones en la hipoxia se correlacionó con una disminución en la actividad de sináptica espontánea que fue mediada por la activación pre sináptica del receptor de adenosina tipo A_1 . En contraste a lo propuesto anteriormente en base a estudios enfocados al nivel unicelular, en esta tesis se mostró que la reconfiguración del circuito

respiratorio por la hipoxia involucra una disminución diferencial de la transmisión sináptica excitadora, que se refleja en cambios en la fuerza, pero no en el número, de las interacciones funcionales entre las neuronas respiratorias. A partir de estos resultados, se sugiere que el preBötC puede cambiar su patrón de actividad al ajustar únicamente la fuerza de las interacciones entre las neuronas. Por otra parte, la regulación diferencial de la excitabilidad durante periodos de hipoxia podría ser un mecanismo por el cual el preBötC es capaz de tolerar periodos prolongados de hipoxia.

Abstract

Breathing is one of the most important functions that, in mammals is generated by the pre-Bötzinger complex (preBötC) located in the brainstem. The preBötC is able to generate different breathing patterns depending on oxygen availability: during normal oxygenation this circuit produces eupnea (normoxia) and under hypoxic conditions this circuit reconfigures, through reorganizing the activity of the respiratory neurons, to produce gasping. The mechanisms involved in the reconfiguration of the preBötC have been extensively investigated by cell-focused studies. However, the global changes occurring at the circuit level and the neuromodulators involved in this reconfiguration have not yet been identified. Since a failure to gasp has been linked to sudden infant death, the study of the mechanisms of gasping generation have clinical relevance. Here, we studied the preBötC configuration in normoxia and its reconfiguration during hypoxia by recording the preBötC with multi-electrodes arrays and by assessing the correlated firing among respiratory neurons. The results showed that hypoxia causes a reduction in the strength or of the functional connectivity within preBötC without reducing the number of connections within the preBötC and without reducing the number of active neurons. The reduction in strength of functional interactions during hypoxia is correlated with a decrease in spontaneous synaptic activity mediated by the activation of presynaptic A₁ adenosine receptor. In contrast to previous proposals based on cell focused studies, in this thesis it was shown that the reconfiguration of the preBötC under hypoxia involves a differential decrease of the excitatory synaptic transmission, which is reflected in changes in the strength, but not the number of the functional interactions among respiratory

neurons. From these results, it is suggested that the preBötC is able to change its population burst pattern by just changing the strength of the interactions among its elements. Moreover, the dynamic and differential excitability regulation during hypoxia may be a mechanism by which the preBötC can tolerate prolonged periods of hypoxia.

1.- Introducción

La respiración

La respiración es una de las funciones más importantes en los animales, ya que además de permitir el intercambio de gases, es necesaria para mantener el metabolismo, regular el pH, etc. (Peña y García, 2006; Hall y Guyton, 2011). Las funciones de la respiración se han agrupado en cuatro (Hall y Guyton, 2011):

- 1) Ventilación: entrada y salida de aire desde el ambiente a los pulmones.
- 2) Intercambio de gases: O_2 y CO_2 entre los alveolos y la sangre.
- 3) Transporte de O_2 y CO_2 .
- 4) Regulación de la ventilación, la cual consiste en el ajuste de la velocidad de la ventilación alveolar por parte del sistema nervioso central (SNC).

La ventilación en los mamíferos, es llevada a cabo por la contracción rítmica de la caja torácica y de los músculos respiratorios (Hall y Guyton, 2011), que puede llevarse a cabo de manera “normal” o forzada (Fox, 2011; Hall y Guyton, 2011). La primera se produce por el movimiento del diafragma para modificar el volumen de la caja torácica (Fox, 2011; Hall y Guyton, 2011), mientras que la segunda, involucra la elevación y descenso de las costillas por la contracción/relajación de los siguientes grupos musculares (**Figura 1**; Hall y Guyton, 2011):

1) Músculos inspiratorios:

- a. Intercostales externos: contribuyen al movimiento de las costillas.
- b. Esternocleidomastoideo: eleva el esternón.
- c. Serratos anteriores: contribuyen al movimiento de las costillas.
- d. Escalenos: elevación de las dos primeras costillas

2) Músculos espiratorios:

- a. Rectos del abdomen: jalan las costillas hacia abajo.
- b. Intercostales: los intercostales externos se contraen durante la inspiración, mientras que los internos se relajan, permitiendo de esta forma que la caja torácica se expanda.

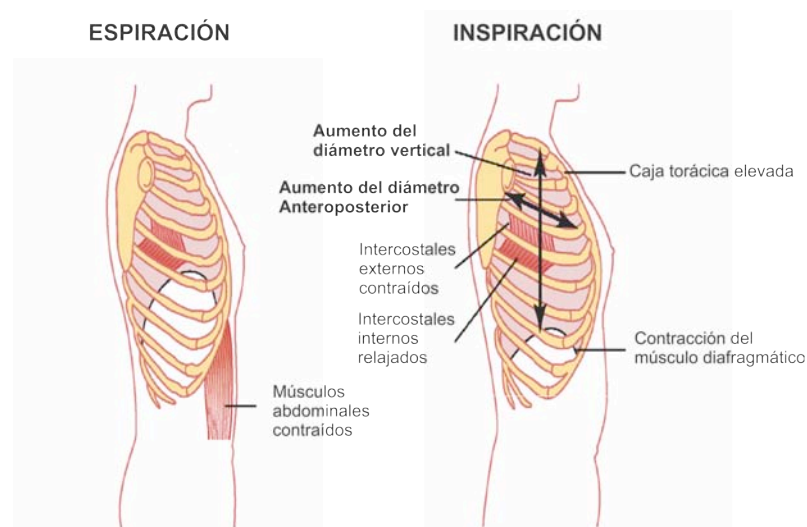


Figura 1.- Esquema de los cambios en la caja torácica producidos por la contracción de los músculos durante la espiración y la inspiración. Nótese el aumento del diámetro de la caja torácica durante la inspiración. Modificado de Hall y Guyton, 2011.

Control de los músculos respiratorios

Los músculos involucrados en la respiración (músculos respiratorios) son comandados por motoneuronas localizadas a diferentes niveles del SNC (Bianchi et al., 1995; Richter y Spyer, 2001; Hilaire y Pasaro, 2003). Las motoneuronas que controlan las vías aéreas superiores se localizan a nivel craneal, las que controlan el diafragma se localizan a nivel cervical de la médula espinal y las que controlan la caja torácica y los músculos abdominales se encuentran en los segmentos torácicos de la médula espinal (Bianchi et al., 1995; Richter y Spyer, 2001; Hilaire y Pasaro, 2003).

Las núcleos neuronales respiratorios se localizan en la columna respiratoria ventral (CRV) del bulbo raquídeo, la cual se puede dividir en los grupos neuronales que se describen a continuación (Onimaru et al., 1988; Ezure, 1990; Hilaire et al., 1990; Bianchi et al., 1995; Feldman et al., 2003; Onimaru y Homma, 2003; Wong-Riley y Liu, 2005; Feldman et al., 2013; Smith et al., 2013; Richter y Smith, 2014) (**Figura 2**):

- Grupo Respiratorio Pontino (GRP): incluye neuronas del núcleo Kölliker-Fuse y del complejo parabraquial lateral y medial (Wong-Riley y Liu, 2005; Mulkey et al., 2007). El GRP parece ser necesario para la coordinación de la actividad de los músculos espiratorios y de la musculatura de las vías aéreas superiores durante la espiración (vocalización) (Alheid et al., 2004; Wong-Riley y Liu, 2005).

- Núcleo retrotrapezoide/Grupo Respiratorio parafacial (RTN/GRPF): Esta región contiene neuronas que son reguladas por CO₂ y/o por pH (Mulkey et al., 2004), así como por la información proveniente de los quimiorreceptores periféricos (Takakura et al., 2006). Se ha propuesto que el RTN/GRPF interactúa con el preBötC para generar patrones de respiración coordinados durante la espiración activa (Onimaru y Homma, 2003).
- El Complejo Bötzing (CB): contiene neuronas espiratorias, principalmente inhibitoras, tanto glicinérgicas como GABAérgicas (Ezure, 1990; Wong-Riley y Liu, 2005; Smith et al., 2007; Dubreuil et al., 2009; Burke et al., 2010), las cuales inhiben a las neuronas inspiratorias para inducir la transición entre la inspiración y la espiración (Smith et al., 2013; Richter y Smith, 2014).
- El Complejo pre-Bötzing (preBötC): es el centro generador de la respiración (Onimaru et al., 1988; Smith et al., 1991; McKay et al., 2005; Wong-Riley y Liu, 2005; Koizumi et al., 2008; Bouvier et al., 2010; Peña-Ortega, 2012).
- El Grupo Respiratorio Ventral (GRV): Este conjunto de neuronas inspiratorias, que se dividen en rostrales y caudales, proyectan al nervio frénico que, a su vez, controla al diafragma (Alheid y McCrimmon, 2008). Las neuronas inspiratorias del GRV son comandadas por el preBötC e

inhibidas por el CB (Bianchi et al., 1995; Hilaire y Pasaro, 2003; Alheid et al., 2004; Alheid y McCrimmon, 2008).

- Núcleo del tracto solitario: es el punto de entrada de la información mecanorreceptora proveniente de los pulmones y de la información quimiorreceptora de la periferia (Nattie, 2001; Alheid et al., 2011).

- Otros núcleos involucrados en la respiración:
 - Núcleos del Rafé: contienen neuronas serotoninérgicas que proyectan a la CRV y que participan en la estabilización de la respiración (Hodges et al., 2009; Ptak et al., 2009; Depuy et al., 2011; Ray et al., 2011).

 - Núcleo Ambiguo, Núcleo Motor del Nervio Vago y Núcleo Hipogloso: Todos estos núcleos controlan las motoneuronas de las vías aéreas superiores (Nunez-Abades et al., 1992; St-John, 1998; Jordan, 2001; Wong-Riley y Liu, 2005).

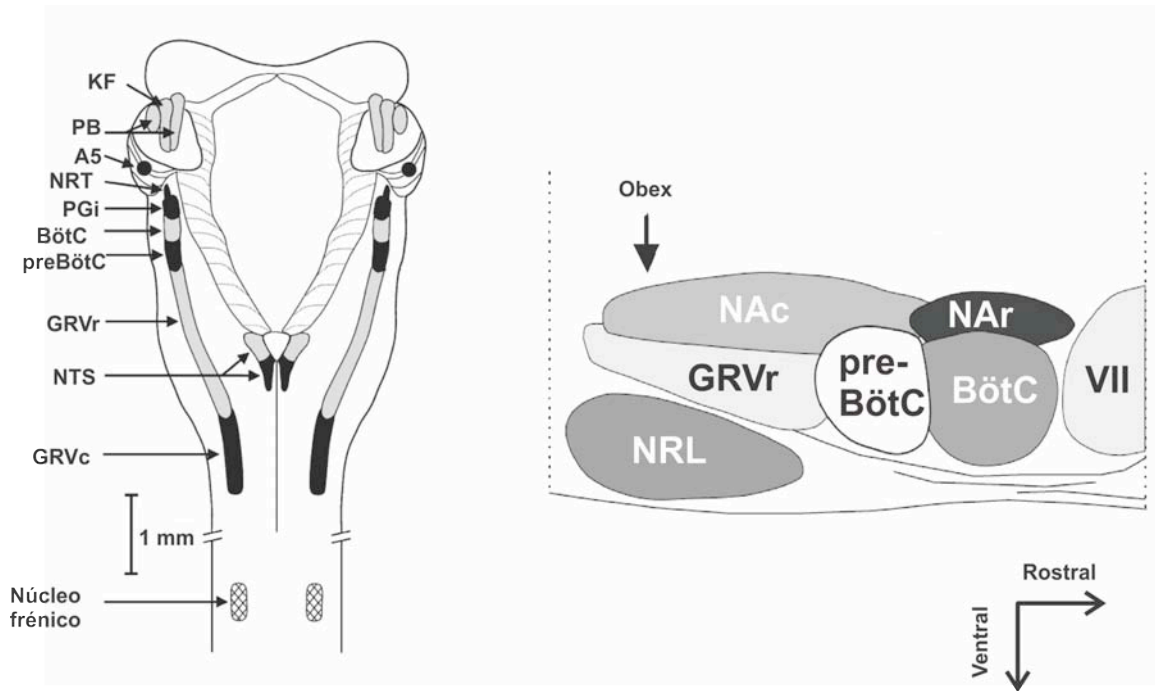


Figura 2.- Esquema de una vista dorsal (izquierda) y sagital (derecha) del bulbo raquídeo, en donde se puede ver la localización de los núcleos respiratorios incluido el complejo pre-Bötzinger. KF: núcleo Kölliker-Fuse; PB: núcleo parabraquial; A5: área noradrenérgica; NRT: núcleo retrotrapezoide; PGi: núcleo reticular paragigantocelular; BötC: complejo Bötzingero; preBötC: complejo preBötzingero; GRVr: grupo respiratorio ventral rostral; NTS: núcleo del tracto solitario; GRVc: grupo respiratorio ventral caudal; NAc: núcleo ambiguo caudal; NAr: núcleo ambiguo rostral; NRL: núcleo reticular lateral y VII: núcleo facial. Modificado de (Rekling y Feldman, 1998).

Clasificación de las Neuronas Respiratorias

Las neuronas respiratorias son aquellas que están involucradas en la generación y control de la respiración y que disparan sus potenciales de acción preferentemente en alguna de las fases del ritmo respiratorio (Duffin, 2004). A este respecto, las neuronas respiratorias se pueden clasificar como inspiratorias y espiratorias (Feldman y Kam, 2015), las primeras disparando sus potenciales de acción durante la inspiración, mientras que las segundas

aumentando su frecuencia de disparo entre inspiraciones (Thoby-Brisson y Ramirez, 2000; Smith et al., 2013; Richter y Smith, 2014). Dentro de las neuronas inspiratorias existen diversos subtipos que se basan en el patrón de disparo de las neuronas durante la inspiración y que las divide en los siguientes subtipos: incrementador, decrementador o constante (Hayes y Del Negro, 2007; Smith et al., 2013 ; Richter y Smith, 2014).

El Complejo Pre-Bötzinger: Circuito generador de la Respiración

Como se mencionó anteriormente, el ritmo respiratorio se genera por neuronas del bulbo raquídeo, específicamente por un grupo neuronal denominado Complejo pre-Bötzinger (preBötC) en la CRV (Onimaru et al., 1988; Smith et al., 1991; Wong-Riley y Liu, 2005; Peña-Ortega, 2012). El preBötC corresponde a una región de entre 350 y 700 μM que se encuentra rostral al obex y ventral al núcleo ambiguo (Smith et al., 1991). La mayoría de las neuronas del preBötC expresan a la somatostatina (Sst) (Stornetta et al., 2003; Tan et al., 2008), a los receptores a neurokinina 1 (NK1) (Gray et al., 2001) y a los transportadores Vglut2 (Wallen-Mackenzie et al., 2006). Estas neuronas son bilaterales y proyectan hacia ambos lados del bulbo raquídeo a través de proyecciones comisurales (Koshiya y Smith, 1999; Stornetta et al., 2003; Funke et al., 2007; Koizumi et al., 2008; Tan et al., 2008).

La evidencia que indica que el preBötC es suficiente y necesario para la generación del ritmo respiratorio se produjo gracias a los siguientes trabajos seminales: el primero de ellos se produjo con el desarrollo de la preparación

denominada “*en bloc*”, la cual consiste en el aislamiento del bulbo raquídeo junto con la médula espinal (Suzue, 1984). Dicha preparación es capaz de generar actividad rítmica, registrada en los nervios frénico e hipogloso (Suzue, 1984). Posteriormente, Smith *et al*, (1991) hicieron una serie de cortes secuenciales en dirección rostro-caudal en esta preparación, a partir del puente, y demostraron que el preBötC es la región necesaria para generar el ritmo respiratorio, pues un corte más allá de esta región abole la generación del ritmo respiratorio. Además, estos autores demostraron que cuando se aísla el preBötC en una rebanada, este circuito es capaz de mantener la generación de actividad rítmica que se puede registrar de las raíces del nervio hipogloso. Posteriormente, al hacer una disección extra de la rebanada de tallo cerebral que para aislar al preBötC del resto de las estructuras adyacentes (**Figura 3a**) (Johnson *et al.*, 2001), se demostró que el preBötC, aislado en una “isla” es capaz de mantener la capacidad de generar actividad rítmica que presenta las mismas características de patrón y frecuencia que aquella generada en la rebanada de tallo cerebral.

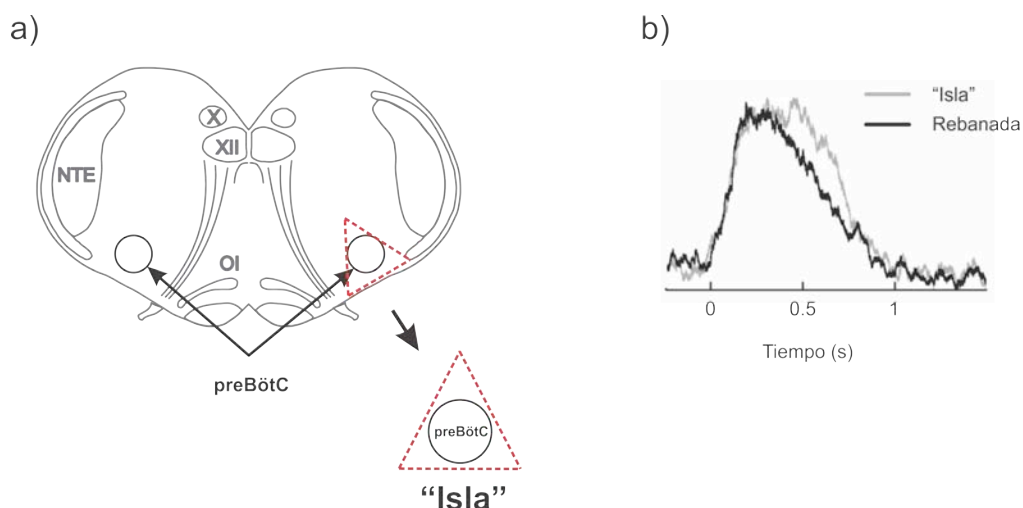


Figura 3.- Rebanada de tallo cerebral que contiene el preBötC y la preparación en “isla” de este circuito. **a)** Esquema de una rebanada de tallo cerebral y la zona correspondiente a la preparación en “isla” del preBötC (rectángulo rojo). **b)** Comparativo de la actividad poblacional

del preBötC en registros de rebanadas y de “islas”. Nótese que la actividad es prácticamente idéntica. Panel **b)** Modificado de (Johnson et al., 2001). No se muestran las unidades de la señal, debido a que es producto de la rectificación e integración de un registro de voltaje en el tiempo.

La perturbación de la actividad de las neuronas del preBötC “in vivo” ha demostrado también el papel fundamental de este circuito en la generación de los ritmos respiratorios (Ramirez et al., 1998b; Gray et al., 2001; Wenninger et al., 2004; McKay et al., 2005; Tan et al., 2008). Por ejemplo, la inhibición o eliminación de las neuronas del preBötC ocasiona alteraciones en el patrón respiratorio que pueden llegar a producir apnea (Gray et al., 2001; McKay et al., 2005; Tan et al., 2008). Por ejemplo, Tan *et al.* (2008) demostraron que la inhibición de la actividad de las neuronas somatostatinérgicas del preBötC produce apneas que pueden llegar a ser mortales de no aplicar apoyo ventilatorio en roedores. Por otra parte, la lesión neurotóxica de neuronas del preBötC que expresan el receptor a sustancia P (NK1, Neuro-Kinina 1) pueden producir ataxia respiratoria (Gray et al., 2001) o apneas durante el sueño (McKay et al., 2005).

Ritmos respiratorios generados por el Complejo Pre-Bötzinger

Se ha demostrado que el preBötC es capaz de generar distintos ritmos respiratorios dependiendo de la disponibilidad de oxígeno (Lieske et al., 2000). En condiciones normales de oxigenación (normoxia), el preBötC produce dos ritmos respiratorios: la respiración “normal” o eupnea y los “suspiros” (Lieske et al., 2000). Por otra parte, el mismo circuito, en condiciones de hipoxia

prolongada, es capaz de reconfigurarse para generar boqueos (Lieske et al., 2000).

Las respuestas a la hipoxia observadas *in vivo*, también pueden observarse *in vitro* en preparaciones de rebanadas de tallo cerebral que contienen al preBötC (Peña et al., 2004), por lo que esta preparación constituye un excelente modelo para el estudio de los mecanismos celulares que subyacen a la generación de los ritmos respiratorios (Lieske et al., 2000; Peña et al., 2004) y permite el uso de técnicas de registro uni- y multicelular en condiciones muy bien controladas (Carroll y Ramirez 2013; Carroll et al., 2013). A continuación, se hará una descripción breve de las características de los distintos patrones respiratorios generados por el preBötC.

Eupnea

Durante condiciones de oxigenación “normal” se genera la eupnea, también denominada respiración normal (Lieske et al., 2000). *In vivo*, este ritmo respiratorio se caracteriza por la activación paulatina de los músculos respiratorios (Ezure, 1990; Bianchi et al., 1995; Peña y Aguilera, 2007). En condiciones *in vitro* se caracteriza por ráfagas con forma de campana (Lieske et al., 2000), **Figura 4**. La generación de este tipo de patrón respiratorio se lleva a cabo gracias a la interacción sináptica, tanto excitadora como inhibitoria, de neuronas pre-inspiratorias, inspiratorias y espiratorias (Greer et al., 1991; Shao y Feldman, 1997; Lieske et al., 2000; Ren y Greer, 2006). Dentro de las neuronas inspiratorias existen neuronas marcapasos, que generan

intrínsecamente ráfagas de potenciales de acción y que juegan un papel esencial en la generación de la eupnea (Thoby-Brisson y Ramirez, 2001; Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2005), dado que el bloqueo de la generación de ráfagas de potenciales de acción de las neuronas marcapasos abole el ritmo respiratorio tanto *in vitro* (Peña et al., 2004), como *in vivo* (Peña y Aguilera, 2007). A la fecha se han descrito 2 tipos de neuronas marcapasos que poseen propiedades intrínsecas distintas (Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2005), lo que se reflejan en su sensibilidad diferencial a distintos bloqueadores de canales iónicos, incluido el cadmio (bloqueador inespecífico de canales de Ca^{2+}) (Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2005). Así, tenemos neuronas sensibles al cadmio, que requieren de una corriente catiónica no selectiva activada por Ca^{2+} (I_{CAN}) para la generación de sus ráfagas de potenciales de acción (Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2005). La I_{CAN} puede ser bloqueada con la aplicación del ácido flufenámico (Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2005). También existen neuronas marcapaso cuya generación de ráfagas de potenciales de acción es insensible al cadmio, pero que depende de una corriente persistente de sodio (I_{NaP}) (Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2002a; 2005). La I_{NaP} puede ser bloqueada por la aplicación de riluzol (Thoby-Brisson y Ramirez, 2001; Peña et al., 2004). Los subtipos de neuronas marcapaso presentan una respuesta diferente a la hipoxia (Peña et al., 2004). Mientras que las neuronas sensibles al cadmio pierden su habilidad intrínseca de generar ráfagas de potenciales de acción en la hipoxia (Peña et al., 2004), las neuronas marcapaso que no son sensibles al cadmio mantienen la generación de ráfagas de potenciales de acción en la hipoxia (Peña et al., 2004). Por otra parte, ambos tipos de neuronas marcapasos pueden ser moduladas por

descargas sinápticas inhibitorias (Ramirez et al., 1997), que lentifica o bloquea su disparo en ráfagas y, de esta forma, modula la generación de la eupnea (Tryba et al., 2003).

Suspiros

Otro de los ritmos generados durante la normoxia son los suspiros (Lieske et al., 2000). Los suspiros son inspiraciones bifásicas prolongadas, caracterizadas por tener un volumen corriente (el aire que circula entre una respiración y espiración) tres veces mayor al promedio del volumen corriente de un individuo (Bendixen et al., 1964; Cherniack et al., 1981). En preparaciones *in vitro*, Lieske et al., (2000) describieron la existencia de los suspiros, un ritmo bifásico que inicialmente es idéntico a la eupnea, pero que continua con una fase de mayor amplitud, en comparación con la eupnea, seguida de una apnea denominada “apnea post suspiro” (Feldman y Gray, 2000; Lieske et al., 2000; Peña, 2008, **Figura 4**). Si bien el ritmo tipo suspiro se genera espontáneamente en preparaciones *in vitro* (Lieske et al., 2000), la generación de los mismos puede ser bloqueada al extirpar los quimiorreceptores periféricos (Bartlett, 1971), indicando que los suspiros podrían contribuir a la regulación de la respiración por el sistema nervioso autónomo (Hall y Guyton, 2011), así como constituir un mecanismo para reiniciar la función respiratoria (Vlemincx et al., 2009), para prevenir la atelectasia (disminución del volumen pulmonar), la rigidez pulmonar (Reynolds, 1962; Bendixen et al., 1964; Vlemincx et al., 2009) y para restablecer el balance gaseoso en los pulmones (Cherniack et al., 1981).

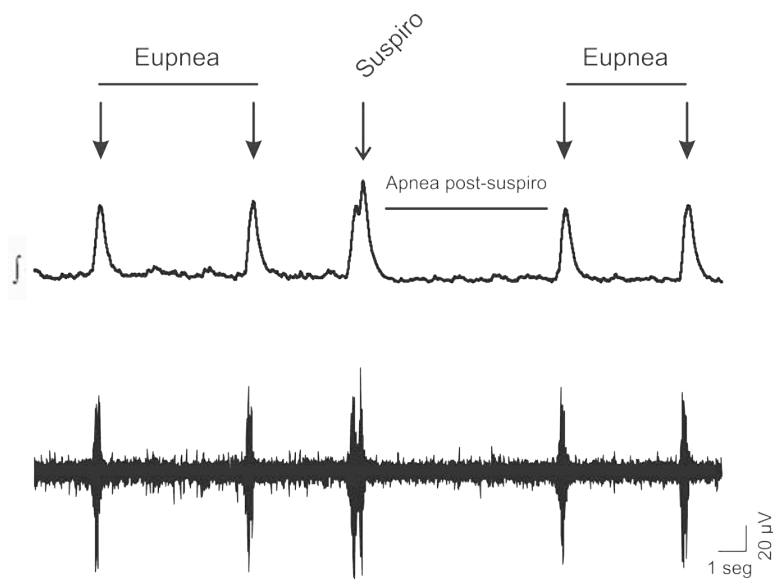


Figura 4.- Patrones de actividad respiratoria del preBötC durante la normoxia. Trazos electrofisiológicos *in vitro* de un registro de campo del preBötC en una rebanada de tallo cerebral obtenida de un ratón neonato. El trazo superior representa la actividad poblacional rectificadora e integrada, por lo que no se muestran sus unidades, mientras que el trazo inferior muestra la actividad poblacional cruda. En ambos registros se puede observar la eupnea, los suspiros y la apnea post-suspiro. Modificado de (Lieske et al., 2000). No se muestran las unidades de la señal integrada (\int), debido a que es producto de la rectificación e integración de un registro de voltaje en el tiempo.

Boqueos

Como se mencionó anteriormente, el preBötC es capaz de generar distintos ritmos respiratorios dependiendo de la disponibilidad de oxígeno (Lieske et al., 2000). Cuando este circuito es sometido a hipoxia, se produce una respuesta que presenta un comportamiento bifásico (Bureau et al., 1984; Haddad y Mellins, 1984; Richter et al., 1991; Lieske et al., 2000; Maxova y Vizek, 2001; Rivera-Angulo y Peña-Ortega, 2014). La primera fase de la respuesta respiratoria a la hipoxia es de aceleración, que se caracteriza por un incremento en la frecuencia de la eupnea y de los suspiros, para después entrar en una fase de depresión donde el ritmo respiratorio desaparece de manera inicial, para dar paso a la generación de un nuevo ritmo respiratorio llamado “boqueo” (Lieske et al., 2000). Los boqueos se caracterizan por ser un

ritmo caracterizado por ráfagas con un inicio súbito, así como con duración y frecuencia menores a las ráfagas tipo eupnea (Lieske et al., 2000; Peña y Aguilera, 2007), **Figura 5**. Si la hipoxia es persistente, los boqueos desaparecen y deviene la “apnea hipóxica”, que es mortal (Fewell et al., 2000; Gozal et al., 2002).

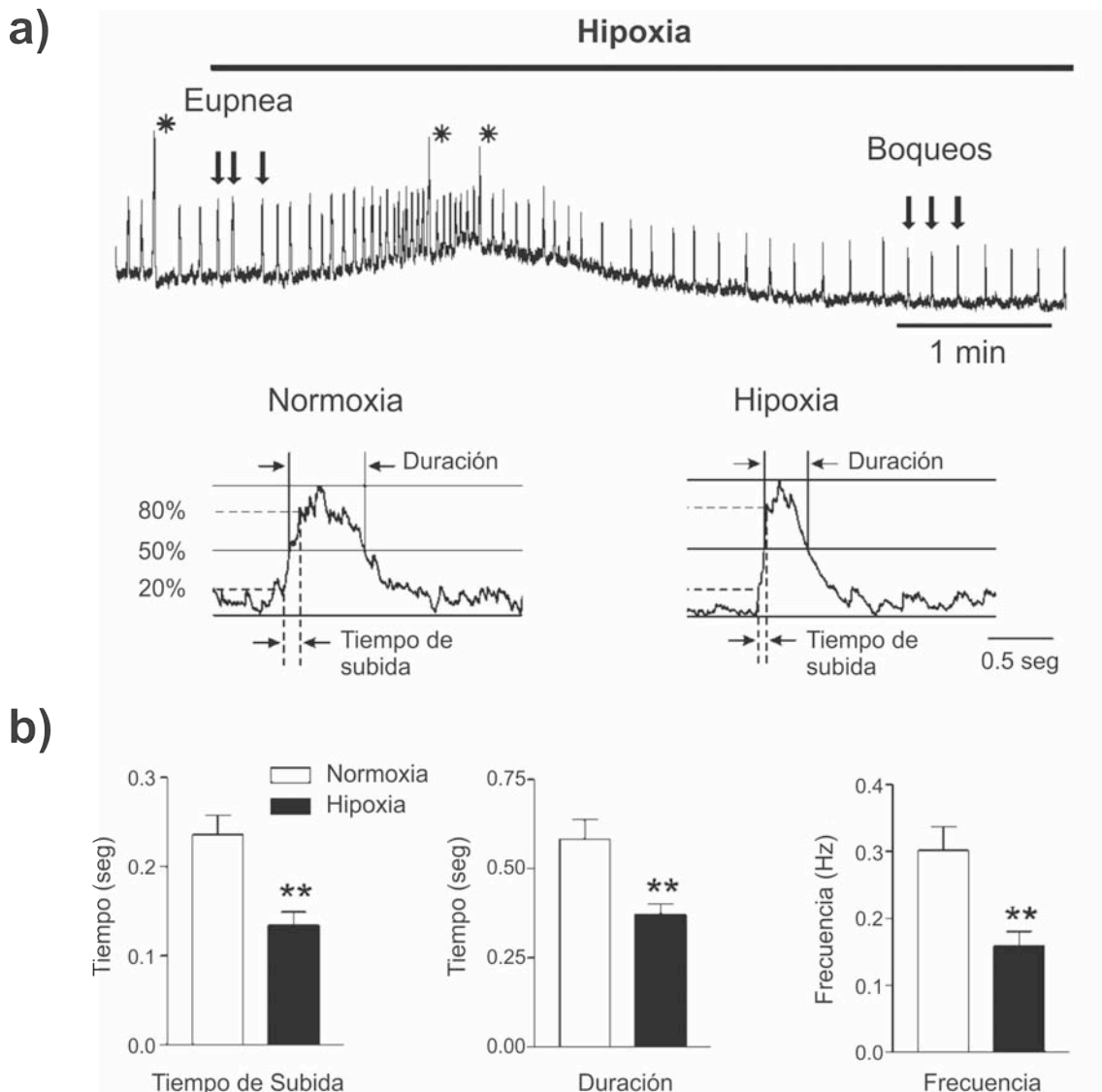


Figura 5.- Respuesta a la hipoxia del preBötC y los cambios en el patrón de actividad respiratoria en estas condiciones. **a)** Actividad poblacional (integrada) del preBötC durante periodos de normoxia e hipoxia de registros electrofisiológicos *in vitro* de ratones de 0-2 semanas de edad. Los asteriscos representan suspiros. **b)** Comparación de los diferentes tipos de patrones de actividad que se producen en el preBötC: eupnea, suspiros y boqueos. Note

que los boqueos son de menor duración y menor frecuencia que la eupnea. Modificado de (Lieske et al., 2000). No se muestran las unidades de la señal, debido a que es producto de la rectificación e integración de un registro de voltaje en el tiempo.

Como se mencionó anteriormente, el preBötC está compuesto por neuronas inspiratorias, post-inspiratorias y espiratorias que interactúan para generar los diferentes ritmos respiratorios (Richter et al., 1991; Lieske et al., 2000; Peña y Ramirez, 2004; Richter y Smith, 2014). Estas neuronas responden de manera heterogénea a la hipoxia. Por ejemplo, las neuronas espiratorias pierden su ritmicidad, mientras que algunas de las neuronas inspiratorias continúan activas y las post-inspiratorias disparan en fase con la inspiración (Lieske et al., 2000; Lieske et al., 2001; Ramirez y Lieske, 2003),

Figura 6.

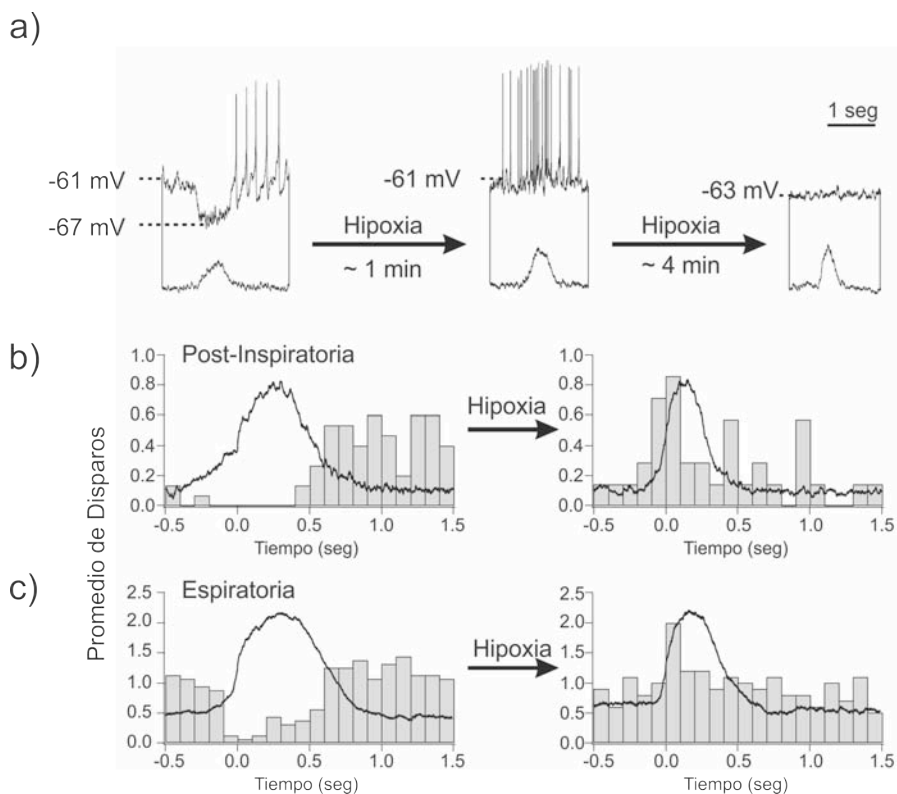


Figura 6.-. Cambios en los patrones de disparo de las neuronas no-inspiratorias durante la generación de los boqueos. Los registros electrofisiológicos, *in vitro*, se realizaron en animales de 0-2 semanas de edad. **a)** Registro intracelular de una neurona post-inspiratoria durante la hipoxia, nótese que durante la hipoxia la neurona transforma su disparo de un patrón post-inspiratorio a uno inspiratorio. **b)** Histograma del promedio de disparo de una neurona post-inspiratoria durante la normoxia y la hipoxia. **c)** Histograma del promedio de disparo de una neurona espiratoria durante la normoxia y la hipoxia, la neurona espiratoria pierde su inhibición fásica y se vuelve quiescente durante la hipoxia. Modificado de (Lieske et al., 2000). No se muestran las unidades de la señal, debido a que es producto de la rectificación e integración de un registro de voltaje en el tiempo.

Es importante mencionar que existe un grupo de neuronas marcapasos resistentes a la hipoxia. Las neuronas marcapaso se pueden clasificar en sensibles a cadmio y dependientes de la I_{CAN} (Sen-Cd,) e insensibles a cadmio y dependientes de la I_{NaP} (In-Cd) (Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2005). Las neuronas marcapasos In-Cd mantienen la generación de ráfagas de potenciales de acción en condiciones de hipoxia (Thoby-Brisson y Ramirez, 2000; Peña et al., 2004; Tryba et al., 2006). Interesentemente, al bloquear la actividad de estas neuronas marcapasos, con el bloqueador específico de la I_{NaP} riluzol, la generación de los boqueos desaparece tanto *in vivo* (Peña y Aguilera, 2007), como *in situ* (Paton et al., 2006) e *in vitro* (Peña et al., 2004), lo que sugiere que estas neuronas son fundamentales para la generación del ritmo respiratorio en condiciones de hipoxia, **Figura 7.**

Normoxia: Eupnea

Hipoxia: Boqueos

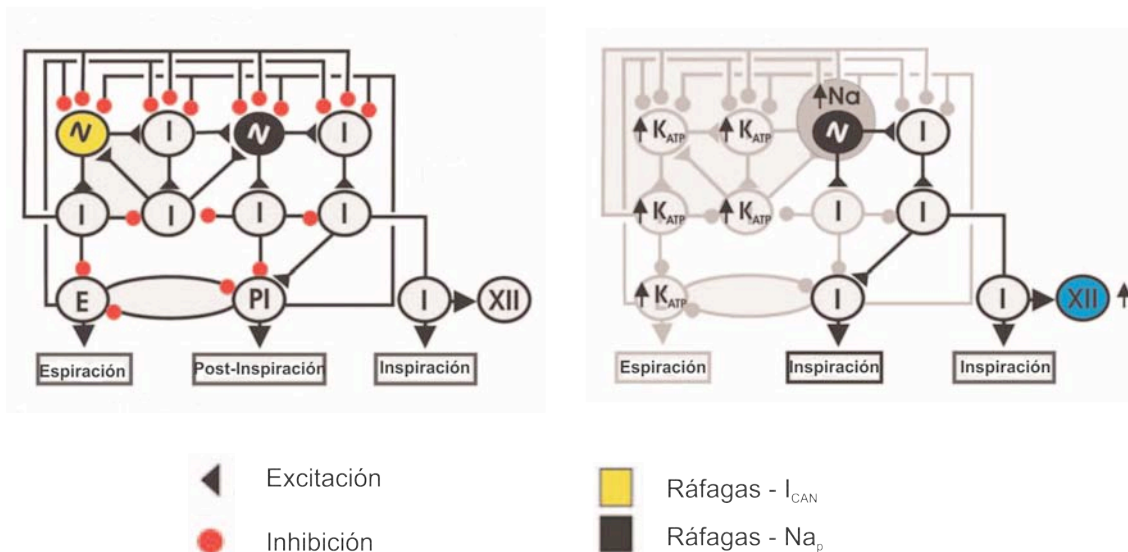


Figura 7.- Modelos de las conformaciones de la red respiratoria durante la normoxia y la hipoxia. La red respiratoria contiene un grupo de neuronas inspiratorias con propiedades marcapasos heterogéneas (I en los círculos negros) que están conectados a través de conexiones excitadoras. Las neuronas marcapasos están moduladas por la entrada inhibitoria de neuronas inspiratorias (I), post-inspiratorias (PI) y espiratorias (E). La entrada inhibitoria de las neuronas I tanto a las E como a la PI es fundamental para generar las diferentes fases de la respiración. Durante la hipoxia una gran porción de neuronas respiratorias son inhibidas (gris claro) y la transmisión inhibitoria desaparece. Durante este periodo, el ritmo respiratorio podría ser comandado por neuronas marcapasos resistentes a la hipoxia. Modificado de (Peña y Ramirez, 2005).

En cuanto al efecto de la hipoxia sobre las propiedades intrínsecas de las neuronas respiratorias, se ha observado que algunas neuronas inspiratorias y espiratorias responden a la hipoxia con una despolarización inicial seguida de una hiperpolarización (Ballanyi et al., 1994; Ballanyi et al., 1999; Thoby-Brisson y Ramirez, 2000), mientras que otras neuronas respiratorias no cambian su potencial de membrana en la hipoxia (Ballanyi et al., 1999; Lieske et al., 2000; Thoby-Brisson y Ramirez, 2000). Estos efectos son una consecuencia del

efecto de la hipoxia sobre algunos canales iónicos (Mironov et al., 1998; Mironov y Richter, 1998, 1999; Mironov et al., 2000; Mironov y Richter, 2000b). Por ejemplo, durante la hipoxia hay un aumento de las corrientes de los canales tipo L de Ca^{2+} (Mironov y Richter, 1998), una activación de los canales de potasio activados por ATP ($\text{I}_{\text{K}_{\text{ATP}}}$) (Mironov et al., 1998; Mironov y Richter, 2000a) así como la inhibición de las corrientes activadas por hiperpolarización (I_h) (Mironov et al., 2000) y las corrientes de Na^+ (Mironov y Richter, 1999). Como se mencionó, efectos de la hipoxia que producen una despolarización seguida de una hiperpolarización en algunas neuronas respiratorias (Ballanyi et al., 1994; Ballanyi et al., 1999; Thoby-Brisson y Ramirez, 2000).

En cuanto a la transmisión sináptica, la transmisión inhibitoria es suprimida durante la hipoxia, lo que ocasiona que las neuronas espiratorias dejen de tener una actividad rítmica y comiencen a disparar tónicamente (**Figura 6c**) (Lieske et al., 2000; Thoby-Brisson y Ramirez, 2000) y las neuronas post-inspiratorias disparen en fase con la inspiración (Lieske et al., 2000). Con respecto a la transmisión excitadora, se ha visto que en algunas neuronas inspiratorias hay una reducción en la excitación durante la hipoxia, mientras que en otras no hay ningún efecto aparente (Ballanyi et al., 1994; Ramirez et al., 1998a; Ballanyi et al., 1999; Lieske et al., 2000). Este efecto heterogéneo de la hipoxia sobre la transmisión excitadora, hace suponer que existe un componente de transmisión excitadora que es resistente a la hipoxia y que podría participar en la generación de los boqueos.

Es importante mencionar, que Lieske et al., (2000) demostraron que todos los ritmos antes mencionados son generados por el mismo circuito (el

preBötC) y, a partir de entonces, se ha propuesto que los cambios en el patrón respiratorio se debe a modificaciones en las propiedades intrínsecas y sinápticas dentro del preBötC que dan por resultado la generación de diferentes ritmos en respuesta a diferentes condiciones fisiológicas o patológicas (por ejemplo, la hipoxia) (Lieske et al., 2000; Nusbaum et al., 2001; Peña y Ramirez, 2005; Peña-Ortega, 2012; Aoi et al., 2013; Dupret et al., 2013).

Modelos de la Generación de los Ritmos Respiratorios

A la fecha, se han generado varios modelos con el objetivo de explicar cómo es que el preBötC es capaz de generar el ritmo respiratorio (Butera et al., 1999a; Butera et al., 1999b; Feldman et al., 1991; Funk y Feldman, 1995; Koshiya y Smith, 1999; Richter et al., 1992; Ramirez y Richter, 1996; Rybak et al., 2014; Smith et al., 2000). Estos modelos se han producido paralelamente a estudios experimentales que apoyan ciertos aspectos de los mismos (Butera et al., 1999a; Del Negro et al., 2002a; Koizumi y Smith, 2008; Rybak et al., 2003), pero que no apoyan otros (Del Negro et al., 2002b, 2005). Por lo anterior, se ha originado una diversidad de modelos que se describen a continuación:

Modelo de la red respiratoria condicional

Este fue uno de los primeros modelos de generación de la respiración (Connelly et al., 1992; Richter et al., 1992; Ramirez y Richter, 1996), que propuso, como prácticamente lo hacen todos los modelos, que el patrón rítmico

surge de una interacción entre las propiedades sinápticas e intrínsecas de las neuronas respiratorias (Connelly et al., 1992; Richter et al., 1992; Ramirez y Richter, 1996). En particular, este modelo propuso que las conductancias de las neuronas respiratorias están bajo el control de las propiedades sinápticas, las cuales determinan una ventana temporal de activación neuronal (Richter y Spyer, 2001). Lo anterior ocasiona que las neuronas respiratorias solo estén activas durante la inspiración y/o la post-inspiración dependiendo del grado de modulación sináptica que reciban (Botros y Bruce, 1990; Ogilvie et al., 1992). Este modelo propone que la transición entre las diferentes fases respiratorias está gobernada exclusivamente por cambios en la modulación sináptica (Richter et al., 1992; Ramirez y Richter, 1996). Este modelo incorpora un papel obligatorio de la inhibición sináptica como esencial para generar las transiciones entre las diferentes fases del ritmo (por ejemplo, para terminar la inspiración) (Bradley et al., 1975; Del Negro et al., 2010). En este modelo, cuando la transmisión sináptica inhibitoria es bloqueada el ritmo respiratorio desaparece (Rybak et al., 1997b). Sin embargo, esto no ocurre en preparaciones *in vitro* y *en bloc* (Feldman y Smith, 1989; Ramirez et al., 1996; Shao y Feldman, 1997).

Modelo basado en neuronas marcapaso

Este modelo surgió de la identificación de ciertas neuronas dentro del preBötC que son capaces de generar intrínsecamente ráfagas de potenciales de acción, aun cuando la transmisión sináptica es inhibida (Funk y Feldman, 1995; Peña et al., 2004). A partir de ello, y acorde a modelos en circuitos de invertebrados (Hooper y Marder, 1987; Marder y Calabrese, 1996; Marder et al., 2005), se

propuso que estas neuronas “marcapaso” podrían ser las encargadas de generar el ritmo respiratorio (Feldman et al., 1991; Funk y Feldman, 1995; Butera et al., 1999a; Koshiya y Smith, 1999; Peña et al., 2004; Feldman y Del Negro, 2006). Como se mencionó anteriormente, existen al menos dos poblaciones de neuronas marcapaso (Thoby-Brisson y Ramirez, 2001; Peña et al., 2004). Unas que dependen de I_{NaP} y otras de I_{CAN} (Thoby-Brisson y Ramirez, 2001; Peña et al., 2004). Al bloquear la actividad de ambos grupos de neuronas marcapasos el ritmo respiratorio es abolido tanto *in vitro* (Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2005) como *in vivo* (Peña y Aguilera, 2007). El punto más criticado de esta teoría es que la mayoría de las neuronas del preBötC expresan tanto la I_{NaP} como la I_{CAN} (Del Negro et al., 2002b; Rybak et al., 2003; Del Negro et al., 2005), por lo que el bloqueo de la generación del ritmo respiratorio producido por los bloqueadores de la I_{NaP} y la I_{CAN} (Peña et al., 2004; Aguilera y Peña, 2007), podría deberse a una disminución de la excitabilidad de todo el circuito y no exclusivamente de las neuronas marcapaso (Del Negro et al., 2002b; Rybak et al., 2003; Del Negro et al., 2005). Es importante mencionar que las críticas a este modelo presuponen que las neuronas del preBötC son homogéneas en cuanto a la expresión de las corrientes I_{NaP} y I_{CAN} , lo cual es poco probable dado que las neuronas presentan una expresión variable en cantidad y en tipos de canales iónicos que determinan sus patrones de disparo (Hille, 2001). Por otra parte, cuando se modela la expresión de estas corrientes de manera aleatoria dentro del preBötC, da por resultado una población neuronal heterogénea (neuronas con actividad marcapaso dependientes de I_{CAN} , dependientes de I_{NaP} o dependientes de ambas, así como neuronas no marcapaso) (Rybak et al.,

2014), lo cual es consistente con la evidencia experimental (Thoby-Brisson y Ramirez, 2001; Peña et al., 2004).

Modelo híbrido de marcapasos-red respiratoria

Este modelo fue originalmente propuesto por Butera *et al* (Butera et al., 1999a, b) y toma en cuenta tanto las interacciones sinápticas excitadoras como el papel crucial de las neuronas marcapasos para generar la respiración (Butera et al., 1999a, b). Este modelo también propone que las neuronas excitadoras interactúan con las neuronas inhibitoras para generar las diferentes fases del ritmo respiratorio (Butera et al., 1999a, b; Smith et al., 2000; Del Negro et al., 2001). Este modelo está basado en una expresión heterogénea de dos corrientes, la I_{NaP} y la I_{K-Leak} (Johnson et al., 1994; Koizumi y Smith, 2008; Koizumi et al., 2010), lo que genera una población heterogénea de neuronas que van desde neuronas completamente silentes, hasta neuronas con propiedades marcapaso (Butera et al., 1999b). Media década después del modelos de Butera et al (1999), se descubrió que las neuronas marcapasos presentan una corriente catiónica no selectiva dependiente de Ca^{2+} (I_{CAN}) (Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2005), corriente que no fue tomada en cuenta en el modelo inicial (Butera et al., 1999a, b). Sin embargo, una de las ventajas de este modelo es la incorporación de diferentes grupos neuronales (marcapasos, inspiratorias y espiratorias de diversos tipos) que existen tanto en el preBötC como en otras regiones involucradas para la generación del ritmo respiratorio (Smith et al., 2000; Del Negro et al., 2010).

Modelo del “grupo de neuronas marcapaso”

Este modelo considera la generación de los patrones respiratorios como una propiedad emergente (Rekling et al., 1996; Rekling y Feldman, 1998; Feldman y Del Negro, 2006; Rubin et al., 2009b). Una propiedad emergente es aquel proceso o patrón que se origina a través de interacciones entre elementos que por si solos no poseen esta “propiedad” (Hopfield, 1982; Del Negro et al., 2002a; Feldman y Del Negro, 2006; Mironov, 2013). El modelo del “grupo de neuronas marcapasos” propone que la generación del ritmo respiratorio emerge debido a que las corrientes intrínsecas de las neuronas respiratorias se encuentran “silentes” o “latentes” hasta que son evocadas y moduladas sinápticamente a través de retroalimentación negativa y positiva (Rekling et al., 1996; Rekling y Feldman, 1998; Feldman y Del Negro, 2006; Rubin et al., 2009b). La excitación recurrente produce la activación de la I_{NaP} (Del Negro et al., 2002b; Rybak et al., 2003) y de la I_{CAN} (Onimaru et al., 1996; Mironov y Richter, 1998, 2000b; Mironov, 2008, 2013), lo que potencia la excitación y origina el ritmo respiratorio (Feldman y Del Negro, 2006). En resumen, la generación del ritmo respiratorio requiere de la interacción entre las propiedades intrínsecas y sinápticas (excitadoras: glutamato e inhibitoras: glicina y GABA) de las diferentes poblaciones neuronales del preBötC (Ramirez et al., 1997; Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2005; Feldman y Del Negro, 2006; Feldman et al., 2013), como son las neuronas inspiratorias (marcapasos y no marcapasos), post-inspiratorias, espiratorias y no inspiratorias (Richter et al., 1991; Lieske et al., 2000; Peña y Ramirez, 2004; Richter y Smith, 2014). La interacción entre estos grupos de neuronas se da a través de una excitación e

inhibición recíproca (Richter et al., 1991; Lieske et al., 2000; Peña y Ramirez, 2004), en donde la excitación es necesaria para la sincronización mientras que la inhibición juega un papel importante en la generación de las diferentes fases del ritmo respiratorio como son la inspiración, la post-inspiración y la espiración (Richter et al., 1991; Ballanyi et al., 1999; Lieske et al., 2000; Thoby-Brisson y Ramirez, 2001). Es importante mencionar que la transmisión sináptica inhibitoria no es necesaria para la generación del ritmo respiratorio, pero juega un papel fundamental en el control de la actividad de las neuronas marcapasos (Ramirez et al., 2004; Montandon et al., 2011). Recientemente, mediante el registro simultáneo de múltiples neuronas se ha observado que la actividad de las neuronas respiratorias puede variar de una inspiración a otra, llevando a proponer que las neuronas marcapasos no funcionan como un comando fijo, sino como iniciadoras y estabilizadoras del ritmo respiratorio (Carroll y Ramirez, 2013; Carroll et al., 2013). Por lo anterior, se propone que cada inspiración emerge de una colaboración estocástica de las diferentes neuronas respiratorias (marcapasos y no marcapasos) (Carroll y Ramirez, 2013; Carroll et al., 2013).

Como se mencionó anteriormente, existen al menos dos corrientes iónicas que son fundamentales para la actividad de las neuronas marcapasos, la I_{CAN} y la I_{NaP} (Butera et al., 1999b, a; Thoby-Brisson y Ramirez, 2001; Peña et al., 2004; Del Negro et al., 2005) y que se han incorporado en nuevos modelos de generación del ritmo respiratorio (Rubin et al., 2009b; Dunmyre et al., 2011; Toporikova y Butera, 2011). Sin embargo, estos modelos asumen que todas las neuronas respiratorias presentan ambas corrientes y suponen que las

neuronas del preBötC son homogéneas, lo cual no es del todo cierto (Feldman y Kam, 2015). Como ya se mencionó, Rybak et al., 2014 han propuesto un modelo en donde la expresión de estas corrientes, modelada de manera aleatoria, da por resultado una población heterogénea de neuronas con actividad marcapaso dependientes de la I_{CAN} , de la I_{NaP} o de ambas, lo cual es consistente con la evidencia experimental (Thoby-Brisson y Ramirez, 2001; Peña et al., 2004). En este último modelo, la generación de la actividad rítmica surge a partir de la I_{NaP} por si sola, o en conjunto la I_{CAN} . La activación de ambas corrientes depende críticamente del nivel de excitabilidad del circuito (excitación tónica proveniente de otros circuitos respiratorios), del número de neuronas que participan y de la magnitud o fuerza de las interacciones excitadoras entre las neuronas respiratorias (Rybak et al., 2014).

A pesar de que la diversidad de modelos de generación de la respiración han aportado invaluable información, la mayoría de los estudios se basan en registros electrofisiológicos de neuronas individuales (por ejemplo, 1 neurona inspiratoria de alrededor de 1000-3000 por rebanada (Feldman y Kam, 2015). Este enfoque limita la habilidad para determinar el alcance total de la funcionalidad, superposición y magnitud de las interacciones de las neuronas o elementos respiratorios dentro del circuito. Por ello, consideramos que los modelos de la generación del ritmo respiratorio se verán enriquecidos con la integración de estudios en donde se hayan registrado simultáneamente diversos tipos de neuronas respiratorias, como es el caso de los registros con multi-electrodos (Lindsey et al., 2000; Segers et al., 2008; Galán et al., 2010; Morris et al., 2010; Ott et al., 2011; Segers et al., 2012; Carroll y Ramirez, 2013;

Carroll et al., 2013; Nieto-Posadas et al., 2014) o con imagenología (Hartelt et al., 2008; Mironov, 2009; Rubin et al., 2009a; Mellen y Mishra, 2010; Okada et al., 2012; Gourevitch y Mellen, 2014). A la fecha, la mayoría de este tipo de estudios se enfocan en registros de múltiples de neuronas de varios núcleos respiratorios de la CRV (Vachon y Duffin, 1978; Segers et al., 1987; Lindsey et al., 1992; England et al., 1995; Morris et al., 1996; Lindsey et al., 1998; Tian y Duffin, 1998; Lindsey et al., 2000; Shan y Cheng, 2000; Shannon et al., 2000; Shen et al., 2002; Li et al., 2003; Duffin, 2004; Segers et al., 2008; Morris et al., 2010; Ott et al., 2011; Ott et al., 2012; Segers et al., 2012; Segers et al., 2015) sin enfocarse específicamente a un núcleo en específico.

Registro simultáneo de múltiples neuronas respiratorias

Una de las aproximaciones experimentales que ha dado más información con respecto al funcionamiento de los circuitos neuronales son las técnicas de imagen de calcio intracelular, las cuales se basan en detectar los incrementos en la concentración de Ca^{2+} (concentración que se incrementa hasta 100 veces durante la actividad neuronal) (Grienberger y Konnerth, 2012). Con respecto a los estudios de imágenes de calcio en el preBötC (Hartelt et al., 2008; Mironov, 2009; Rubin et al., 2009a; Mellen y Mishra, 2010; Okada et al., 2012; Gourevitch y Mellen, 2014), el grupo de Mironov (Hartelt et al., 2008; Mironov, 2009) ha aportado información crucial sobre la topología del preBötC. Este grupo ha establecido que la mayoría de las neuronas respiratorias ($\approx 90\%$) forman grupos ("clusters") de 7 neuronas con alrededor de 7 conexiones cada una, mientras que el 10% restante de las neuronas del este circuito se

mantienen aisladas y con alrededor de 2 conexiones cada una (Hartelt et al., 2008; Mironov, 2009). En concordancia con estas observaciones, se ha observado que el preBötC representa el grupo mas homogéneo y compacto dentro de la columna respiratoria ventral, mostrando alto grado de actividad correlacionada dentro del mismo preBötC como con otros núcleos respiratorios (Gourevitch y Mellen, 2014), lo que sugiere que el preBötC podría funcionar como un módulo que integra la actividad de los diferentes núcleos respiratorios para generar la actividad inspiratoria (Gourevitch y Mellen, 2014). Una desventaja de la utilización de las imágenes de calcio en los estudios de la dinámica de circuitos neuronales es que esta técnica no permite ver si existen cambios en la magnitud o fuerza de las interacciones (solamente se puede establecer si hay o no interacciones funcionales entre los elementos respiratorios). Por ejemplo, sabemos que durante la hipoxia se pierde la comunicación entre muchos elementos (neuronas) respiratorios, pero no sabemos que es lo que ocurre con las conexiones que resisten durante la hipoxia. Este tipo de preguntas se pueden abordar realizando registros extracelulares de múltiples neuronas (Lindsey et al., 2000; Segers et al., 2008; Galán et al., 2010; Morris et al., 2010; Ott et al., 2011; Buzsaki et al., 2012; Segers et al., 2012; Carroll y Ramirez, 2013; Carroll et al., 2013; Nieto-Posadas et al., 2014).

Diversos grupos de investigación han llevado a cabo registros con multielectrodos en la columna respiratoria ventral (Vachon y Duffin, 1978; Segers et al., 1987; Lindsey et al., 1992; England et al., 1995; Morris et al., 1996; Lindsey et al., 1998; Tian y Duffin, 1998; Lindsey et al., 2000; Shan y

Cheng, 2000; Shannon et al., 2000; Shen et al., 2002; Li et al., 2003; Duffin, 2004; Segers et al., 2008; Morris et al., 2010; Ott et al., 2011; Ott et al., 2012; Segers et al., 2012; Segers et al., 2015). Sin embargo, estos estudios se han enfocado al registro de diferentes núcleos respiratorios simultáneamente y han dejado de lado la circuitería específica de cada núcleo respiratorio. Con respecto al preBötC, mediante el uso de multi-electrodos y el análisis de los patrones de disparo de sus neuronas, se ha observado que la actividad de las neuronas inspiratorias con respecto a la actividad poblacional no es fija y cambia de una ráfaga poblacional a otra (Carroll et al., 2013; Carroll y Ramirez, 2013). Lo anterior sugiere que las ráfagas respiratorias no se producen por una activación fija, ordenada y secuencial de neuronas respiratorias, sino por el reclutamiento aleatorio de estas neuronas (Carroll et al., 2013; Carroll y Ramirez, 2013). Lo anterior podría sugerir que las neuronas marcapasos, que se proponían como iniciadoras de la inspiración, podrían tener un papel más dinámico en la generación del ritmo respiratorio (Carroll y Ramirez, 2013). Por otra parte, con el uso de registros con multielectrodos se ha determinado que la actividad del preBötC es sumamente maleable (Galán et al., 2010). Por ejemplo, después de la hipoxia se producen cambios heterogéneos en la sincronización de las neuronas de este circuito (Galán et al., 2010).

Pocos estudios, con un enfoque de circuito (mediante el uso de multielectrodos e imágenes de calcio), se han realizado sobre la reconfiguración del preBötC durante la hipoxia. A este respecto, se ha visto que después de la hipoxia, la mayoría de las neuronas respiratorias presentan una disminución en su sincronización, aunque en algunas neuronas esta

sincronización aumenta (Galán et al., 2010). Lo anterior sugiere que la hipoxia produce cambios heterogéneos en la conectividad del circuito respiratorio que son de larga duración (Galán et al., 2010). Sin embargo, se desconoce si los cambios en la sincronización de las neuronas respiratorias observados después de la hipoxia son iguales a los que ocurren durante la misma y, más aún, no se ha determinado si existen cambios en la magnitud o en el número de las interacciones entre las neuronas respiratorias en ambas condiciones experimentales.

Cambios en la transmisión sináptica durante la hipoxia: Papel de la adenosina

La hipoxia produce una depresión robusta y reproducible de la transmisión sináptica tanto excitadora (Rosen y Morris, 1993; Hammond et al., 1994; Coelho et al., 2000; Frenguelli et al., 2003; Pearson y Frenguelli, 2004; Dias et al., 2013) como inhibitoria (Rosen y Morris, 1993; Hammond et al., 1994; Centonze et al., 2001). Esta disminución de la transmisión sináptica producida por la hipoxia se ha observado tanto *in vivo* (Xu y Pulsinelli, 1996; Gervitz et al., 2001; Fowler et al., 2003; Gervitz et al., 2003) como *in vitro* (Lipton y Whittingham, 1979; Luhmann y Heinemann, 1992; Jha y Deshpande, 2003; Deshpande y Jha, 2004). La disminución de la transmisión sináptica producida por la hipoxia tiene como resultado una disminución en el número total de neuronas co-activas y, por lo tanto, afecta la dinámica de los circuitos neuronales (Peña y Ramirez, 2005; Mahamed et al., 2011; Strey et al., 2012; Wassink et al., 2013).

Los mecanismos celulares involucrados en la depresión de la transmisión sináptica causada por la hipoxia se pueden agrupar en tres tipos: a) inhibición de las corrientes pre-sinápticas de Ca^{2+} (Krnjevic y Leblond, 1989; Young y Somjen, 1992); b) alteraciones en la maquinaria vesicular (Katchman y Hershkowitz, 1993b; Kulik et al., 2000); y c) modulación de los receptores pre-sinápticos que controlan la neurotransmisión (Gribkoff et al., 1990; Katchman y Hershkowitz, 1993a; Canhao et al., 1994; Zhu y Krnjevic, 1997; Dale et al., 2000; Gervitz et al., 2001; Frenguelli et al., 2003; Gervitz et al., 2003). De estos tres mecanismos, el más comúnmente asociado a la depresión de la transmisión sináptica durante la hipoxia en diferentes circuitos del SNC es el incremento en los niveles de adenosina (Coelho et al., 2000; Centonze et al., 2001) y la subsecuente activación de sus receptores, localizados pre- y post-sinápticamente (Zetterstrom et al., 1982; Latini et al., 1998; Coelho et al., 2000; Dale et al., 2000; Centonze et al., 2001; Kyung Park et al., 2002; Frenguelli et al., 2003; Pearson et al., 2003; Dias et al., 2013; Chen, 2014; Chen et al., 2014).

La adenosina funciona como un neuromodulador al regular la excitabilidad neuronal mediante el control de la liberación de neurotransmisores (Gribkoff et al., 1990; Katchman y Hershkowitz, 1993a; Canhao et al., 1994; Zhu y Krnjevic, 1997; Dale et al., 2000; Gervitz et al., 2001; Frenguelli et al., 2003; Gervitz et al., 2003), la generación de los potenciales de acción (Chen, 2014; Chen et al., 2014; Pan et al., 1994; Visentin et al., 1990) y la modulación de la plasticidad sináptica (Diogenes et al., 2004; Chung et al., 2009; Gomes et

al., 2011; Sasaki et al., 2011; Dias et al., 2013). Los efectos de la adenosina son mediados por receptores acoplados a proteínas G (Fredholm et al., 2001), del que a la fecha se han identificado cuatro subtipos: A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 (Fredholm et al., 2001). Esta clasificación se basa en el tipo de proteína G a la que está acoplado cada subtipo de receptor y, por lo tanto, su efecto sobre la actividad de la adenilato ciclasa (Fredholm et al., 2001). Así, tenemos tanto receptores de adenosina acoplados a proteína $G\alpha_i$ que inhiben a la adenilato cilcasa (van Calker et al., 1979) y receptores de adenosina acoplados a proteína $G\alpha_s$ que activan a la adenilato cilcasa (van Calker et al., 1979). Los receptores A_1 y A_3 están acoplados a proteínas $G\alpha_i$ y $G\alpha_s$ respectivamente (Fredholm et al., 2001). Mientras que los A_2 están acoplados a $G\alpha_{olf}$ y $G\alpha_s$ (Gubitz et al., 1996; Kull et al., 2000). La activación del receptor A_1 también induce cambios adicionales como el aumento en los niveles de diacilglicerol y de inositol trifosfato a través de la activación de la fosfolipasa C (Fredholm et al., 2001; Shim et al., 2002), la activación de canales de potasio acoplados a proteínas G (GIRK, por sus siglas en inglés) (Kirsch et al., 1990; Heurteaux et al., 1995) y la activación canales de potasio acoplados a ATP (K_{ATP}) (Fredholm et al., 2001) (**Figura 8**): La activación de estos canales iónicos produce una hiperpolarización y la disminución de la excitabilidad neuronal (**Figura 8**) (Fredholm et al., 2001). Por su parte, la activación de los receptores A_{2A} aumenta los niveles de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc; por sus siglas en inglés), mientras que la activación de los receptores A_{2B} y A_3 aumenta los niveles de AMPc y de inositol trifosfato (Fredholm et al., 2001; Jacobson y Gao, 2006). El papel funcional de los receptores a la adenosina no solo depende de las cascadas de segundos mensajeros que producen sino también de su

distribución y expresión en el SNC (Fredholm et al., 2001). El receptor A_1 se expresa en altos niveles en el hipocampo, la corteza cerebral, la médula espinal y el cerebelo (Ribeiro et al., 2002). El receptor A_{2A} se expresa en altos niveles en el bulbo olfatorio y el estriado, especialmente en las neuronas GABAérgicas estriatopalidales (Fredholm et al., 2001). El receptor A_{2B} se expresa escasamente en el cerebro (Dixon et al., 1996) y el receptor A_3 se expresa principalmente en el cerebelo y el hipocampo (Fredholm et al., 2001).

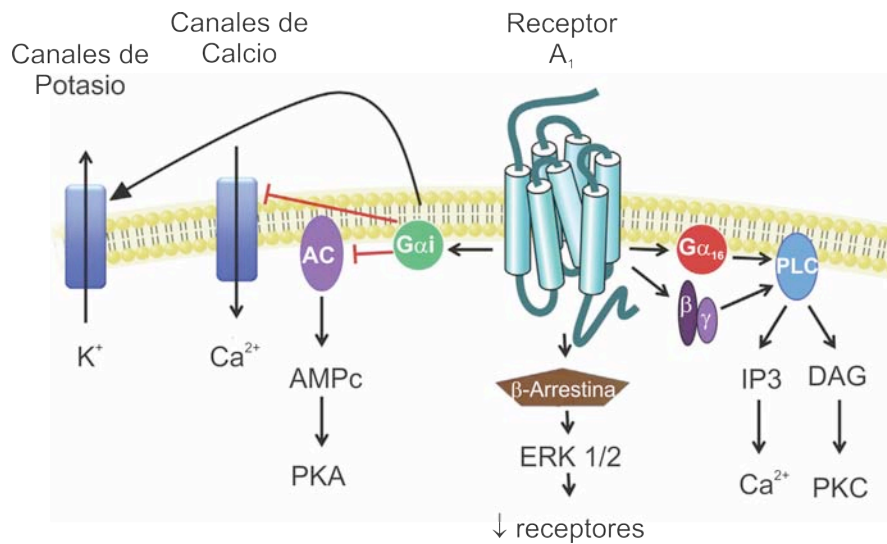


Figura 8.- Vías principales de señalización del receptor de adenosina tipo A_1 . Se ejemplifica la activación tanto de proteínas $G\alpha_i$ como $G\alpha_{16}$, así como la activación de canales de K^+ y la inhibición de canales de Ca^{2+} . También se ejemplifica la activación de la β -arrestina y la activación de las vías de señalización acopladas a la fosfolipasa C (PLC). AC: adenilato ciclasa; AMPc: monofosfato cíclico de adenosina; PKA: proteína quinasa A; ERK: cinasas reguladas por señales extracelulares; IP3: inositol trifosfato; DAG: diacilglicerol; PKC: proteína quinasa C. Modificado de (Chen et al., 2014).

Los efectos de la adenosina sobre la excitabilidad neuronal se deben principalmente a la activación de los receptores A_1 y A_{2A} (Sebastiao y Ribeiro, 1996; Chen, 2014), los cuales se expresan pre-sinápticamente (Fredholm et al.,

2001) y controlan la liberación de diversos neurotransmisores como el glutamato, el GABA, la dopamina y la acetilcolina (Sebastiao y Ribeiro, 1996; Peña y Ramirez, 2005; Chen, 2014). El efecto principal de la activación del receptor A₁ es el de deprimir la transmisión sináptica (Dunwiddie y Masino, 2001; Peña y Ramirez, 2005; Sebastiao y Ribeiro, 2009). La activación pre-sináptica de estos receptores bloquea la transmisión sináptica mediante la inhibición de los canales de calcio tipo N (Wu y Saggau, 1994; Gundlfinger et al., 2007) y la interferencia con la maquinaria de liberación vesicular (Fredholm et al., 1989; Hasuo et al., 1992). La activación post-sináptica del receptor A₁ puede regular la excitabilidad neuronal al inhibir a los receptores glutamatérgicos del tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) (de Mendonca et al., 1995) y al activar canales de potasio (Chen et al., 2014). Con respecto al receptor A_{2A} de adenosina post-sináptico, se sabe que su activación produce la inhibición del receptor NMDA y la reducción de la excitabilidad neuronal (Wirkner et al., 2000; Gerevich et al., 2002).

En resumen, la adenosina es capaz de regular la excitabilidad neuronal controlando la liberación de glutamato, de GABA y de acetilcolina (Chen et al., 2014). Por ello, en condiciones en las que los niveles de adenosina incrementan, como en la hipoxia o en la isquemia, la adenosina produce una reducción en la excitabilidad neuronal (Gribkoff et al., 1990; Katchman y Hershkowitz, 1993a; Canhao et al., 1994; Zhu y Krnjevic, 1997; Dale et al., 2000; Gervitz et al., 2001; Frenguelli et al., 2003; Gervitz et al., 2003) que se traduce en un silenciamiento de la actividad neuronal por la disminución en la generación de potenciales de acción (Chen, 2014; Chen et al., 2014; Pan et al.,

1994; Visentin et al., 1990) y la depresión de la transmisión sináptica (Dunwiddie y Masino, 2001; Peña y Ramirez, 2005; Sebastiao y Ribeiro, 2009). De nueva cuenta, en estas condiciones la adenosina ocasiona cambios en la dinámica de los circuitos neuronales (Peña y Ramirez, 2005; Dias et al., 2013; Chen, 2014; Chen et al., 2014).

El receptor de adenosina tipo A₁ y la respiración

La adenosina modula la generación de la respiración tanto en normoxia (Eldridge et al., 1985; Phillis et al., 1992; Schmidt et al., 1995; Mironov et al., 1999; Barros et al., 2006) como en hipoxia (Kawai et al., 1995; Schmidt et al., 1995; Herlenius y Lagercrantz, 1999; Peña et al., 2004; Vandam et al., 2008; Rivera-Angulo y Peña-Ortega, 2014). Durante la normoxia, la adenosina activa tónicamente a los receptores A₁ y produce una inhibición tónica de la respiración (Eldridge et al., 1985; Phillis et al., 1992; Schmidt et al., 1995; Mironov et al., 1999), la cual sirve como modulador homeostático de la actividad sináptica que evita episodios de sobreexcitación y que aumenta la relación señal-ruido de las ráfagas respiratorias (Mitchell et al., 1993). Con respecto al papel de la adenosina en la respuesta del circuito respiratorio en condiciones de hipoxia, se ha demostrado que este neuromodulador juega un papel crucial en la reconfiguración del circuito respiratorio tanto en experimentos *in vivo* (Runold et al., 1989; Gozal et al., 2002; Walsh y Marshall, 2006; Fewell et al., 2007; Rivera-Angulo y Peña-Ortega, 2014) como *in vitro* (Kawai et al., 1995; Schmidt et al., 1995; Herlenius y Lagercrantz, 1999; Peña et al., 2004; Rivera-Angulo y Peña-Ortega, 2014). Por ejemplo, los niveles de

adenosina en la columna respiratoria aumentan durante la hipoxia (Richter et al., 1999) (**Figura 9**) y los antagonistas de los receptores A₁ pueden modular la respuesta a la hipoxia (Thurston et al., 1978; Lagercrantz et al., 1984; Eldridge et al., 1985; Runold et al., 1989; Bissonnette et al., 1990; Kawai et al., 1995; Schmidt et al., 1995; Herlenius et al., 1997; Herlenius y Lagercrantz, 1999; Fewell et al., 2007). La activación de los receptores A₁ de adenosina durante la hipoxia parece contribuir a la depresión del circuito respiratorio durante la hipoxia (Lagercrantz et al., 1984; Eldridge et al., 1985; Bellingham y Berger, 1994; Herlenius et al., 1997; Herlenius y Lagercrantz, 1999; Vandam et al., 2008). Lo anterior se basa en evidencia de que la preaplicación de antagonistas no selectivos de los receptores de adenosina, como el 8 sulfofenil teofilina (8-SPT) y la amniofilina, prolongan el tiempo para llegar a la apnea (Runold et al., 1989) y disminuyen la depresión de las neuronas respiratorias durante la hipoxia (Kawai et al., 1995). Además, la aplicación de agonistas específicos del receptor A₁ de adenosina, como el (R)-N⁶—(2- fenil isopropil)-adenosina (R-PIA) (Herlenius y Lagercrantz, 1999) y el de N⁶-Ciclopentil adenosina (NCPA) (Vandam et al., 2008), disminuyen la generación de ráfagas respiratorias (tal como ocurre durante la hipoxia), y este efecto puede ser bloqueado con la aplicación de 8-Ciclopentil-1,3.dipropilxantina (DPCPX), un antagonista de los receptores A₁ (Herlenius y Lagercrantz, 1999; Vandam et al., 2008). En base a estos hallazgos, se ha propuesto que la reconfiguración del circuito respiratorio involucra un incremento en los niveles de adenosina, que produce una disminución en la generación de los potenciales de acción y de la transmisión sináptica (Bellingham y Berger, 1994; Mironov et al., 1999; Vandam et al., 2008).

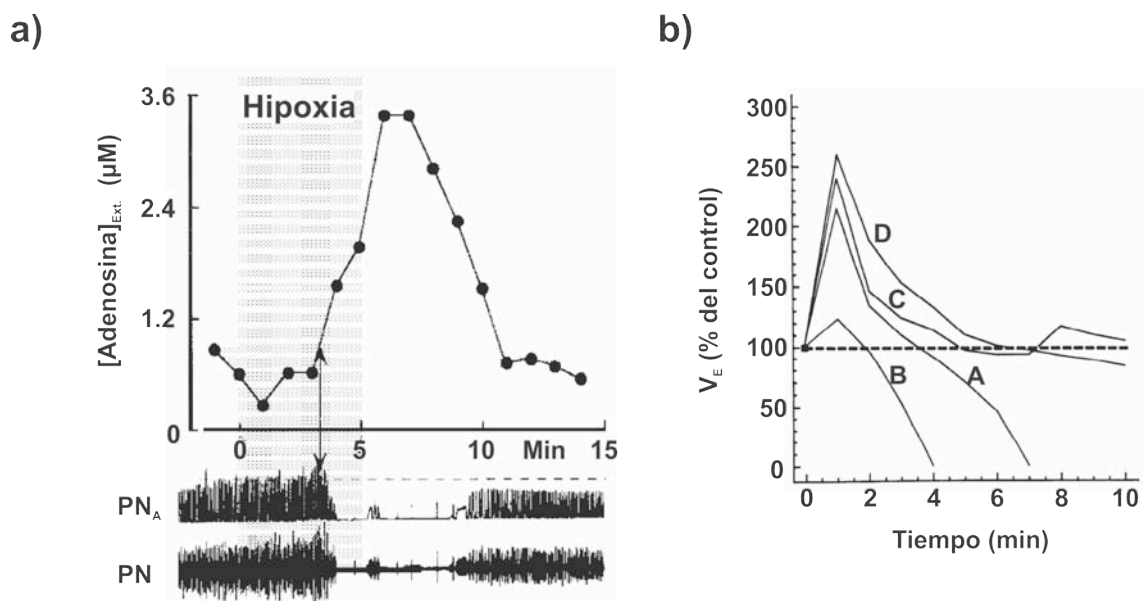


Figura 9.-. Cambios en los niveles de adenosina durante la hipoxia y su efecto en la respiración. **a)** Cambios en la concentración extracelular de adenosina, así como la actividad registrada en el nervio frénico (PN, por sus siglas en inglés) y de la actividad rectificada e integrada de las descargas de este nervio (PN_A) en condiciones de hipoxia. Note que a los pocos minutos del incremento del nivel de adenosina la actividad del PN es inhibida. Modificado de (Richter et al., 1999). **b)** Medianas de la ventilación durante 10 min de hipoxia en los siguientes grupos experimentales: A = salina, B = dipiridamole (bloqueador de recaptura de adenosina), C = aminofilina (antagonista de los receptores de adenosina), D = 8 sulfofenil teofilina (antagonista de los receptores de adenosina), en donde se puede ver que al incrementar los niveles de adenosina (bloqueo de su recaptura; B) la ventilación pulmonar cae rápidamente en hipoxia. Por el contrario, la depresión se retarda al bloquear los receptores adenosinérgicos (C y D). Modificado de (Runold et al., 1989).

A nivel celular, se ha propuesto que la depresión del circuito respiratorio por la activación de los receptores A₁ involucra el incremento en la conductancia de los canales de K⁺ en las neuronas del preBötC, que produce hiperpolarización membranal y disminución en la generación de los potenciales

de acción (Mironov et al., 1999). Estos cambios en la excitabilidad, se acompañan de una disminución en la resistencia de entrada (Vandam et al., 2008), así como de una depresión global del preBötC al suprimir las corrientes postsinápticas excitadoras (glutamatérgicas) e inhibitoras (glicinérgicas) (Bellingham y Berger, 1994). Se infiere que este último efecto de la adenosina produce una disminución generalizada en la excitabilidad neuronal y una disminución en la comunicación inter-neuronal (Bellingham y Berger, 1994; Vandam et al., 2008) y se propone que mecanismos muy similares participan en el proceso de reconfiguración de preBötC en condiciones de hipoxia (Ramirez et al., 2007; Peña, 2009).

2.-Planteamiento del problema

La respiración es una de las funciones más importantes en los animales, ya que además de permitir el intercambio de gases, es necesaria para mantener el metabolismo y regular el pH (Peña y García, 2006). Esta función, en los mamíferos, es llevada a cabo por la contracción rítmica del diafragma y de los músculos intercostales, la cual es controlada por el complejo pre-Bötzinger (preBötC) del tallo cerebral (Peña y García, 2006). Se ha demostrado que el preBötC es capaz de generar distintos ritmos respiratorios dependiendo de la disponibilidad de oxígeno (Lieske et al., 2000). Así tenemos que, en condiciones normales de oxigenación (normoxia), el preBötC produce dos ritmos respiratorios: la respiración “normal” o eupnea y los “suspiros”. Por otra parte, el mismo circuito, en condiciones de hipoxia, es capaz de reconfigurarse para generar boqueos al final de la respuesta respiratoria a la hipoxia (Lieske et

al., 2000). El proceso de reconfiguración del preBötC durante la hipoxia involucra cambios tanto en la transmisión sináptica (Ballanyi et al., 1994; Ramirez et al., 1998a; Ballanyi et al., 1999; Lieske et al., 2000) así como en las propiedades intrínsecas neuronales (Mironov et al., 1998; Mironov y Richter, 1998, 1999; Mironov et al., 2000; Mironov y Richter, 2000b) que en su conjunto deprimen la actividad de muchos elementos o neuronas respiratorias produciendo la depresión del circuito (Bellingham y Berger, 1994; Vandam et al., 2008). Los registros unicelulares indican que a diferencia de otros circuitos localizados en el SNC, la hipoxia tiene un efecto diferencial sobre la transmisión sináptica (no deprime completamente la transmisión sináptica excitadora mientras que abole la transmisión sináptica inhibitora). Los efectos de la hipoxia sobre el preBötC parecen deberse a la activación de receptores de adenosina tipo A_1 . Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de estudios sobre los efectos de la hipoxia sobre el preBötC a nivel unicelular, no existen estudios que se enfoquen al efecto de la hipoxia a nivel de la configuración global del circuito. Por ejemplo, se desconoce que es lo que ocurre con las interacciones entre los elementos o neuronas respiratorias durante la reconfiguración inducida por la hipoxia. El estudio de los cambios en la magnitud o de la fuerza de las interacciones entre los elementos o neuronas respiratorias, y su integración a los modelos de generación del ritmo respiratorio, es de suma importancia dado que se sabe que los cambios en la magnitud de las interacciones de las neuronas definen la dinámica de los circuitos neuronales. Con base en lo anterior, en esta tesis se estudiaron los cambios en la magnitud de las interacciones entre las neuronas o elementos respiratorios del preBötC durante la reconfiguración por la hipoxia. Por otra

parte, con el fin de estudiar el papel del receptor adenosinérgico A₁ en la reconfiguración del preBötC se estudiaron los cambios en los sinápticos espontáneos excitadores durante la reconfiguración del preBötC en presencia y ausencia de agonistas/antagonistas del receptor A₁ de adenosina.

3.-Hipótesis

La conectividad funcional en el preBötC es heterogénea en lo que respecta a su sensibilidad a la hipoxia y a la adenosina.

4.-Objetivo general

Estudiar los cambios funcionales en la configuración del preBötC que ocurren durante su reconfiguración durante la hipoxia y el papel de la adenosina en este proceso.

5.-Objetivos particulares

- 1) Determinar si la reconfiguración del preBötC en la hipoxia involucra un cambio en el número de elementos (neuronas o grupos de neuronas) activos o en la magnitud de las interacciones.
- 2) Evaluar la participación de la adenosina en los cambios en la transmisión sináptica excitadora del preBötC durante la hipoxia:

2.1. Evaluar el papel de la adenosina en la modulación de los sinápticos espontáneos en condiciones de normoxia e hipoxia.

2.2. Evaluar el papel de la adenosina en la modulación de los sinápticos poblacionales en condiciones de normoxia e hipoxia.

6.-Materiales y Métodos

Animales.

Se utilizaron ratones CD-1 de 4 a 8 días de edad para los experimentos. Los animales fueron proporcionados por el Bioterio del INB, UNAM-Campus Juriquilla. Todos los procedimientos se realizaron bajo los lineamientos aceptados por el comité de ética del Instituto de Neurobiología y conforme a la Norma Oficial Mexicana para el Uso y Cuidado de los Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

Obtención de rebanadas coronales de tallo cerebral

Se realizaron experimentos en rebanadas de tallo cerebral que contienen el preBötC y que generan de manera espontánea el ritmo respiratorio (Peña et al., 2004). Los animales se sacrificaron para extraerles el tallo cerebral. Éste se colocó en líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA), que contiene (en mM): 119 NaCl, 3 KCl, 1.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 25 NaHCO₃, 30 D-glucosa a pH 7.4,

mantenido en gaseo constante con carbógeno (95% O₂ / 5% CO₂) a 4°C. El tallo cerebral se pegó en un bloque de agar al 4% con un ángulo de 15°. Posteriormente, se procedió a cortar rebanadas coronales de 200-250 µm de manera seriada, en un vibratomo, en dirección rostrocaudal hasta alcanzar el margen rostral del preBötC. Una vez en esta posición, se procedió a obtener la rebanada que contiene al preBötC con un grosor de 550-700 µm. Esta rebanada se colocó sobre un arreglo de multielectrodos (MEA) o en una cámara de registro convencional (Rivera-Angulo et al., 2014). En ambos sistemas de registro se mantuvo una perfusión constante de LCRA a 10 mL/min y con temperatura entre 29-31°C. Por último, se incrementó la concentración de KCl a 8 mM en un lapso de 75 minutos para que la actividad rítmica del preBötC se mantuviera constante y estable (Tryba et al., 2003). En condiciones control, el LCRA es gaseado con carbógeno (95% O₂ / 5% CO₂) (normoxia) y para inducir las condiciones de hipoxia, se sustituyó el gaseado con carbógeno por el gaseado con una mezcla de nitrógeno (95% N₂ / 5% CO₂) por 15 minutos (Peña et al., 2004; Peña et al., 2008). Posteriormente, se restableció el gaseo con carbógeno (reoxigenación).

Registros de rebanadas con arreglos de multielectrodos

Para los registros en arreglos de multielectrodos (MEA, por sus siglas en inglés) se utilizaron rebanadas de 550 µm de grosor, que fueron colocadas sobre un MEA de 60 electrodos (Multi-Channel Systems; Reurlingen, Alemania). Cada electrodo tiene un diámetro de 30 µm y una separación entre ellos de 100 µm (**Figura 10a**). La señal de los electrodos del MEA fue

digitalizada a 25 kHz y se almacenó sin filtrar con el programa MC_Rack (Multi-Channel Systems; Reurlingen, Alemania). Esta señal fue posteriormente filtrada de 0.25 – 7.00 kHz para el análisis de espigas extracelulares (Carroll y Ramirez, 2013; Carroll et al., 2013). Una vez filtrada la señal, los registros de las diferentes condiciones experimentales (10 min de normoxia y los últimos 10 min de la hipoxia) fueron concatenados para posteriormente ser analizados mediante el programa OFFline Sorter (v. 3.3.1; Plexon Inc.). Las espigas de las neuronas fueron identificadas como aquéllas que rebasaran un umbral que se colocó en un voltaje igual a 2.6 veces la desviación estándar (D.E) del ruido de registro (Super y Roelfsema, 2005; Galán et al., 2010). Las espigas así identificadas fueron agrupadas como pertenecientes a neuronas individuales utilizando el análisis de componentes principales y el algoritmo *standard-expectation-maximization* (**Figura 10b**). Las unidades así identificadas fueron depuradas de aquellas espigas que cayeran dentro del periodo refractario (2 ms) y la calidad de la discriminación de las espigas fue corroborada al realizar autocorrelogramas con el programa Neuroexplorer (v. 4.126, Nex Technologies; **Figura. 10b**; Bedenbaugh y Gerstein, 1997; Super y Roelfsema, 2005). En los casos en que no fue posible identificar unidades diferenciadas, se optó por seleccionar multiunidades (grupos de neuronas) (Bedenbaugh y Gerstein, 1997; Super y Roelfsema, 2005). Para este efecto, el umbral de detección de espigas se estableció a 4.0 veces la D.E. del ruido de registro (Bedenbaugh y Gerstein, 1997; Super y Roelfsema, 2005). Una vez detectadas las espigas de la actividad multiunitaria, se les realizó el mismo análisis que aquellas pertenecientes a las unidades. El análisis incluyó únicamente neuronas respiratorias (**Figura 10c**).

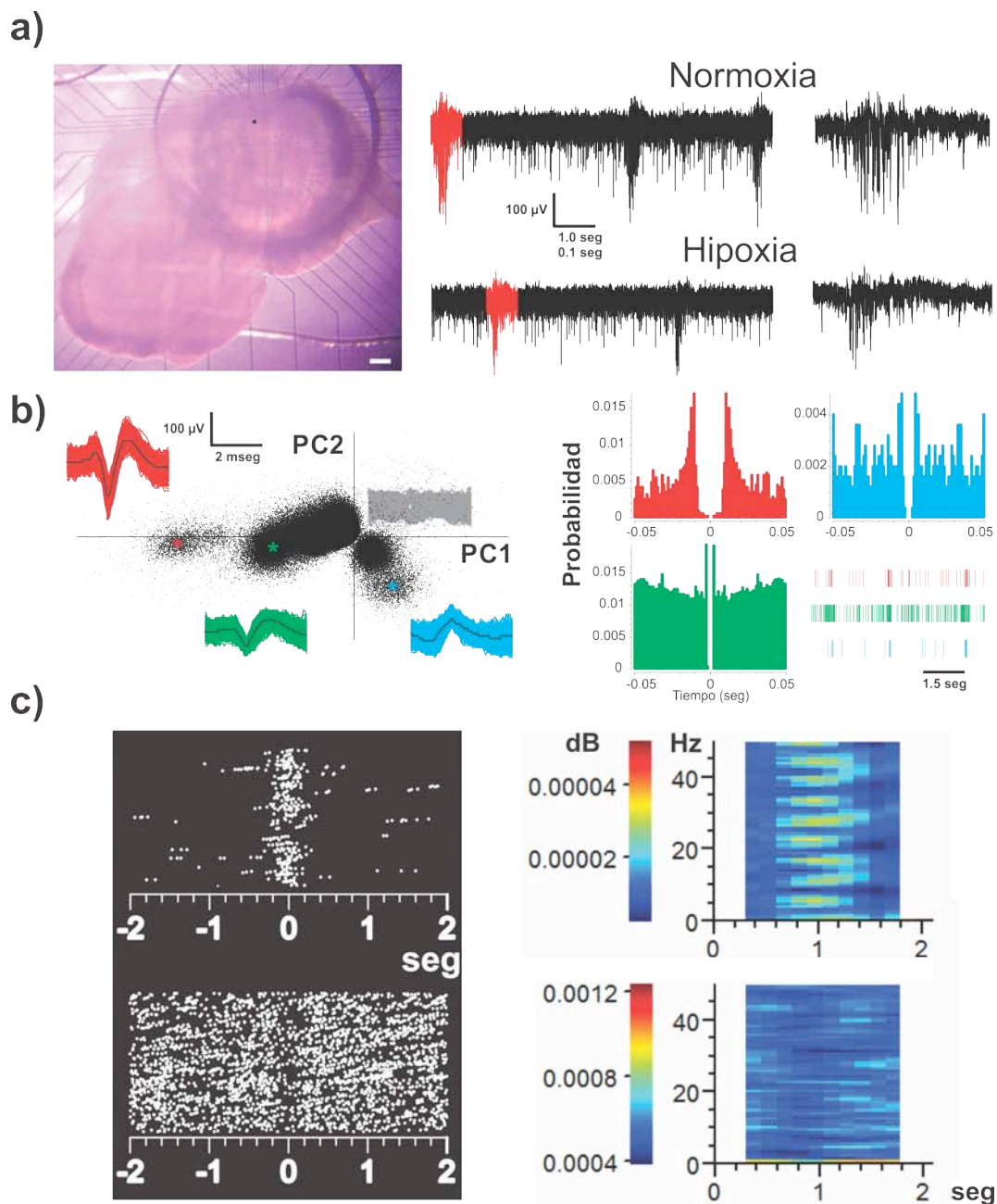


Figura 10.- Registro del circuito respiratorio con arreglos de multielectrodos (MEA). **a)** Rebanada de tallo cerebral colocada sobre el arreglo de multi-electrodos (izquierda) en la región del preBötC. La escala representa 200 μM . El punto negro representa el electrodo del MEA del que se obtuvieron los registros de la derecha. Se muestran los registros electrofisiológicos obtenidos de este electrodo tanto en normoxia (condición control) como en hipoxia (condición experimental). En rojo se resaltan las ráfagas respiratorias que se muestran a la derecha a una mayor resolución. **b)** Análisis de detección de espigas (*spike sorting*) para detectar las unidades respiratorias. En la izquierda, se muestra la gráfica de componentes

principales (PC, por su abreviatura en inglés) en donde cada punto representa una espiga que sobrepasó el umbral de 2.6 D.E. del ruido de registro. Los recuadros muestran las formas de las espigas seleccionadas en colores diferentes (en donde la línea negra representa el promedio). El ruido es representado en gris. A la derecha, se muestran los auto-correlogramas de las unidades seleccionadas (mismos colores que en la figura de la izquierda) con periodos refractarios claros, así como el *raster plot* de las unidades seleccionadas (cada línea vertical representa una espiga). **c)** A la izquierda se muestra una gráfica de eventos peri-estímulo en donde cada punto representa una espiga y a la derecha se muestra un espectrograma peri-evento, en donde la escala de color representa el valor del poder. Note que la neurona respiratoria muestra actividad en contrafase con la neurona espiratoria.

Con el tiempo de ocurrencia de las espigas de las unidades y las multiunidades (considerados elementos respiratorios), se construyeron *raster plots* (**Figura 14a**), con una resolución temporal (bin) de 1 ms. Posteriormente, se construyeron correlogramas cruzados con rutinas programadas en MATLAB (R2011b), mediante la función **crosscorr**. Esta función mide la sincronización de dos señales en función de un desfase temporal en una de ellas, es decir, la probabilidad de encontrar espigas coincidentes en las dos señales en un intervalo de tiempo determinado (Tchumatchenko et al., 2011; Quian Quiroga y Panzeri, 2013). En nuestro caso usamos una ventana de coincidencia de ± 5 ms (Constantinidis et al., 2001), lo cual corresponde a una ventana temporal de interacciones mono-sinápticas (Sirota et al., 2008). Si no hay correlación entre las dos señales, el resultado de la función **crosscorr** tenderá a cero, mientras que la sincronización absoluta generará un resultado de la función **crosscorr** de 1 y no mostrará retraso (*lag*) alguno (Tchumatchenko et al., 2011; Quian Quiroga y Panzeri, 2013). Para dicho análisis, se incluyeron las espigas de las unidades y las multiunidades (Perkel et al., 1967; Kirkwood, 1979; Hilaire

et al., 1984; Kashiwagi et al., 1993; Bedenbaugh y Gerstein, 1997; Shen et al., 2002; Li et al., 2003; Super y Roelfsema, 2005; Eugenin et al., 2006; Segers et al., 2008; Muller et al., 2009; Ott et al., 2011; Lalley y Mifflin, 2012; Road et al., 2013). Por otra parte, como el número de los potenciales de acción de cada neurona es diferente, y puede cambiar entre condiciones experimentales, los autocorrelogramas y los correlogramas cruzados se normalizaron a la tasa de disparo. Para ello, se cuantificó la probabilidad de disparo en cada bin de tiempo y al resultado de la correlación se le restó esta probabilidad (Nini et al., 1995; Heimer et al., 2002). Una vez obtenidos los correlogramas cruzados, se consideró como interacciones funcionales significativas a aquéllas cuyos valores de correlación mostrara un pico de correlación que superara 5 veces la D.E. del ruido de correlación ($>$ del 99.9 % del intervalo de confianza) (Constantinidis et al., 2001). Se calculó la tasa de disparo promedio para cada elemento respiratorio como una medida de la excitabilidad de los elementos respiratorios en las distintas condiciones experimentales. Además, se calculó el inverso de la mediana de los intervalos inter-espigas (ISI, por sus siglas en inglés) como un indicador de la tasa de disparo de las neuronas respiratorias durante la ráfaga poblacional (Galán et al., 2010; Van Dijck et al., 2013). Para ello, se utilizaron las funciones *mean* y *median* de MATLAB. Por otra parte, se construyeron matrices de correlación de cada condición experimental (**Figura 15a**, (Segers et al., 2008; Ott et al., 2011)) en donde se graficó el valor obtenido de las correlaciones positivas que sobre pasaron el umbral determinado para definir una relación funcional significativa ($>$ 5 D.E.). De las 64,543 correlaciones evaluadas en esta tesis el 1.42 % (920 correlaciones) sobrepasaron el umbral mencionado. La matriz de correlación es una matriz

cuadrada de $n \times n$ construida con los coeficientes de correlación obtenidos de las correlaciones cruzadas. Los valores de correlación cruzada de un elemento respiratorio contra él mismo (autocorrelación), así como las correlaciones que no sobrepasaron el umbral se graficaron con valor de 0. Para evaluar el cambio en la magnitud de las correlaciones cruzadas entre la hipoxia y la normoxia se sustrajo la matriz control de la matriz experimental y se construyó una nueva matriz (Δ de correlación) con los datos obtenidos de la sustracción. Por otra parte, se construyeron representaciones gráficas de las correlaciones del circuito respiratorio utilizando el programa Cytoscape (Cytoscape Consortium) (**Figura 16b**), en donde cada círculo representa a un elemento y las líneas que unen a los elementos respiratorios representan una relación funcional entre ellos. El grosor de la línea está determinado por el valor de la correlación y el diámetro del círculo es proporcional al número de relaciones funcionales que cada elemento respiratorio establece con otros elementos dentro de la red.

Registros de *Patch-Clamp*

Técnica de *patch-clamp* “a ciegas”: Para estos registros se utilizaron electrodos de 4-6 M Ω conectados a un amplificador Axoclamp 2B. Los electrodos se fabricaron con capilares de borosilicato en un estirador de pipetas Sutter 97-B y fueron llenados con una solución interna que contiene (en mM): 140 gluconato de potasio, 1 CaCl₂, 10 EGTA, 2 MgCl₂, 4 Na₂ATP, 10 HEPES (pH 7.3-7.4). Las neuronas respiratorias se identificaron de acuerdo a su fase de actividad con respecto al ciclo respiratorio (registro de campo). Se clasificaron como neuronas inspiratorias a las que presentan actividad durante

las ráfagas poblacionales, y como neuronas espiratorias, a las que presentan actividad entre las ráfagas respiratorias observadas en el registro de campo (**Figura 11**). Para el registro de las neuronas se utilizó la técnica de *patch-clamp*, la cual consiste en formar un sello de alta resistencia (gigaohms) entre la punta de la pipeta y la membrana (configuración de “cell-attached”) (Hamill et al., 1981). Posteriormente, se aplicó succión para romper la membrana localizada en la apertura de la pipeta, manteniendo el sello en los bordes de la misma, para generar la configuración de célula completa (“whole-cell”) en la cual se registró la actividad eléctrica de la neurona en fijación de corriente para estudiar el voltaje transmembranal de la neurona respiratoria (Peña et al., 2004). Mediante esta técnica, se caracterizó la transmisión sináptica espontánea. Dado que las neuronas inspiratorias tienen un potencial de membrana en reposo que oscila de -40mV a -56mV, se inyectó la corriente necesaria para producir un voltaje de membrana a \approx -60mV con el objetivo de homogenizar las mismas condiciones experimentales en todas las células. Posteriormente, se procedió a registrar 10 minutos de actividad espontánea en condición de normoxia, misma en la que se aisló el componente excitador con antagonistas de los receptores GABA_A y de los receptores de glicina (bicuculina 10 μ M y estricnina 1 μ M, respectivamente), para después proceder al registro de la actividad espontánea excitadora por otros 10 minutos. Una vez aislado y registrado el componente excitador de la transmisión sináptica espontánea, se sometió a la neurona a condiciones de hipoxia por 10 minutos, al sustituir la mezcla de carbógeno (95%O₂/5%CO₂) por una mezcla en la que el oxígeno fue reemplazado por nitrógeno (95%N₂/5%CO₂). Después de los 10 minutos de hipoxia, se re-estableció el gaseo con carbógeno para registrar la

transmisión sináptica excitadora en condiciones de reoxigenación.

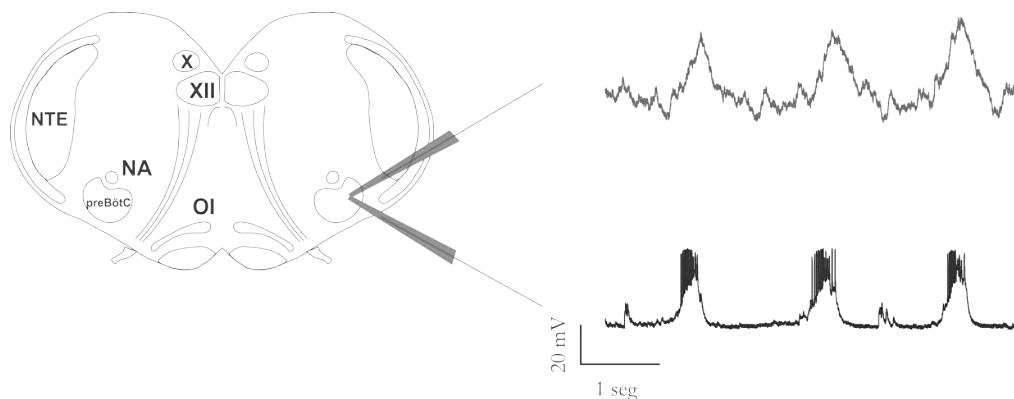


Figura 11.- Registro simultáneo de campo y *Patch-Clamp* de una rebanada de tallo cerebral. Rebanada de tallo cerebral que contiene al preBötC, de la cual se registra simultáneamente la actividad poblacional, que aquí se muestra rectificadas e integradas (trazo superior, gris), así como la actividad unitaria intracelular con la técnica de *Patch-Clamp* en la configuración de célula entera (trazos inferior, negro). Abreviaturas: XII, núcleo del nervio hipogloso; X, núcleo del nervio vago; OI, oliva inferior; NA, núcleo ambiguo; preBötC, complejo preBötzinger; NTE, núcleo trigémino espinal.

Análisis de la cinética de las ráfagas respiratorias:

Para evaluar la cinética de las ráfagas de actividad de los ritmos respiratorios producidos por el preBötC y registrados con los multielectrodos, se calculó la amplitud de pico a pico de las señal cruda de los electrodos con la función “*Peak-Peak Amplitude*” del programa MC_Rack con una ventana de cuantificación de 25ms. Posteriormente, los datos fueron suavizados con la función *smooth (factor 2)* del programa IGOR-Pro (WaveMetrics, Lake Oswego, OR). Por último, se cuantificó la amplitud, duración y el tiempo de subida de las ráfagas inspiratorias poblacionales procesadas de esta manera. La amplitud se cuantificó en la altura máxima de la ráfaga, partiendo del promedio de la

actividad basal. El tiempo de subida se cuantificó del 10% al 90% de la amplitud máxima. Por último, la duración se midió al 50% de la amplitud máxima de las ráfagas.

Análisis de los sinápticos espontáneos y poblacionales:

Los sinápticos espontáneos individuales registrados de las neuronas respiratorias con la técnica de *patch-clamp* a “ciegas” (**Figura 12**) se detectaron mediante el software *Mini Analysis Program* (Synaptosoft, Decatur, Georgia) (Beattie et al., 2002; Garduno et al., 2012; Hernández-Vazquez et al., 2014). Para dicho análisis, se tomaron los sinápticos espontáneos de los últimos 5 min de cada condición. Los sinápticos espontáneos que no tuvieron una amplitud mayor a 0.5 mV no fueron tomados en cuenta para el análisis (Del Castillo y Katz, 1954; Martin, 1966). Los sinápticos poblacionales (mesetas inspiratorias) fueron cuantificados de la misma manera que las ráfagas inspiratorias sin influencia alguna de los potenciales de acción a los mismos (Peña y Ramirez, 2004).

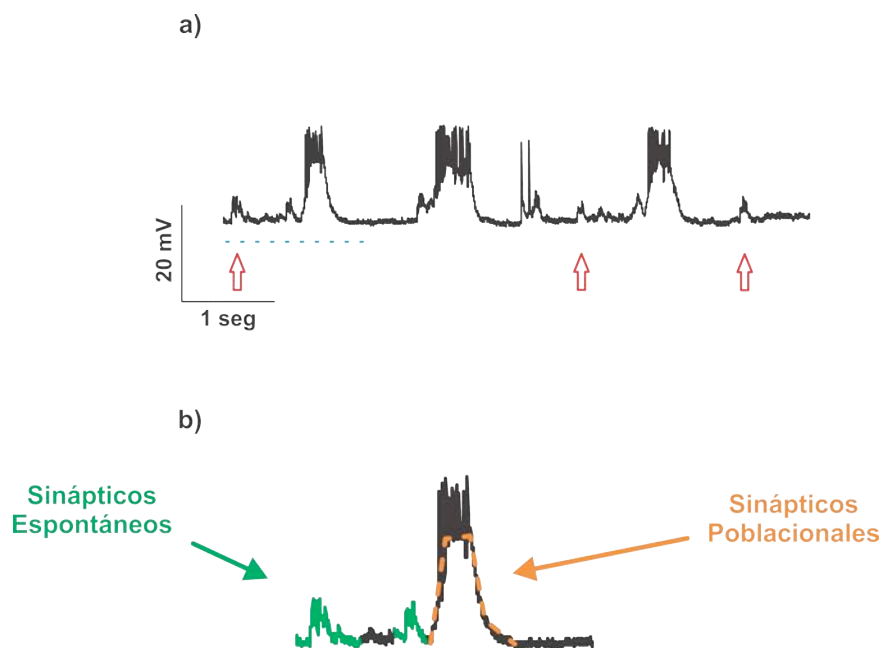


Figura 12.- Registro de *Patch-Clamp* de una neurona respiratoria. **a)** Registro representativo de una neurona respiratoria en donde se pueden observar los sinápticos espontáneos (señalados con flecha roja). **b)** Amplificación de una sección del registro mostrado en a) (línea azul), para ejemplificar los sinápticos espontáneos (resaltados en verde) y los sinápticos poblacionales (línea punteada de color naranja).

Estadística

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPAD Prism. Inicialmente se realizaron las pruebas de normalidad *KS normality test* y *D'Agostino & Pearson omnibus normality test*. En el caso de aquellos grupos experimentales en los que los datos se hayan distribuido normalmente se evaluaron las diferencias entre los grupos con la prueba t de student pareada. Para los datos con una distribución no-normal se aplicaron las pruebas no paramétricas de Wilcoxon o Friedman. Los datos son mostrados como la media \pm el error estándar o con representaciones de Tukey (cajas cuya línea central representa la mediana, los extremos representan los rangos intercuartilares y

las líneas sobresalen hasta el 5to y el 95avo percentil). Para todos los casos, el valor de $p < 0.05$ se consideró como significativamente diferente.

Fármacos

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

- (-) Estricnina. Antagonista de los receptores de glicina.
- Bicuculina. Antagonista de los receptores de $GABA_A$.
- 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX). Antagonista de los receptores de adenosina tipo 1.
- (R)-N6-(2- fenil isopropil)- adenosina (R-PIA). Agonista de los receptores de adenosina tipo 1.

Los fármacos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, EUA) y fueron preparados en soluciones "stock" a 1000x, que se almacenaron a -20°C hasta su uso.

7.-Resultados

Cambios en la configuración del preBötC en condiciones de hipoxia, evaluados con arreglos de multielectrodos

Los registros rebanadas de tallo cerebral que contienen al preBötC con arreglos de MEAs (Carroll y Ramirez, 2013; Carroll et al., 2013) muestran que, en estas condiciones experimentales, el preBötC produce el típico patrón respiratorio tipo eupnea en condiciones de normoxia y cambia su patrón respiratorio durante la hipoxia para generar ráfagas tipo boqueos (**Figura 10a y 13**) (Lieske et al., 2000; Peña et al., 2008). Los boqueos registrados en el preBötC con MEAs presentan la ya descrita disminución en su duración media (75 ± 9 % con respecto a la normoxia), en el tiempo de subida (75 ± 7 % con respecto a la normoxia) y en su frecuencia (47 ± 9 % con respecto a la normoxia) cuando se compara con la eupnea (**Figura 10a y 13**) (Lieske et al., 2000; Peña et al., 2008).

Del análisis de discriminación de espigas de los registros de 5 rebanadas se discriminó la actividad de 159 unidades respiratorias (de 17 a 59 unidades por rebanada) y de 134 multiunidades respiratorias (de 13 a 44 multiunidades por rebanada). Todas las multiunidades presentaron actividad inspiratoria, mientras que el 87% de las unidades discriminadas presentaron un patrón de disparo que las caracteriza como neuronas inspiratorias y el 13% presentaron un patrón de disparo que permitió catalogarlas como neuronas espiratorias (**Figura 10c y 11a**).

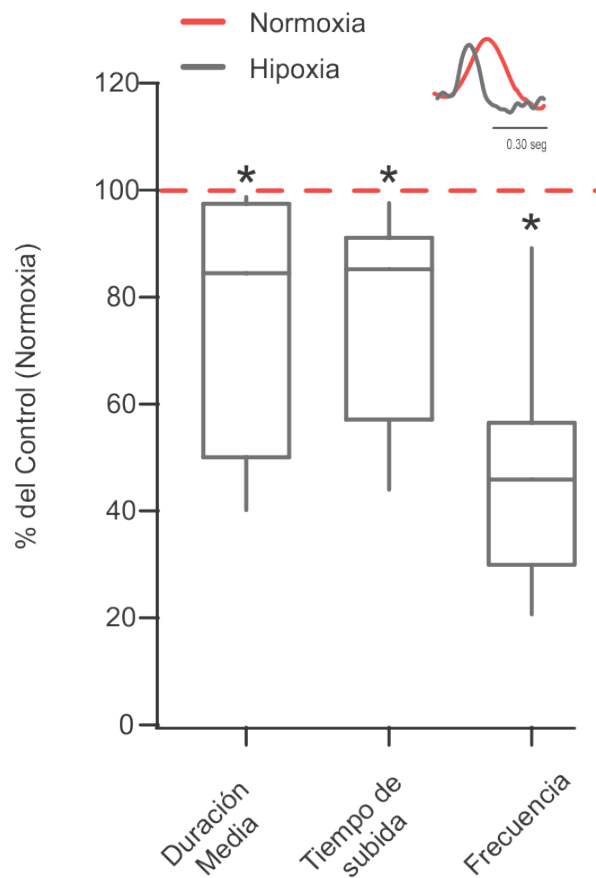


Figura 13.- Cambio en el patrón respiratorio producido por el preBötC durante la hipoxia en registros con MEAs. Se grafica la duración media, el tiempo de subida y la frecuencia de las ráfagas respiratorias durante la reconfiguración del preBötC durante la hipoxia (con respecto a la normoxia). El inserto representa el promedio de 8 ráfagas en normoxia (rojo) e hipoxia (gris). Para cada “caja” en la gráfica, la línea central representa la mediana, los extremos representan el 25avo y el 75avo percentil y las líneas que se extienden de las cajas representan el 5to y el 95avo percentil. N= 8 canales de 5 rebanadas distintas. $p^* < 0.05$ denota una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control en normoxia.

De la actividad de las unidades (SUAs, por sus siglas en inglés) y multiunidades (MUAs, por sus siglas en inglés) obtenidas de los registros con MEA se construyeron *raster plots* de la condición control (normoxia, 10 min, **Figura 14a**) y de los últimos 10 min de la condición experimental (hipoxia, de

15 min de duración total, **Figura 14a**). De la actividad de los elementos neuronales identificados en los registros de cada electrodo del MEA se cuantificó la frecuencia de los potenciales de acción (**Figura 14b**). La transición de eupnea a boqueos involucra cambios diversos en la tasa de disparo de los elementos respiratorios: el 32 % de los elementos respiratorios aumenta su tasa de disparo a un 135 ± 6 % del control; mientras que el 65 % de los elementos respiratorios disminuye su tasa de disparo a un 64 ± 2 % del control, efectos aparentemente contradictorios pero previamente reportados (Richter et al., 1991; Lovering et al., 2006). A pesar de esta diversidad de efectos de la hipoxia sobre la tasa de disparo de los elementos respiratorios, el efecto global, obtenido del promedio del cambio de las tasas de todas las neuronas registradas, muestra una disminución de la frecuencia de disparo a un 88 ± 3 % con respecto al control (**Figura 14b**). Por otra parte, como es de esperarse (Segers et al., 2008; Ott et al., 2011), observamos una mayor frecuencia de la tasa de disparo de las multiunidades con respecto a las unidades, tanto en normoxia (8.97 ± 0.7 y 4.96 ± 0.3 , respectivamente; $p < 0.05$) como en hipoxia (7.67 ± 0.6 y 4.32 ± 0.3 , respectivamente; $p < 0.05$). Además, cuantificamos el inverso de la mediana del intervalo inter-espiga, como una aproximación para evaluar la frecuencia de disparo intraráfagas (p.e. durante la ráfaga inspiratoria, Galán et al., 2010). De dicha cuantificación obtuvimos una mediana de 5.26 Hz (rango intercuartil: 1.72-12.82 Hz) en condiciones control y de 3.81 Hz (rango intercuartil: 1.16-11.43 Hz) durante la hipoxia.

Por otra parte, contrario a lo reportado previamente (Ramirez et al., 2007; Peña, 2009), donde encontraron que durante la hipoxia hay una

reducción del número de neuronas activas, solamente el 1.02% de los elementos respiratorios (unidades y multiunidades) dejaron de disparar en condiciones de hipoxia (n=3). Mientras que el 1.36% no cambió su tasa de disparo (n=4). En resumen, lo que observamos en cuanto a los cambios en la tasa de disparo de los elementos respiratorios durante la transición de la eupnea a los boqueos es una combinación de cambios diversos: algunos elementos aumentan su tasa de disparo mientras que otros la disminuyen, sin que estos elementos respiratorios se silencien por completo. Sin embargo, a nivel general se observó una disminución global de la tasa de disparo de los elementos respiratorios durante la hipoxia (**Figura 14b**).

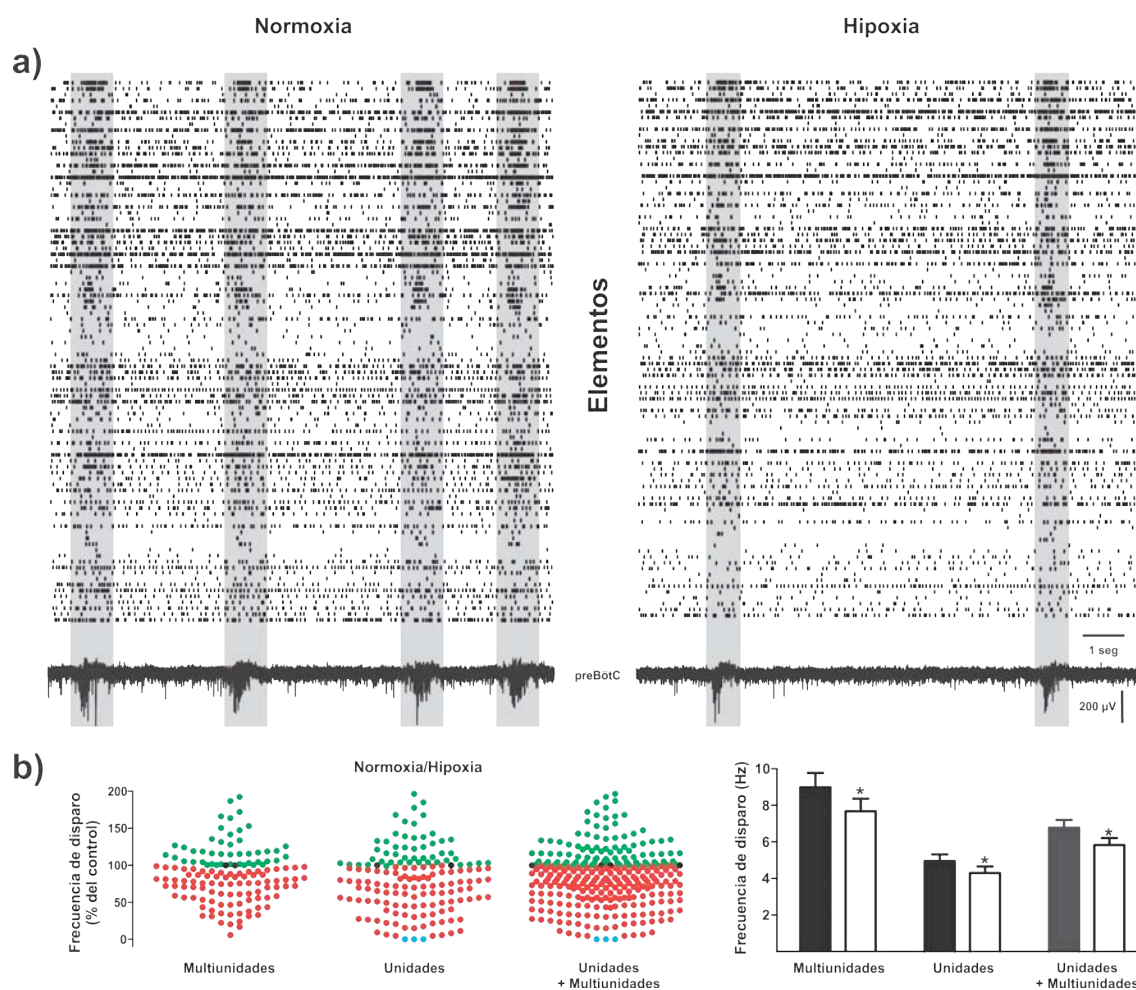


Figura 14.- Cambio en la actividad del circuito respiratorio durante su reconfiguración durante la hipoxia. **a)** *Raster plots* de las espigas registradas en diferentes electrodos del MEA. Cada línea representa la actividad de un elemento respiratorio y cada línea vertical representa una espiga. Las columnas grises representan la ventana temporal de la inspiración, que se observa en el trazo de la actividad poblacional en la parte inferior del *raster plot*. **b)** Cuantificación del cambio en la frecuencia de disparo de los elementos respiratorios durante la hipoxia en comparación con la normoxia. En el panel de la izquierda se muestra el cambio en la frecuencia de disparo de las multiunidades, unidades y las dos poblaciones juntas. Los puntos verdes representan aquellos elementos que aumentaron su frecuencia de disparo (cambio >3%), mientras aquellos elementos que disminuyeron su frecuencia de disparo son representados con puntos rojos (cambio >3%). Los puntos negros representan aquellos elementos que no modificaron su tasa de disparo, mientras que los azules son aquellos elementos respiratorios que dejaron de tener actividad durante la hipoxia. El panel de la derecha muestra el promedio de la frecuencia de disparo de las multiunidades, unidades y de la mezcla de ambas poblaciones en condiciones de normoxia (barras rellenas) e hipoxia (barras vacías). $p^* < 0.05$ denota una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control en normoxia.

Posteriormente, se caracterizaron las interacciones del circuito respiratorio mediante el análisis de correlograma cruzado (**Figura 15**). Los correlogramas obtenidos presentaron una gran diversidad de formas (**Figura 15a**, derecha), que incluyeron picos sin retraso ($lag \sim$ cero; 38 % de las correlaciones de rebanada representada en la **Figura 15a**), picos con un retraso (lag) entre 0.1 a 2.0 ms (37% de las correlaciones de rebanada representada en la **Figura 15a**) y picos con un retraso (lag) entre 2.1 a 5 ms (25% de las correlaciones de rebanada representada en la **Figura 15a**). De los correlogramas con pico de correlación sin retraso, el 75% mostró un pico cuya

duración media fue corta (1 ms) (**Figura 15a**), mientras que el resto (25%) mostró un pico cuya duración media fue más larga (> 1 ms).

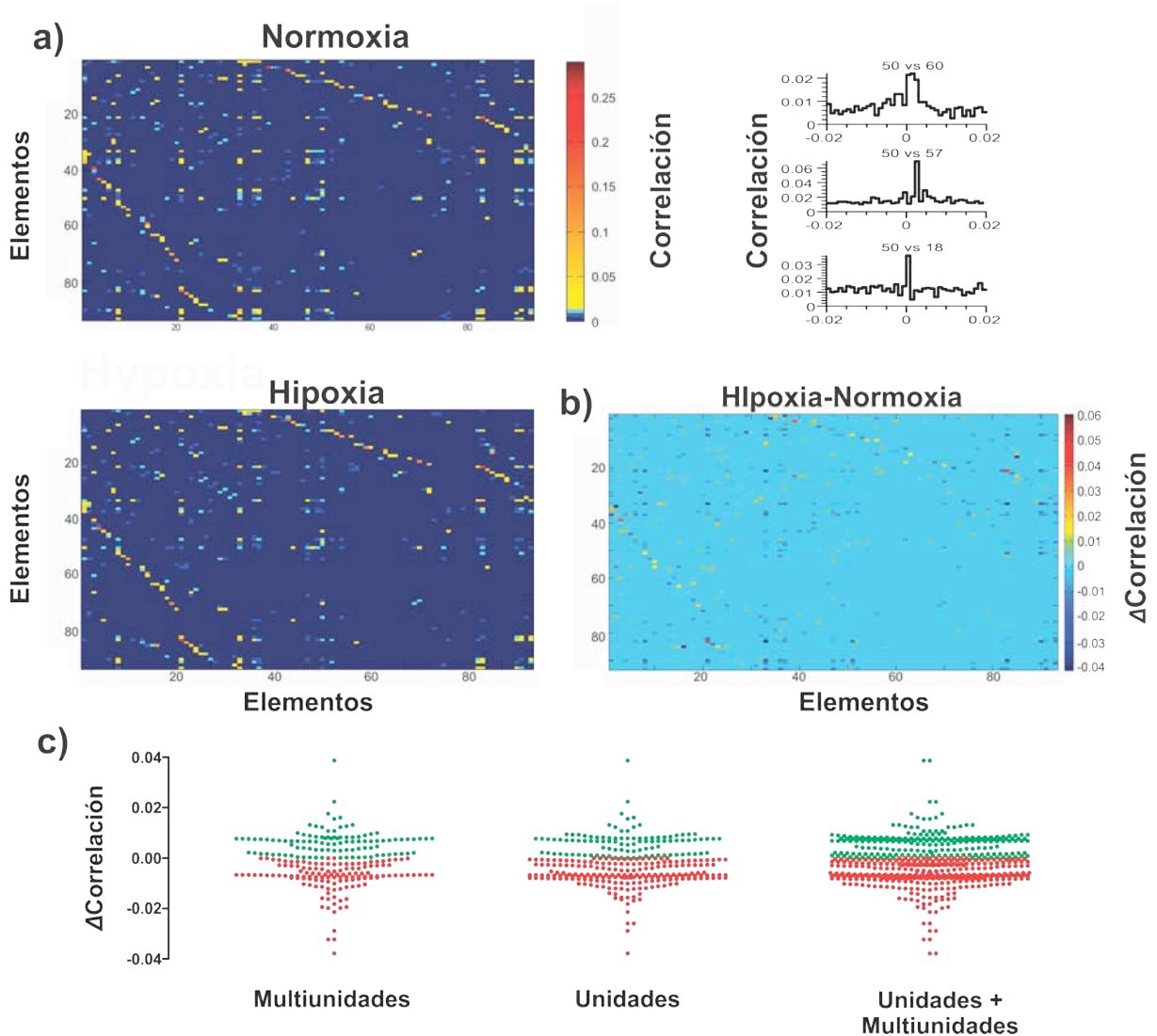


Figura 15.- Reconfiguración del circuito respiratorio en condiciones de hipoxia. **a)** Matriz de correlación en donde se muestra la magnitud de correlación entre los elementos respiratorios en escala de colores, tanto en la normoxia como en la hipoxia. A la izquierda se muestran 3 ejemplos de correlaciones cruzadas representativas. **b)** Matriz-resta de las matrices de correlación representadas en a) (Matriz hipoxia - Matriz control). La escala de color indica la magnitud del cambio en el valor de las correlaciones. **c)** La gráfica muestra el cambio de correlación (Δ Correlación) de las relaciones representadas en el panel b). Los datos fueron agrupados en unidades, multiunidades y todos los elementos juntos.

Con los valores de las correlaciones cruzadas se construyeron matrices de correlación, en donde cada cuadro representa la magnitud de la correlación (**Figura 15a**). Estas matrices revelan que la hipoxia produce cambios diversos en la fuerza de la interacción, medida como el valor de correlación, entre los elementos respiratorios (**Figura 15a**). Mientras que algunas interacciones aumentan su fuerza (39.8%) durante la hipoxia, en la mayoría de ellas disminuye la fuerza de interacción (60.2%), (**Figura 15a**). Lo anterior sugiere que la interacción entre los elementos del circuito respiratorio durante la hipoxia está disminuida en general. Estos cambios en la fuerza de correlación entre los elementos respiratorios se ven reflejados también cuando se cuantifica el cambio de correlación (Δ Correlación, **Figura 15b y c**) que puede ser medido al hacer la substracción matricial entre la hipoxia y la normoxia (**Figura 15b**). La reducción en la magnitud de las interacciones de los elementos respiratorios se observó cuando se compararon MUAs y SUAs individualmente o en combinación, sin haber diferencias significativas entre los 3 grupos (-0.0012 ± 0.0004 para los MUAs, -0.0010 ± 0.0004 para los SUAs y -0.0011 ± 0.0002 para los MUAs + SUAs; **Figura 16a**). Interesantemente, a pesar de que la fuerza de las interacciones se reduce en condiciones de hipoxia, el número de estas interacciones no se ve afectado (92 ± 35 en normoxia y 87 ± 33 en hipoxia, **Figura 16a**). En base a los resultados descritos, en la **Figura 16b** se muestra una representación gráfica de la configuración del circuito respiratorio durante la normoxia y la hipoxia. Los elementos respiratorios están representados como círculos y las correlaciones como líneas. El diámetro del círculo es proporcional al número de correlaciones significativas que un

elemento respiratorio tiene con otros elementos del circuito, y el grueso de la línea es proporcional al valor de correlación entre los dos elementos respiratorios unidos por la misma.

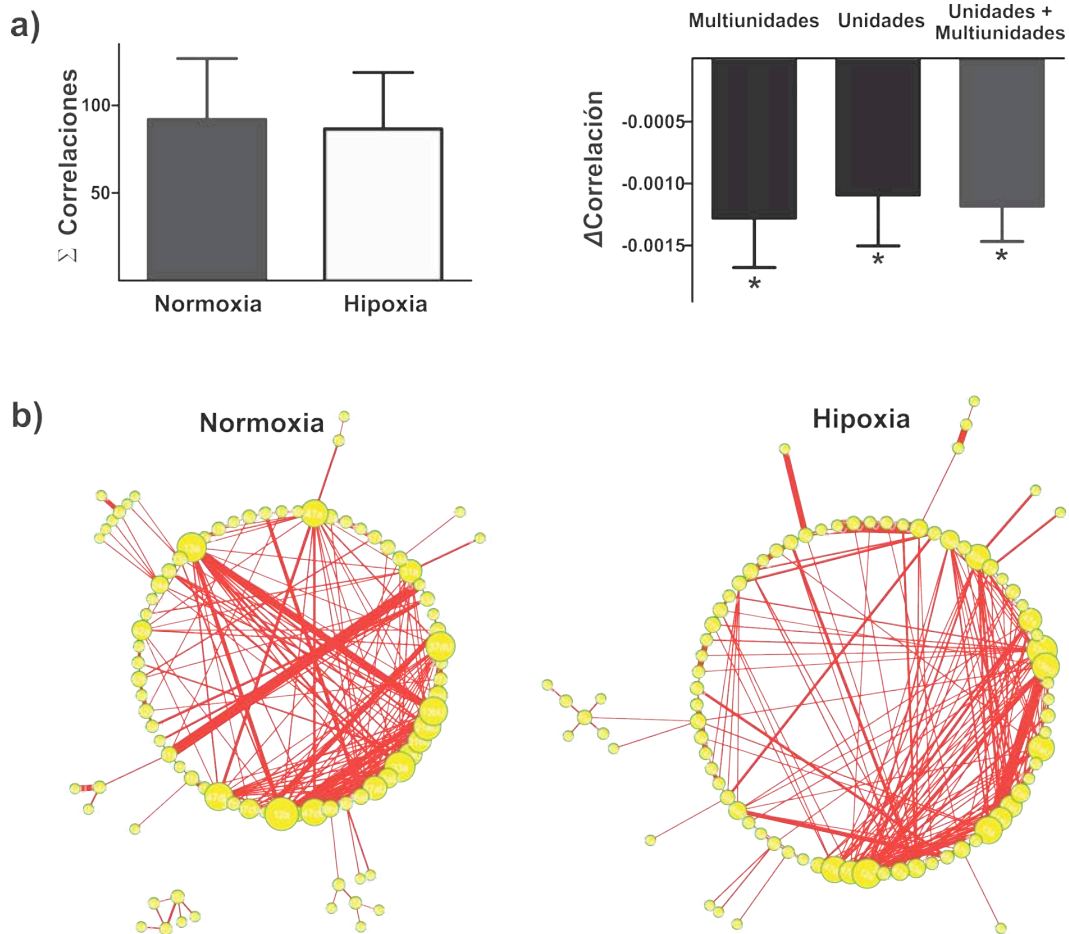


Figura 16.- La reconfiguración del preBötC durante la hipoxia se debe a una reducción en la magnitud y no en el número de las interacciones funcionales de sus elementos. **a)** Izquierda: histograma del número de interacciones entre los elementos respiratorios del preBötC en condiciones de normoxia e hipoxia. Note que la cantidad de interacciones funcionales entre los elementos respiratorios no cambió significativamente durante la hipoxia. Derecha: histograma del cambio en la correlación entre los elementos respiratorios entre las condiciones de normoxia e hipoxia. Note que hay una reducción significativa en la magnitud de la correlación de los elementos respiratorios, sean estos unidades, multiunidades o todos los elementos juntos. **b)** Representación gráfica de las interacciones neuronales del preBötC en una rebanada

representativa durante la normoxia e hipoxia. Cada elemento respiratorio es representado como un círculo y cada correlación como una línea. El diámetro del círculo es proporcional al número de interacciones de dicho elemento con otros elementos del circuito. El grosor de la línea es proporcional al valor de la correlación. Nótese que la reconfiguración del preBötC no se debe a una disminución en el número de elementos respiratorios activos, o en el número de interacciones funcionales, sino a una reducción en la magnitud de las interacciones. * denota una diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.05$).

Cambios en la transmisión sináptica excitadora en el preBötC en condiciones de hipoxia

Como se mencionó en la introducción, la adenosina es un modulador homeostático de la actividad sináptica (Mitchell et al., 1993), especialmente en condiciones de hipoxia, cuando sus niveles extracelulares aumentan (Richter et al., 1999). El incremento en los niveles de adenosina durante la hipoxia juega un papel crucial en la reconfiguración del circuito respiratorio (Runold et al., 1989; Gozal et al., 2002; Walsh y Marshall, 2006; Fewell et al., 2007; Rivera-Angulo y Peña-Ortega, 2014 Schmidt et al., 1995; Herlenius y Lagercrantz, 1999), al deprimir la transmisión sináptica inhibitoria y, parcialmente, a la excitadora (Ballanyi et al., 1994; Ramirez et al., 1998a; Ballanyi et al., 1999; Lieske et al., 2000; Thoby-Brisson y Ramirez, 2000) a través de la activación del receptor de adenosina tipo A_1 (Herlenius y Lagercrantz, 1999; Vandam et al., 2008). Dado que la transmisión sináptica excitadora es parcialmente resistente a la hipoxia (Peña y Ramirez, 2005; Ramirez et al., 2007), se decidió estudiar el papel de la activación del receptor de adenosina tipo A_1 sobre la transmisión sináptica excitadora en el preBötC.

Inicialmente, se decidió caracterizar la modulación producida por la adenosina y/o la hipoxia sobre los sinápticos espontáneos excitadores en neuronas inspiratorias del preBötC, pues estos representan la actividad sináptica asincrónica del circuito (Pérez-León et al., 2003). Para ello, se llevó a cabo los experimentos en presencia de bicuculina (10 μ M) y estricnina (1 μ M) que bloquean la transmisión sináptica inhibitoria. Como se ha reportado previamente en otros circuitos, aunque no en la misma magnitud, la hipoxia deprime la transmisión sináptica excitadora en el preBötC (**Figura 17**), lo cual se ve reflejado en una disminución en la frecuencia de los sinápticos espontáneos (1.35 \pm 0.34 Hz en normoxia y 0.64 \pm 0.28 Hz en hipoxia, **Figura 17**) sin modificar su amplitud (2.33 \pm 0.51 mV en normoxia y 2.12 \pm 0.39 mV en hipoxia, **Figura 17**), lo cual sugiere que el efecto de la hipoxia sobre las neuronas inspiratorias del preBötC se debe a efectos a nivel pre-sináptico (Del Castillo y Katz, 1954; Redman, 1990; Stevens, 1993).

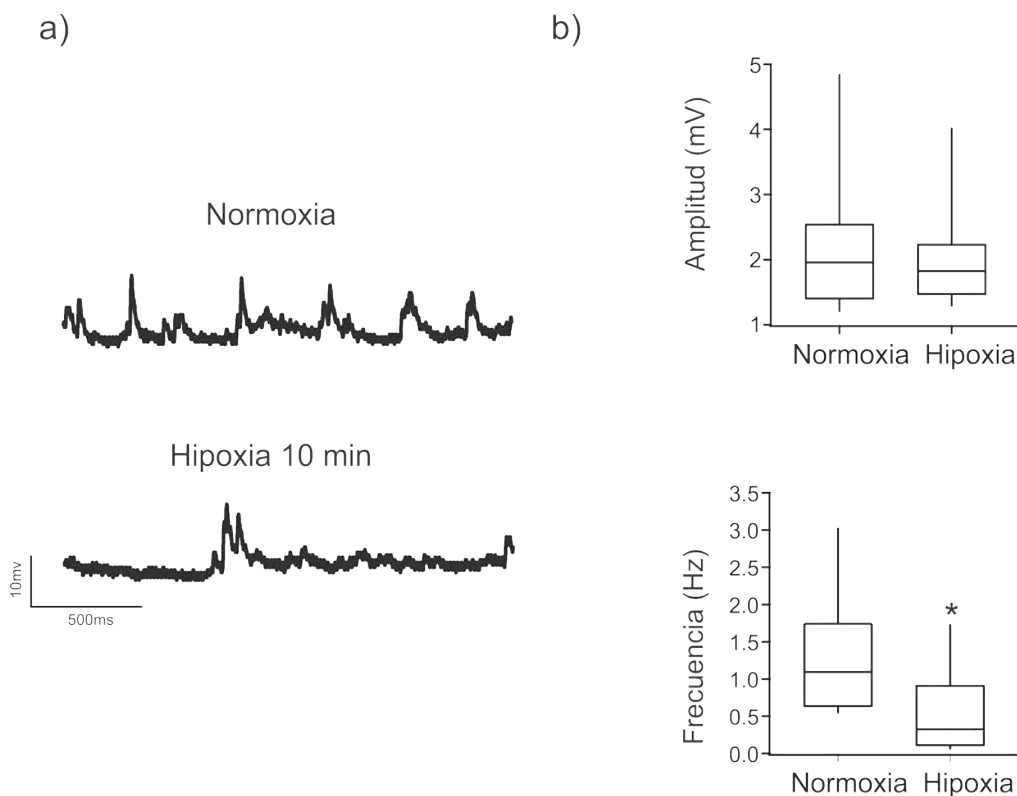


Figura 17. La hipoxia deprime la frecuencia de los sinápticos espontáneos de las neuronas del preBötC. **a)** Trazos representativos de los sinápticos espontáneos de una neurona inspiratoria en normoxia y en hipoxia. **b)** Cuantificación de la amplitud y la frecuencia de los sinápticos espontáneos en normoxia y en hipoxia. Los datos se muestran como cajas de Tukey en las que la línea central es la mediana, los extremos son el 25avo y el 75avo percentil y las líneas que se extienden de las cajas son el 5to y el 95avo percentil, N: 8. * denota una diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.05$).

Para estudiar el papel del receptor de adenosina tipo A_1 en la depresión de los sinápticos espontáneos producida por la hipoxia se decidió antagonizar al receptor mediante la aplicación de DPCPX (500nM, antagonista selectivo del receptor de adenosina tipo A_1). En estos experimentos se redujo el componente de transmisión sináptica inhibitoria al hiperpolarizar a las neuronas hasta $\approx -80\text{mV}$, que es un valor muy cercano al potencial de equilibrio electroquímico del Cl^- . Fue necesario implementar esta maniobra experimental

debido a que el bloqueo de la transmisión inhibitoria, con bicuculina y estricnina, sumado al bloqueo del receptor de adenosina A₁ con DPCPX ocasiona una sobreexcitación del circuito que impide registrar adecuadamente la transmisión sináptica espontánea. Nuestros resultados muestran que el antagonismo del receptor de adenosina tipo A₁ es suficiente para prevenir la disminución de la transmisión sináptica excitadora en condiciones de hipoxia (**Figura 18**). En presencia de DPCPX, la hipoxia no disminuyó significativamente la frecuencia de los sinápticos espontáneos (2.93 ± 1.44 Hz en normoxia y 2.86 ± 1.52 Hz en hipoxia, **Figura 18**), ni afectó su amplitud (2.50 ± 0.12 mV en normoxia y 3.65 ± 1.23 mV en hipoxia, **Figura 18**). Lo que nos indica que la depresión de los sinápticos espontáneos observada en la hipoxia es debida a la activación presináptica del receptor de adenosina tipo A₁.

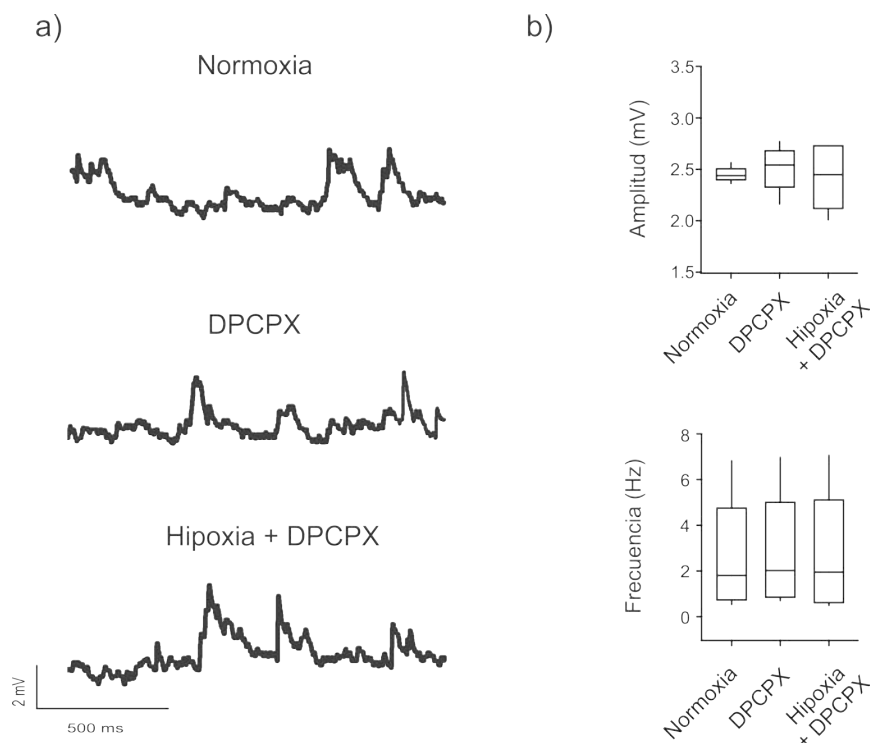


Figura 18. El bloqueo de los receptores de adenosina tipo-A₁ evita la disminución de la frecuencia de los sinápticos espontáneos de neuronas inspiratorias del preBötC. **a)** Trazos

representativos de los sinápticos espontáneos de una neurona inspiratoria en condiciones control, después de agregar DPCPX 500 nM y una vez que se aplicó hipoxia en presencia de DPCPX. **b)** Cuantificación de la amplitud y la frecuencia de los sinápticos espontáneos en las condiciones experimentales representadas en a). Los datos se muestran como cajas de Tukey en las que la línea central es la mediana, los extremos son el 25avo y el 75avo percentil y las líneas que se extienden de las cajas son el 5to y el 95avo percentil, N= 4.

A manera de control se decidió comparar los efectos de un agonista de los receptores de adenosina tipo A_1 , R-PIA (10 μ M), con los de la hipoxia. La aplicación de R-PIA produjo una reducción de la frecuencia de los sinápticos espontáneos (1.54 ± 0.41 Hz en control Vs 0.52 ± 0.14 Hz con R-PIA, **Figura 19**) sin afectar su amplitud (2.46 ± 0.32 mV en control Vs 2.49 ± 0.47 Hz con R-PIA, **Figura 19**). La disminución de la frecuencia de los sinápticos espontáneos producida por R-PIA fue ser revertida al aplicar DPCPX (1.54 ± 0.41 Hz en control, 0.52 ± 0.14 Hz con R-PIA y 1.26 ± 0.28 Hz con R-PIA y DPCPX). Los resultados indican que la activación del receptor de adenosina tipo A_1 disminuye la transmisión sináptica excitadora en el preBötC de manera similar a como lo hace la hipoxia.

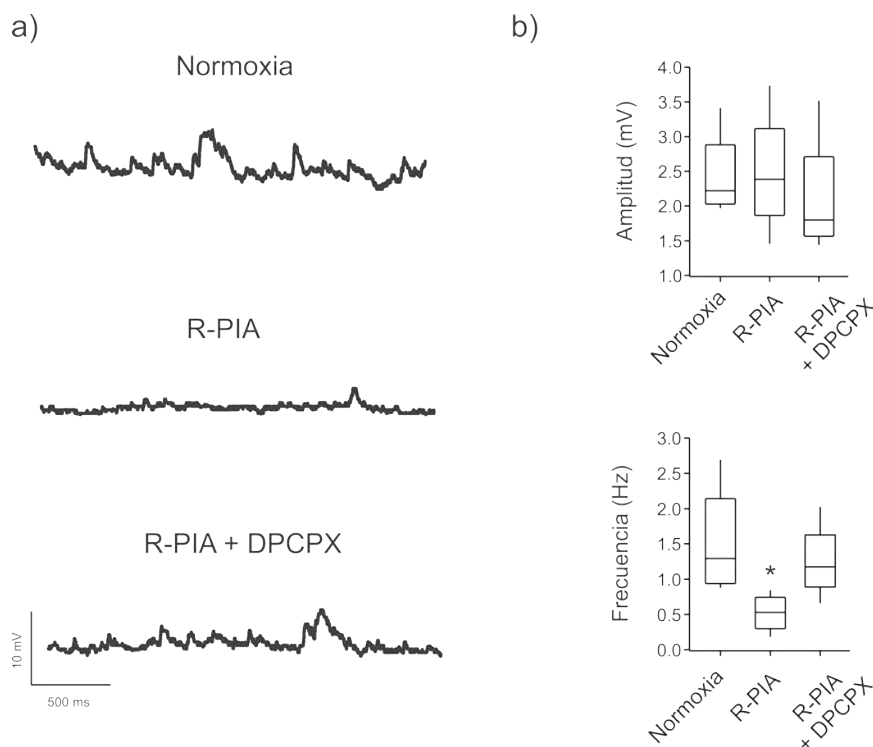


Figura 19. La activación del receptor de adenosina tipo A_1 , con R-PIA, disminuye la frecuencia de los sinápticos espontáneos que reciben las neuronas inspiratorias del preBötC, de manera similar a como lo hace la hipoxia. **a)** Trazos representativos de los sinápticos espontáneos de una neurona inspiratoria en condiciones control, después de agregar R-PIA $10 \mu\text{M}$ y después de agregar DPCPX 500 nM , en presencia de R-PIA. **b)** Cuantificación de la amplitud y la frecuencia de los sinápticos espontáneos en las condiciones experimentales representadas en a). Los datos se muestran como cajas de Tukey en las que la línea central es la mediana, los extremos son el 25avo y el 75avo percentil y las líneas que se extienden de las cajas son el 5to y el 95avo percentil, N: 4. * denota una diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.05$).

Además de evaluar los efectos de la hipoxia y de la adenosina sobre los sinápticos espontáneos asincrónicos, se evaluó el efecto de estas mismas condiciones experimentales sobre los sinápticos poblacionales, definidos como los sinápticos sincrónicos poblacionales asociados con la inspiración (Peña y Ramirez, 2004). Como previamente se ha reportado (Kawai et al., 1995; Schmidt et al., 1995; Herlenius y Lagercrantz, 1999; Ballanyi et al., 1994; Peña

y Ramirez, 2005), la hipoxia redujo la frecuencia de los sinápticos poblacionales a un 84 ± 3 % del control en normoxia (de 0.43 ± 0.07 Hz a 0.36 ± 0.6 Hz). Esta disminución fue prevenida por la aplicación de DPCPX (93 ± 10 % del control, 0.33 ± 0.03 Hz en condición control Vs. 0.31 ± 0.3 Hz durante la hipoxia). La reducción de la frecuencia de los sinápticos poblacionales producida por la hipoxia es replicada por la aplicación de R-PIA (a 55 ± 12 % del control, de 0.55 ± 0.07 Hz en condición control a 0.34 ± 0.08 Hz durante la aplicación de R-PIA, **Figura 20**). Con respecto al efecto de la hipoxia sobre la amplitud de los sinápticos sincrónicos poblacionales, se observó que la hipoxia produjo una reducción significativa de la amplitud a un 85 ± 42 % del control en normoxia (12 ± 3 mV durante la normoxia a 9 ± 2 mV durante la hipoxia, **Figura 20b**).

Por último, se decidió comparar el efecto de la hipoxia y la adenosina sobre los sinápticos poblacionales y espontáneos, por lo que normalizamos su frecuencia y amplitud con respecto al control (**Figura 20b**). Lo que se encontró fue que la hipoxia disminuye en mayor proporción la frecuencia de los sinápticos espontáneos, comparada con la frecuencia de los poblacionales (a 39 ± 11 % del control y a 84 ± 3 % del control, respectivamente), lo cual sugiere que la hipoxia tiene un efecto diferencial sobre distintos componentes de la transmisión excitadora dentro del preBötC (**Figura 20**). Es de hacer notar que estos efectos diferenciales también se observaron en los registros con multielectrodos (**Figuras 14 y 15**). La diferencia en sensibilidad a la hipoxia podría deberse a una expresión diferencial de receptores A_1 de adenosina en las neuronas respiratorias o en las terminales que las inervan. Lo cual no sería extraño dado que se sabe que existen botones sinápticos con distinta

sensibilidad a la activación de receptores A_1 de adenosina, a pesar de ser botones adyacentes (Zhang y Linden, 2009).

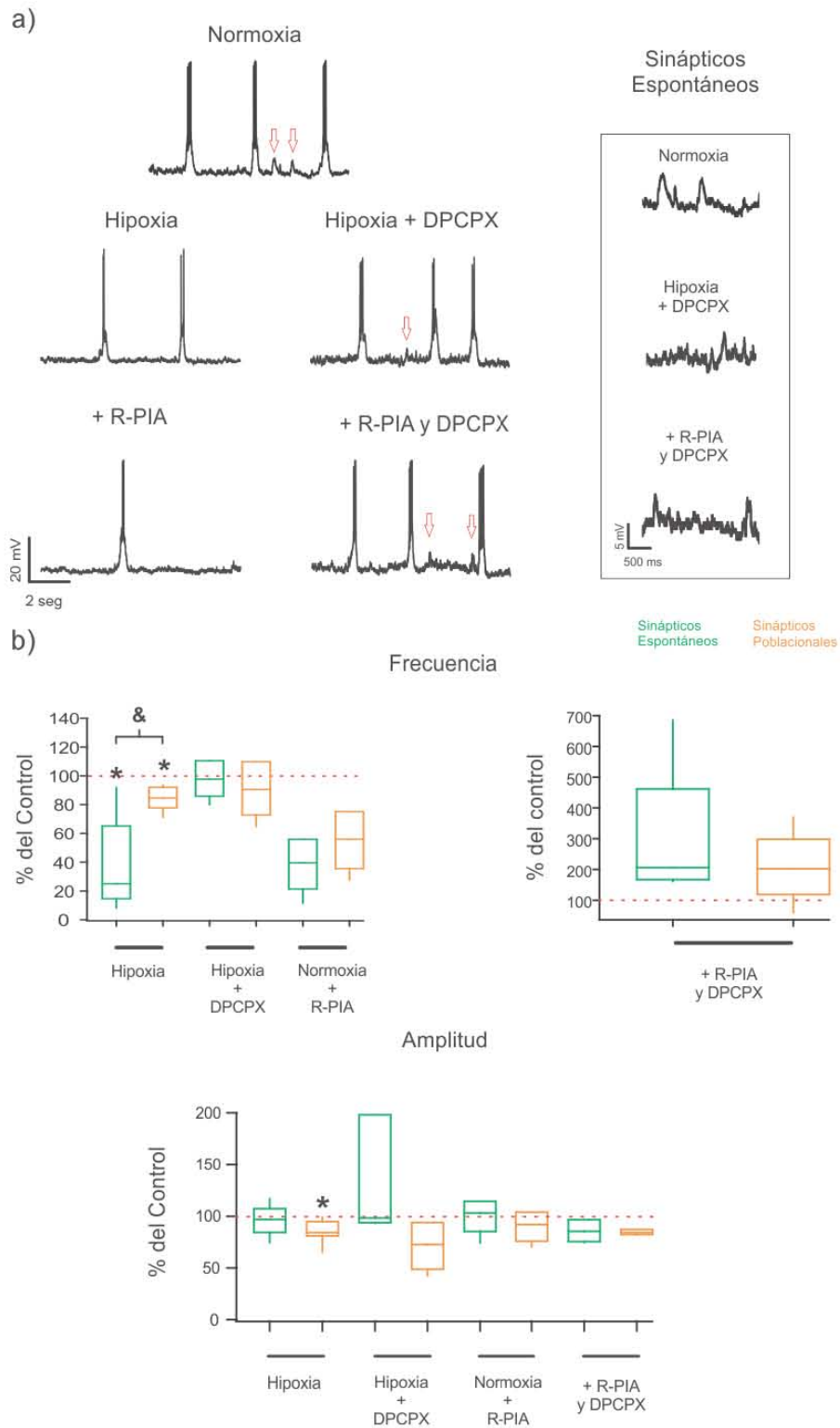


Figura 20. Comparación de los efectos de la hipoxia y de la modulación del receptor de adenosina tipo A_1 sobre los sinápticos espontáneos y poblacionales de neuronas inspiratorias

del preBötC. **a)** Trazos representativos de neuronas inspiratorias del preBötC en las distintas condiciones experimentales. Las flechas rojas señalan sinápticos espontáneos. **b)** Cuantificación de la amplitud y la frecuencia de los sinápticos espontáneos en las condiciones experimentales representadas en a). Los datos se muestran como cajas de Tukey en las que la línea central es la mediana, los extremos son el 25avo y el 75avo percentil y las líneas que se extienden de las cajas son el 5to y el 95avo percentil. La línea roja representa la normoxia. Los datos de los sinápticos poblacionales se representan en naranja y los de los sinápticos espontáneos en verde. * denota una diferencia significativa con respecto al control y & denota una diferencia significativa entre los sinápticos espontáneos y poblacionales durante la hipoxia ($p < 0.05$).

8.-Discusión

En esta tesis, mediante el registro de neuronas del circuito respiratorio con el uso de arreglos de multielectrodos y la técnica de patch-clamp se demostró cuantitativamente que la reconfiguración del circuito respiratorio por la hipoxia involucra una disminución diferencial de la transmisión sináptica excitadora que se refleja en una reducción en la fuerza de la conectividad funcional sin reducir el número de conexiones ni de elementos o neuronas activas, como se pensaba previamente basados en registros unicelulares (St John y Bianchi, 1985; Richter et al., 1991; Ballanyi et al., 1994; England et al., 1995; Ballanyi et al., 1999; St John, 1999; Thoby-Brisson y Ramirez, 2000). Por otra parte, los hallazgos sugieren que la reconfiguración del circuito respiratorio por la hipoxia se debe a la activación presináptica de los receptores de adenosina tipo A_1 . A continuación, se discute la relevancia de estos hallazgos.

Reconfiguración de los ensambles neuronales del preBötC en condiciones de hipoxia

El preBötC es capaz de reconfigurarse para generar distintos ritmos respiratorios dependiendo de la disponibilidad de oxígeno (Lieske et al., 2000). Así, durante condiciones de oxigenación normal (normoxia) este circuito produce la eupnea, mientras que en condiciones de hipoxia en el mismo circuito generan los boqueos (Lieske et al., 2000). La generación de los boqueos involucra un proceso complejo que involucra cambios a nivel unicelular y de circuito (Ramirez et al., 2007; Peña, 2009; Ramirez et al., 2013). A la fecha, la mayoría de los estudios que han tratado de determinar las bases de esta reconfiguración se basan en observaciones a nivel unicelular (Peña-Ortega, 2012; Feldman y Kam, 2015), mientras que la mayoría de los estudios en donde se registran simultáneamente decenas de neuronas se han enfocado al registro de toda la columna respiratoria ventral (Vachon y Duffin, 1978; Segers et al., 1987; Lindsey et al., 1992; England et al., 1995; Morris et al., 1996; Lindsey et al., 1998; Tian y Duffin, 1998; Lindsey et al., 2000; Shan y Cheng, 2000; Shannon et al., 2000; Shen et al., 2002; Li et al., 2003; Duffin, 2004; Segers et al., 2008; Morris et al., 2010; Ott et al., 2011; Ott et al., 2012; Segers et al., 2012; Segers et al., 2015), sin enfocarse en un núcleo respiratorio en específico (en este caso el preBötC). Es por ello, que se decidió estudiar la reconfiguración del preBötC registrando simultáneamente decenas de neuronas respiratorias mediante el uso de multielectrodos en rebanadas de tallo cerebral.

En este trabajo se consideró como elementos respiratorios a las unidades (SUA, por las siglas en inglés para *single unit activity*) y multiunidades (MUA, por las siglas en inglés para *milti-unit activity*) registradas (Bedenbaugh y Gerstein, 1997; Supér y Roelfsema, 2005). Como ya se ha determinado, las multiunidades representan la actividad de varias neuronas y las unidades la actividad de una sola (Bedenbaugh y Gerstein, 1997; Supér y Roelfsema, 2005). Mediante estudios de imagenología, usando moléculas sensibles al Ca^{2+} intracelular, se ha demostrado que el preBötC está constituido por “clusters” de neuronas respiratorias, alrededor de 7, altamente conectadas y coordinadas (Hartelt et al, 2008; Mironov, 2009); por lo que, la actividad multiunitaria (MUA) es el resultado lógico de estos clusters. Sin embargo, es importante mencionar que incluir MUAs dentro del análisis requiere cierta cautela (Bedenbaugh y Gerstein, 1997; Supér y Roelfsema, 2005). Por ejemplo, los cambios en la frecuencia de las neuronas que constituyen una MUA podrían no verse reflejados perfectamente en la tasa de disparo, como sería el caso de una MUA compuesto por neuronas con respuestas opuestas a la hipoxia (Bedenbaugh y Gerstein, 1997; Supér y Roelfsema, 2005).

Además, el origen de las interacciones funcionales entre MUAs, o entre una MUA y una SUA, nunca pueden ser asignados a un par específico de neuronas dentro de las MUA (Bedenbaugh y Gerstein, 1997; Supér y Roelfsema, 2005). De hecho, un cambio en una correlación que implica a una MUA podría reflejar un cambio en la composición de las neuronas que contribuyen a la MUA (Bedenbaugh y Gerstein, 1997; Supér y Roelfsema, 2005). A pesar de estas limitaciones, los análisis de MUAs de neuronas

respiratorias han proporcionado información valiosa en el pasado (Segers et al, 2008; Morris et al, 2010; Lalley y Miffin, 2012) y, por otra parte, los cambios observados en la actividad (frecuencia de disparo y correlaciones) fueron similares cuando se compararon MUAs y SUAs individualmente o en combinación (**Figuras 14-16**).

Cambios en la tasa de disparo de las neuronas respiratorias producidos por la hipoxia

Mediante el uso de registros unicelulares, ya sean intracelulares o con patch clamp, se han observado respuestas heterogéneas del circuito respiratorio durante la hipoxia. En algunos estudios la frecuencia de disparo de las neuronas respiratorias se ve disminuida en condiciones de hipoxia (St John y Bianchi, 1985; Richter et al., 1991; Ballanyi et al., 1994; England et al., 1995; St John, 1999; Thoby-Brisson y Ramirez, 2000), mientras que en otros estudios la frecuencia de disparo aumenta en las mismas condiciones (Richter et al., 1991; Lovering et al., 2006). Incluso hay reportes en los que no se observó ningún cambio en la frecuencia de disparo de algunas neuronas respiratorias en la hipoxia (Lieske et al., 2000; Thoby-Brisson y Ramirez, 2000; Lovering et al., 2006). Estas observaciones, aparentemente contradictorias, se pueden deber a la gran diversidad de propiedades intrínsecas que se ha revelado en la población de neuronas respiratorias con el registros de células únicas (Richter et al., 1991; Ballanyi et al., 1994; Ballanyi et al., 1999; Lieske et al., 2000; Thoby-Brisson y Ramirez, 2000; Peña et al., 2004; Zavala-Tecuapetla et al., 2008; Ramirez-Jarquín et al., 2012). Lo anterior, hace indispensable el registro

simultáneo de múltiples neuronas respiratorias para determinar la probable heterogeneidad en las respuestas a la hipoxia de diferentes poblaciones de neuronas respiratorias de manera simultánea. De hecho, en este trabajo observamos que la hipoxia, ciertamente, produce una respuesta heterogénea en la frecuencia de disparo de las neuronas respiratorias (**Figura 14b**). Así, se pudo observar que el cambio en la frecuencia de disparo de las neuronas del preBötC incluye elementos respiratorios que disminuyen su disparo mientras que otros lo aumentan, como previamente se había observado (St John y Bianchi, 1985; Richter et al., 1991; England et al., 1995; St John, 1999; Lieske et al., 2000; Thoby-Brisson y Ramirez, 2000; Lovering et al., 2006). Sin embargo, es importante concluir que la hipoxia produce, a nivel global, una disminución de la frecuencia de disparo promedio, que es significativa a pesar de esta gran diversidad de efectos. Lo anterior también indica que los resultados contradictorios con respecto al efecto de la hipoxia sobre la frecuencia de disparo de las neuronas respiratorias se debe a que existen poblaciones neuronales diversas en el preBötC, con diferente respuesta a la hipoxia, y no que esta variabilidad de efecto no se debe necesariamente a las diferentes condiciones experimentales que se han utilizado en el pasado. Por otra parte, es importante señalar que en esta tesis no observamos el silenciamiento generalizado de neuronas respiratorias durante la hipoxia que se había reportado con el uso de registros unicelulares (St John y Bianchi, 1985; Richter et al., 1991; Ballanyi et al., 1994; England et al., 1995; Ballanyi et al., 1999; St John, 1999; Thoby-Brisson y Ramirez, 2000) y que ya ha sido incorporado en los modelos de la reconfiguración del preBötC en la hipoxia (Ramirez et al., 2007; Peña, 2009; García et al., 2013). Es probable que el

silenciamiento de neuronas respiratorias reportado en el pasado sea debido a que las neuronas han sido “aisladas sinápticamente”, con un coctel de antagonistas de receptores excitadores e inhibidores (Ramirez et al., 2007; Peña, 2009; García et al., 2013), antes de ser sometidas a la hipoxia. Es altamente probable que no se observe dicho “silenciamiento” debido a que las influencias de la actividad global de la red lo enmascaren. Será necesario hacer el experimento con arreglos de multielectrodos, en condiciones de “aislamiento sináptico”, con el mismo coctel de antagonistas de receptores excitadores e inhibidores (Ramirez et al., 2007; Peña, 2009; García et al., 2013), para saber si esta posibilidad es cierta.

Es importante mencionar que la reconfiguración de los circuitos neuronales involucra cambios heterogéneos en la tasa de disparo de diferentes poblaciones neuronales dentro del mismo circuito (Dupret et al., 2013), que es un reflejo de la incorporación y desincorporación de las neuronas a diferentes ensambles dentro del circuito (Dupret et al., 2013). Por lo que los cambios heterogéneos en la frecuencia de disparo de diferentes neuronas respiratorias durante la hipoxia podrían ser el reflejo la incorporación y desincorporación de neuronas (SUAs) o grupos de neuronas (MUAs) a diferentes ensambles durante la reconfiguración del preBötC por la hipoxia. Otra posibilidad, que no excluye a la previa, es que los cambios heterogéneos en la tasa de disparo durante la reconfiguración se deba a botones sinápticos con sensibilidades distintas a la hipoxia y a la activación del receptor A_1 de adenosina (Zhang y Linden, 2009).

Estos cambios en la frecuencia de disparo se ven reflejados en la dinámica de las interacciones de los elementos o neuronas respiratorias durante la hipoxia, observaciones que se discuten a continuación.

Cambios en la conectividad funcional de los elementos o neuronas respiratorias del preBötC durante la reconfiguración

A pesar de la gran cantidad y diversidad de estudios y modelos sobre la generación de los diferentes ritmos respiratorios por el preBötC, no existen estudios que se enfoquen al efecto de la hipoxia a nivel de la configuración global del circuito. Por ejemplo, a pesar de que los cambios en la magnitud de las interacciones entre los elementos o neuronas definen la dinámica de un circuito, hasta antes de este trabajo no se contaba con información sobre los cambios en la magnitud o fuerza de las interacciones de las neuronas del preBötC durante la reconfiguración por la hipoxia.

En esta tesis, mediante el estudio de la conectividad funcional de los elementos o neuronas respiratorias a través de correlogramas cruzados, surge la pregunta de si la reconfiguración del preBötC involucra cambios en el número de elementos o neuronas activas, o cambios en el número o en la magnitud de las interacciones funcionales. Es importante destacar que se evaluó la configuración red respiratoria incluyendo las interacciones que se producen en una ventana de 5 ms (Perkel et al., 1967). Lo cual puede involucrar conexiones directas entre 2 neuronas o que ambas neuronas compartan una entrada sináptica común (Perkel et al, 1967; Kashiwagi et al.,

1993; Onimaru et al, 1993; Li et al, 2003; Ott et al, 2011) o bien que se encuentren conectadas eléctricamente a través de uniones comunicantes (Takahashi y Sakurai, 2009).

Lo que se encontró, fue nuevamente una respuesta heterogénea en la magnitud de los cambios de las interacciones funcionales entre los elementos respiratorios durante la hipoxia (**Figura 15 b y c**). En resumen se encontró que el 39.8% de las interacciones funcionales entre elementos respiratorios aumentan su fuerza de interacción, mientras que el resto (60.2%) la disminuye, **Figura 16a**). Esto indica que la reconfiguración del preBötC durante la hipoxia involucra cambios en el acoplamiento funcional de los elementos respiratorios que, en general, lleva a una reducción en la interacciones funcionales dentro del circuito. Es importante resaltar que este fenómeno de “desconexión” de la red en condiciones de hipoxia, ocurre en condiciones donde no se observan cambios en el número de elementos activos o en el número de interacciones.

Los cambios en la fuerza de las interacciones funcionales durante la reconfiguración del preBötC por la hipoxia podrían estar reflejando un “ajuste dinámico en la fuerza sináptica para promover la estabilidad del circuito”. Este proceso es conocido como plasticidad homeostática (Turrigiano y Nelson, 2004), la cual es una respuesta que permite a los circuitos neuronales mantener niveles de excitabilidad y conectividad en límites fisiológicos en respuesta a cambios en las condiciones del entorno (Turrigiano et al., 1998). La plasticidad homeostática se ha observado en el control de las tasas de disparo tanto de neuronas corticales de mamífero (Turrigiano et al., 1998) como en

neuronas del ganglio somatogástrico de los crustáceos (Turrigiano et al., 1994). El control de las tasas de disparo se realiza mediante una regulación de las interacciones excitadoras entre las neuronas (Turrigiano et al., 1998), sobre todo en la respuesta de neuronas osciladoras (“oscillatory bursting neurons”) (Marder et al., 1996), como es el caso de algunas de las neuronas del preBötC (Smith et al., 1991).

En resumen, mediante las observaciones sobre la conectividad funcional del preBötC durante la hipoxia, se aporta evidencia que indica que la reconfiguración del preBötC durante la hipoxia involucra cambios dinámicos de la conectividad entre los elementos respiratorios y excluye al silenciamiento de elementos respiratorios como un factor fundamental para la reconfiguración de este circuito en la hipoxia (**Figura 21**), como previamente se propuso basándose en experimentos unicelulares (St John y Bianchi, 1985; Richter et al., 1991; Ballanyi et al., 1994; England et al., 1995; Ballanyi et al., 1999; St John, 1999; Thoby-Brisson y Ramirez, 2000). Se propone que este cambio en la fuerza de las interacciones funcionales entre elementos de circuito respiratorio en la hipoxia podría un cambio plástico del circuito para mantener la estabilidad del mismo y así generar los boqueos, los cuales representan la última respuesta del organismo a la hipoxia (Fewell et al., 2000; Gozal et al., 2002). Se requiere de experimentos adicionales, y muy probablemente de modelado computacional, para reconocer la naturaleza de las interacciones funcionales que están siendo moduladas diferencialmente en la hipoxia.

HIPOXIA

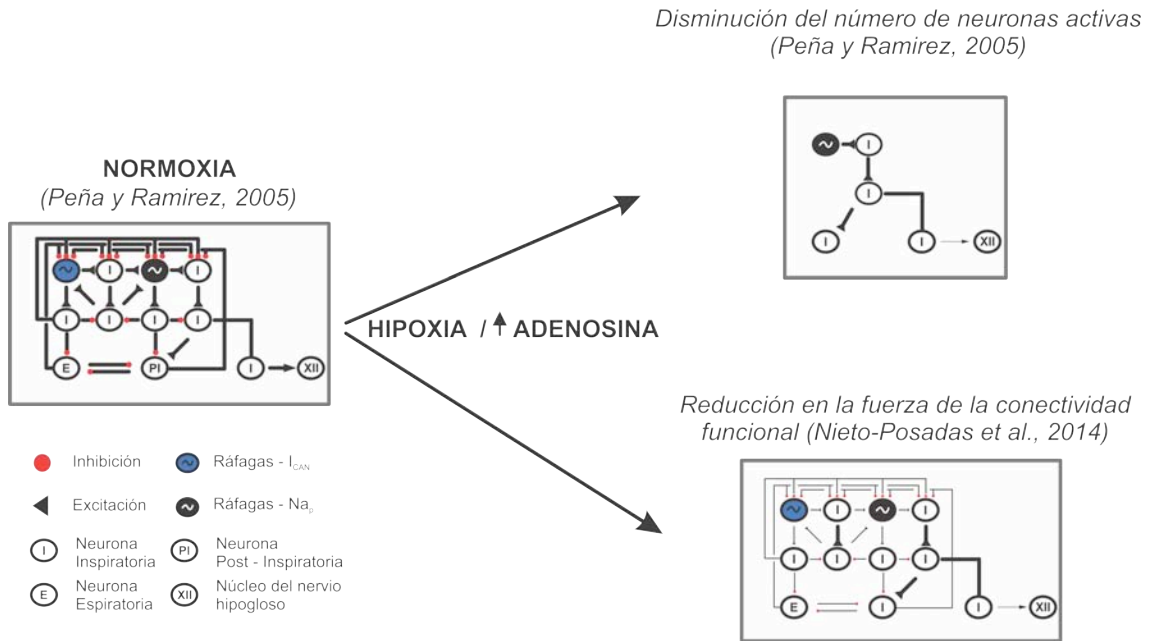


Figura 21.- Modelos de las conformaciones de la red respiratoria durante la normoxia y la hipoxia. La red respiratoria contiene un grupo de neuronas inspiratorias (I en los círculos negros) con propiedades marcapasos heterogéneas que están conectadas a través de conexiones excitadoras. Dentro del grupo de neuronas I, hay un grupo de neuronas marcapasos que son moduladas por la entrada inhibitoria de neuronas inspiratorias (I), post-inspiratorias (PI) y espiratorias (E). Los modelos previos al trabajo aquí presentado, que se basaron en registros unicelulares, proponían que la reconfiguración del circuito respiratorio en condiciones de hipoxia involucraba un silenciamiento de las neuronas respiratorias (Peña y Ramirez, 2005). Sin embargo, mediante el registro simultáneo de decenas de neuronas respiratorias se demostró, en este trabajo, que la reconfiguración del circuito respiratorio por la hipoxia involucra cambios en la fuerza de la conectividad funcional sin reducir el número de conexiones ni de elementos o neuronas activas (Nieto-Posadas *et al.*, 2014). Panel de normoxia como el panel superior de hipoxia modificados de Peña y Ramirez, 2005; panel inferior de hipoxia modificado de Peña y Ramirez, 2005 actualizado con datos de Nieto-Posadas *et al.*, 2014.

Disminución diferencial de la transmisión sináptica del preBötC en condiciones de hipoxia

Como se mencionó anteriormente, la hipoxia produce una depresión de la transmisión sináptica en el SNC, tanto glutamatérgica como GABAérgica, a través del incremento en los niveles de adenosina y la subsecuente activación de sus receptores tipo A₁ (Coelho et al., 2000; Martin et al., 2007). Con respecto al preBötC, se sabe que este circuito es capaz de tolerar largos periodos de hipoxia a diferencia de otras estructuras del SNC (Ballanyi et al., 1994; Luhmann y Kral, 1997; Coelho et al., 2000; Lieske et al., 2000; Rivera-Angulo y Peña-Ortega, 2014).

En cuanto a la modulación adenosinérgica del preBötC, se sabe que la adenosina disminuye la transmisión sináptica GABAérgica en mayor proporción que la transmisión sináptica glutamatérgica (Schmidt et al., 1995; Lieske et al., 2000; Vandam et al., 2008). Sin embargo, aún se desconoce cuál es la razón de la mayor resistencia de la transmisión glutamatérgica a la hipoxia en este circuito. Por ello se decidió estudiar el papel de la hipoxia sobre la transmisión excitadora de los sinápticos espontáneos y poblacionales. Nuestros datos muestran que la hipoxia produce una disminución en la frecuencia de los sinápticos poblacionales, como previamente se ha descrito (Herlenius y Lagercrantz, 1999), pero en una magnitud menor que la disminución que produce de los sinápticos espontáneos (**Figura 20**). Interesantemente, y en concordancia con los datos obtenidos con los arreglos de multielectrodos, la depresión de la frecuencia de los sinápticos espontáneos en la hipoxia es

también diversa, pues mientras hay algunas neuronas en las que se abole la presencia de sinápticos espontáneos glutamatérgicos en la hipoxia (alrededor del 50%), mientras que hay otras neuronas donde este efecto no es tan marcado. De hecho, el efecto de la hipoxia sobre los sinápticos espontáneos en este último grupo de neuronas respiratorias coincide con el efecto de la hipoxia sobre los sinápticos poblacionales (**Figura 20**), en los cuales el efecto es mucho menor. Todo esto sugiere que dentro del preBötC pueden existir poblaciones de neuronas con diferente sensibilidad y respuesta a la hipoxia, hipótesis que es corroborada con los registros con multielectrodos en donde hay elementos o neuronas respiratorias que aumentan tasa de disparo mientras que otras la disminuyen en respuesta a la hipoxia. O bien interacciones funcionales que aumentan, mientras que otras disminuyen en respuesta a la hipoxia. Esto pudiera deberse a que hay botones sinápticos con sensibilidades distintas a la hipoxia y a la activación de receptores de adenosina. Esto no sería extraño dado que se sabe que los botones sinápticos de un axón tienen probabilidades de liberación distinta (Koester y Sakmann, 2000; Koester y Johnston, 2005) y distinta sensibilidad a la activación de receptores A_1 de adenosina, a pesar de ser botones adyacentes (Zhang y Linden, 2009).

Por último, en esta tesis se analizó si los cambios sinápticos que ocurren durante la reconfiguración del circuito respiratorio durante la hipoxia involucran cambios a nivel pre- o post- sinapsis. Por ello se midió la amplitud y frecuencia de los sinápticos espontáneos, dado que la teoría cuántica de liberación de neurotransmisores indica que los cambios en la amplitud de los sinápticos espontáneos ante una condición experimental se deben a cambios

postsinápticos, mientras que cambios en la frecuencia de los sinápticos espontáneos ante una condición experimental indican cambios presinápticos inducidos por esa condición experimental (Del Castillo y Katz, 1954; Redman, 1990; Stevens, 1993). Lo que se encontró fue que tanto la hipoxia como la aplicación de un agonista del receptor de adenosina tipo A_1 producen una disminución en la frecuencia de los sinápticos espontáneos sin modificación de la amplitud, lo cual indica que el efecto que se observó durante la hipoxia y por la aplicación del agonista del receptor de adenosina tipo A_1 se deben a efectos presinápticos.

Consideraciones finales

Desde la identificación del preBötC como el centro generador de la inspiración (Smith et al., 1991) se han propuesto una gran variedad de modelos para explicar la generación de la actividad del preBötC (Ogilvie et al., 1992; Rybak et al., 1997a, b, c; Rybak et al., 2007; Smith et al., 2007; Rybak et al., 2008; Rubin et al., 2009; Molkov et al., 2010) basados mayoritariamente en registros de neuronas individuales (Feldman y Kam, 2015). Sin embargo, la generación de modelos basados en información obtenida de registros de neuronas individuales tiene sus limitaciones. El preBötC carece de una estructura anatómica definida (Feldman et al., 2003), y no existe una buena correlación entre la morfología de las neuronas del preBötC con sus propiedades eléctricas, lo que impide diferenciar diferentes clases de neuronas respiratorias con estos criterios (Zavala-Tecuapetla et al., 2014). Además, hasta la fecha, no se han identificado marcadores moleculares específicos que ayuden a identificar diferentes poblaciones neuronales funcionalmente distintas dentro

del preBötC (Feldman y Kam, 2015). Por ejemplo, en los últimos años se ha utilizado a la proteína Dbx1 (por las siglas en inglés para *developing brain homeobox 1*) como un marcador de neuronas respiratorias (Bouvier et al., 2010; Gray et al., 2010). Sin embargo, aún las neuronas que expresan Dbx1 se pueden agrupar en diferentes poblaciones con propiedades intrínsecas y sinápticas diversas (Picardo et al., 2013; Wang et al., 2014). Así, existen las neuronas Dbx1⁺ tipo 1, de las cuales algunas tienen propiedades de neuronas marcapasos (Picardo et al., 2013), y neuronas Dbx1⁺ tipo 2, algunas de las cuales tienen actividad premotora (Wang et al., 2014). En vista de esta carencia de elementos anatómicos para generar un modelo del preBötC, muchos modelos han recurrido a la clasificación de las neuronas respiratorias basados en los patrones de disparo de las neuronas individuales con respecto a la actividad poblacional (Ogilvie et al., 1992; Rybak et al., 1997a,b,c; Rybak et al., 2007; Smith et al., 2007; Rybak et al., 2008; Rubin et al., 2009a, b; Molkov et al., 2010). Sin embargo, esta clasificación neuronal basada exclusivamente en las propiedades electrofisiológicas no es suficiente (Brookings et al., 2012) dado que se sabe que la actividad de las neuronas respiratorias varía de ciclo a ciclo (Carroll y Ramirez, 2013; Carroll et al., 2013), lo cual hace indispensable el registro simultáneo de múltiples neuronas respiratorias. Por ello, se considera que los modelos de la generación del ritmo respiratorio se verán enriquecidos con la incorporación de estudios como el aquí presentado, en donde se registren simultáneamente múltiples neuronas respiratorias y se incorpore sus interacciones dinámicas en los modelos de generación de la respiración en distintas condiciones experimentales o fisiopatológicas.

9.-Conclusiones

- La respuesta del preBötC a la hipoxia es heterogénea, mientras unas neuronas aumentan su tasa de disparo otras la disminuyen. Siendo la disminución de la frecuencia el efecto global.
- La reconfiguración del preBötC se debe principalmente a una disminución en la fuerza de las interacciones entre las neuronas de este circuito.
- La hipoxia disminuye en mayor proporción a los sinápticos espontáneos que sobre los poblacionales.
- El efecto de la hipoxia sobre el preBötC se debe principalmente a una depresión de la transmisión sináptica, de origen presináptico, secundaria a la activación del receptor de adenosina tipo A₁.

Bibliografía:

Alheid GF, McCrimmon DR (2008) The chemical neuroanatomy of breathing.

Respiratory physiology & neurobiology 164:3-11.

Alheid GF, Milsom WK, McCrimmon DR (2004) Pontine influences on breathing: an overview. Respiratory physiology & neurobiology 143:105-

114.

- Alheid GF, Jiao W, McCrimmon DR (2011) Caudal nuclei of the rat nucleus of the solitary tract differentially innervate respiratory compartments within the ventrolateral medulla. *Neuroscience* 190:207-227.
- Aoi S, Katayama D, Fujiki S, Tomita N, Funato T, Yamashita T, Senda K, Tsuchiya K (2013) A stability-based mechanism for hysteresis in the walk-trot transition in quadruped locomotion. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 10:20120908.
- Ballanyi K, Volker A, Richter DW (1994) Anoxia induced functional inactivation of neonatal respiratory neurones in vitro. *Neuroreport* 6:165-168.
- Ballanyi K, Onimaru H, Homma I (1999) Respiratory network function in the isolated brainstem-spinal cord of newborn rats. *Progress in neurobiology* 59:583-634.
- Barros RC, Branco LG, Carnio EC (2006) Respiratory and body temperature modulation by adenosine A1 receptors in the anteroventral preoptic region during normoxia and hypoxia. *Respiratory physiology & neurobiology* 153:115-125.
- Bartlett D, Jr. (1971) Origin and regulation of spontaneous deep breaths. *Respiration physiology* 12:230-238.
- Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W, Bresnahan JC, Ha BK, Von Zastrow M, Beattie MS, Malenka RC (2002) Control of synaptic strength by glial TNFalpha. *Science* 295:2282-2285.
- Bedenbaugh P, Gerstein GL (1997) Multiunit normalized cross correlation differs from the average single-unit normalized correlation. *Neural Computation* 9:1265-1275.

- Bellingham MC, Berger AJ (1994) Adenosine suppresses excitatory glutamatergic inputs to rat hypoglossal motoneurons in vitro. *Neuroscience letters* 177:143-146.
- Bendixen HH, Smith GM, Mead J (1964) Pattern of Ventilation in Young Adults. *Journal of Applied Physiology* 19:195-198.
- Bianchi AL, Denavit-Saubie M, Champagnat J (1995) Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiological reviews* 75:1-45.
- Bissonnette JM, Hohimer AR, Chao CR, Knopp SJ, Notoroberto NF (1990) Theophylline stimulates fetal breathing movements during hypoxia. *Pediatric research* 28:83-86.
- Botros SM, Bruce EN (1990) Neural network implementation of a three-phase model of respiratory rhythm generation. *Biological cybernetics* 63:143-153.
- Bouvier J, Thoby-Brisson M, Renier N, Dubreuil V, Ericson J, Champagnat J, Pierani A, Chedotal A, Fortin G (2010) Hindbrain interneurons and axon guidance signaling critical for breathing. *Nature neuroscience* 13:1066-1074.
- Bradley GW, von Euler C, Marttila I, Roos B (1975) A model of the central and reflex inhibition of inspiration in the cat. *Biological cybernetics* 19:105-116.
- Brookings T, Grashow R, Marder E (2012) Statistics of neuronal identification with open- and closed-loop measures of intrinsic excitability. *Frontiers in neural circuits* 6:19.

- Bureau MA, Zinman R, Foulon P, Begin R (1984) Diphasic ventilatory response to hypoxia in newborn lambs. *Journal of Applied Physiology: respiratory, environmental and exercise physiology* 56:84-90.
- Burke PG, Abbott SB, McMullan S, Goodchild AK, Pilowsky PM (2010) Somatostatin selectively ablates post-inspiratory activity after injection into the Botzinger complex. *Neuroscience* 167:528-539.
- Butera RJ, Jr., Rinzel J, Smith JC (1999a) Models of respiratory rhythm generation in the pre-Botzinger complex. I. Bursting pacemaker neurons. *Journal of neurophysiology* 82:382-397.
- Butera RJ, Jr., Rinzel J, Smith JC (1999b) Models of respiratory rhythm generation in the pre-Botzinger complex. II. Populations Of coupled pacemaker neurons. *Journal of neurophysiology* 82:398-415.
- Buzsaki G, Anastassiou CA, Koch C (2012) The origin of extracellular fields and currents-EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nature reviews Neuroscience* 13:407-420.
- Canhao P, de Mendonca A, Ribeiro JA (1994) 1,3-Dipropyl-8-cyclopentylxanthine attenuates the NMDA response to hypoxia in the rat hippocampus. *Brain research* 661:265-273.
- Carroll MS, Ramirez JM (2013) Cycle-by-cycle assembly of respiratory network activity is dynamic and stochastic. *Journal of neurophysiology* 109:296-305.
- Carroll MS, Viemari JC, Ramirez JM (2013) Patterns of inspiratory phase-dependent activity in the in vitro respiratory network. *Journal of neurophysiology* 109:285-295.

- Centonze D, Saulle E, Pisani A, Bernardi G, Calabresi P (2001) Adenosine-mediated inhibition of striatal GABAergic synaptic transmission during in vitro ischaemia. *Brain* 124:1855-1865.
- Chen JF (2014) Adenosine receptor control of cognition in normal and disease. *International review of neurobiology* 119:257-307.
- Chen JF, Lee CF, Chern Y (2014) Adenosine receptor neurobiology: overview. *International review of neurobiology* 119:1-49.
- Cherniack NS, von Euler C, Glogowska M, Homma I (1981) Characteristics and rate of occurrence of spontaneous and provoked augmented breaths. *Acta physiologica Scandinavica* 111:349-360.
- Chung HJ, Ge WP, Qian X, Wiser O, Jan YN, Jan LY (2009) G protein-activated inwardly rectifying potassium channels mediate depotentiation of long-term potentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:635-640.
- Coelho JE, de Mendonca A, Ribeiro JA (2000) Presynaptic inhibitory receptors mediate the depression of synaptic transmission upon hypoxia in rat hippocampal slices. *Brain research* 869:158-165.
- Connelly CA, Dobbins EG, Feldman JL (1992) Pre-Botzinger complex in cats: respiratory neuronal discharge patterns. *Brain research* 590:337-340.
- Constantinidis C, Franowicz MN, Goldman-Rakic PS (2001) Coding specificity in cortical microcircuits: a multiple-electrode analysis of primate prefrontal cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:3646-3655.

- Dale N, Pearson T, Frenguelli BG (2000) Direct measurement of adenosine release during hypoxia in the CA1 region of the rat hippocampal slice. *The Journal of physiology* 526 Pt 1:143-155.
- de Mendonca A, Sebastiao AM, Ribeiro JA (1995) Inhibition of NMDA receptor-mediated currents in isolated rat hippocampal neurones by adenosine A1 receptor activation. *Neuroreport* 6:1097-1100.
- Del Castillo J, Katz B (1954) Quantal components of the end-plate potential. *The Journal of physiology* 124:560-573.
- Del Negro CA, Morgado-Valle C, Feldman JL (2002a) Respiratory rhythm: an emergent network property? *Neuron* 34:821-830.
- Del Negro CA, Johnson SM, Butera RJ, Smith JC (2001) Models of respiratory rhythm generation in the pre-Botzinger complex. III. Experimental tests of model predictions. *Journal of neurophysiology* 86:59-74.
- Del Negro CA, Koshiya N, Butera RJ, Jr., Smith JC (2002b) Persistent sodium current, membrane properties and bursting behavior of pre-botzinger complex inspiratory neurons in vitro. *Journal of neurophysiology* 88:2242-2250.
- Del Negro CA, Hayes JA, Pace RW, Brush BR, Teruyama R, Feldman JL (2010) Synaptically activated burst-generating conductances may underlie a group-pacemaker mechanism for respiratory rhythm generation in mammals. *Progress in brain research* 187:111-136.
- 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. *The Journal of*

neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 25:446-453.

Depuy SD, Kanbar R, Coates MB, Stornetta RL, Guyenet PG (2011) Control of breathing by raphe obscurus serotonergic neurons in mice. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 31:1981-1990.

Deshpande SB, Jha A (2004) Aglycemia and ischemia depress monosynaptic and polysynaptic reflexes in neonatal rat spinal cord in vitro by involving different types of 5-hydroxytryptamine receptors. Neuroscience letters 372:167-172.

Dias RB, Rombo DM, Ribeiro JA, Henley JM, Sebastiao AM (2013) Adenosine: setting the stage for plasticity. Trends in neurosciences 36:248-257.

Diogenes MJ, Fernandes CC, Sebastiao AM, Ribeiro JA (2004) Activation of adenosine A2A receptor facilitates brain-derived neurotrophic factor modulation of synaptic transmission in hippocampal slices. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 24:2905-2913.

Dixon AK, Gubitza AK, Sirinathsinghji DJ, Richardson PJ, Freeman TC (1996) Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. British journal of pharmacology 118:1461-1468.

Dubreuil V, Barhanin J, Golidis C, Brunet JF (2009) Breathing with phox2b. Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences 364:2477-2483.

- Duffin J (2004) Functional organization of respiratory neurones: a brief review of current questions and speculations. *Experimental physiology* 89:517-529.
- Dunmyre JR, Del Negro CA, Rubin JE (2011) Interactions of persistent sodium and calcium-activated nonspecific cationic currents yield dynamically distinct bursting regimes in a model of respiratory neurons. *Journal of computational neuroscience* 31:305-328.
- Dunwiddie TV, Masino SA (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annual review of neuroscience* 24:31-55.
- Dupret D, O'Neill J, Csicsvari J (2013) Dynamic reconfiguration of hippocampal interneuron circuits during spatial learning. *Neuron* 78:166-180.
- Eldridge FL, Millhorn DE, Kiley JP (1985) Antagonism by theophylline of respiratory inhibition induced by adenosine. *Journal of applied physiology* 59:1428-1433.
- England SJ, Melton JE, Douse MA, Duffin J (1995) Activity of respiratory neurons during hypoxia in the chemodenervated cat. *Journal of applied physiology* 78:856-861.
- Eugenin J, Nicholls JG, Cohen LB, Muller KJ (2006) Optical recording from respiratory pattern generator of fetal mouse brainstem reveals a distributed network. *Neuroscience* 137:1221-1227.
- Ezure K (1990) Synaptic connections between medullary respiratory neurons and considerations on the genesis of respiratory rhythm. *Progress in neurobiology* 35:429-450.

- Feldman JL, Smith JC (1989) Cellular mechanisms underlying modulation of breathing pattern in mammals. *Annals of the New York Academy of Sciences* 563:114-130.
- Feldman JL, Gray PA (2000) Sighs and gasps in a dish. *Nature neuroscience* 3:531-532.
- Feldman JL, Del Negro CA (2006) Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. *Nature reviews Neuroscience* 7:232-242.
- Feldman JL, Kam K (2015) Facing the challenge of mammalian neural microcircuits: taking a few breaths may help. *The Journal of physiology* 593:3-23.
- Feldman JL, Smith JC, Liu G (1991) Respiratory pattern generation in mammals: in vitro en bloc analyses. *Current opinion in neurobiology* 1:590-594.
- Feldman JL, Mitchell GS, Nattie EE (2003) Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. *Annual review of neuroscience* 26:239-266.
- Feldman JL, Del Negro CA, Gray PA (2013) Understanding the rhythm of breathing: so near, yet so far. *Annual review of physiology* 75:423-452.
- Fewell JE, Zhang C, Gillis AM (2007) Influence of adenosine A(1)-receptor blockade and vagotomy on the gasping and heart rate response to hypoxia in rats during early postnatal maturation. *Journal of Applied Physiology* 103:1234-1241.
- Fewell JE, Smith FG, Ng VK, Wong VH, Wang Y (2000) Postnatal age influences the ability of rats to autoresuscitate from hypoxic-induced apnea. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 279:R39-46.

- Fowler JC, Gervitz LM, Hamilton ME, Walker JA (2003) Systemic hypoxia and the depression of synaptic transmission in rat hippocampus after carotid artery occlusion. *The Journal of physiology* 550:961-972.
- Fox SI, McGraw-Hill Companies. (2011) *Human physiology*, 12th Edition. New York: McGraw-Hill.
- Fredholm BB, Proctor W, Van der Ploeg I, Dunwiddie TV (1989) In vivo pertussis toxin treatment attenuates some, but not all, adenosine A1 effects in slices of the rat hippocampus. *European journal of pharmacology* 172:249-262.
- Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J (2001) International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacological Reviews* 53:527-552.
- Frenguelli BG, Llaudet E, Dale N (2003) High-resolution real-time recording with microelectrode biosensors reveals novel aspects of adenosine release during hypoxia in rat hippocampal slices. *Journal of neurochemistry* 86:1506-1515.
- Funk GD, Feldman JL (1995) Generation of respiratory rhythm and pattern in mammals: insights from developmental studies. *Current opinion in neurobiology* 5:778-785.
- Funke F, Dutschmann M, Muller M (2007) Imaging of respiratory-related population activity with single-cell resolution. *American journal of physiology Cell physiology* 292:C508-516.
- Galan RF, Dick TE, Baekey DM (2010) Analysis and modeling of ensemble recordings from respiratory pre-motor neurons indicate changes in

- functional network architecture after acute hypoxia. *Frontiers in Computational Neuroscience* 4.
- Garcia AJ, 3rd, Rotem-Kohavi N, Doi A, Ramirez JM (2013) Post-hypoxic recovery of respiratory rhythm generation is gender dependent. *PloS one* 8:e60695.
- Garduno J, Galindo-Charles L, Jimenez-Rodriguez J, Galarraga E, Tapia D, Mihailescu S, Hernández-Lopez S (2012) Presynaptic alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors increase glutamate release and serotonin neuron excitability in the dorsal raphe nucleus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:15148-15157.
- Gerevich Z, Wirkner K, Illes P (2002) Adenosine A2A receptors inhibit the N-methyl-D-aspartate component of excitatory synaptic currents in rat striatal neurons. *European journal of pharmacology* 451:161-164.
- Gervitz LM, Davies DG, Omidvar K, Fowler JC (2003) The effect of acute hypoxemia and hypotension on adenosine-mediated depression of evoked hippocampal synaptic transmission. *Experimental neurology* 182:507-517.
- Gervitz LM, Lutherer LO, Davies DG, Pirch JH, Fowler JC (2001) Adenosine induces initial hypoxic-ischemic depression of synaptic transmission in the rat hippocampus in vivo. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 280:R639-645.
- Gomes CV, Kaster MP, Tome AR, Agostinho PM, Cunha RA (2011) Adenosine receptors and brain diseases: neuroprotection and neurodegeneration. *Biochimica et biophysica acta* 1808:1380-1399.

- Gourevitch B, Mellen N (2014) The preBotzinger complex as a hub for network activity along the ventral respiratory column in the neonate rat. *Neuroimage* 98:460-74.
- Gozal D, Gozal E, Reeves SR, Lipton AJ (2002) Gasping and autoresuscitation in the developing rat: effect of antecedent intermittent hypoxia. *Journal of Applied Physiology* 92:1141-1144.
- Gray PA, Janczewski WA, Mellen N, McCrimmon DR, Feldman JL (2001) Normal breathing requires preBotzinger complex neurokinin-1 receptor-expressing neurons. *Nature neuroscience* 4:927-930.
- Gray PA, Hayes JA, Ling GY, Llona I, Tupal S, Picardo MC, Ross SE, Hirata T, Corbin JG, Eugenin J, Del Negro CA (2010) Developmental origin of preBotzinger complex respiratory neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:14883-14895.
- Greer JJ, Smith JC, Feldman JL (1991) Role of excitatory amino acids in the generation and transmission of respiratory drive in neonatal rat. *The Journal of physiology* 437:727-749.
- Gribkoff VK, Bauman LA, VanderMaelen CP (1990) The adenosine antagonist 8-cyclopentyltheophylline reduces the depression of hippocampal neuronal responses during hypoxia. *Brain research* 512:353-357.
- Grienberger C, Konnerth A (2012) Imaging calcium in neurons. *Neuron* 73:862-885.
- Gubitz AK, Widdowson L, Kurokawa M, Kirkpatrick KA, Richardson PJ (1996) Dual signalling by the adenosine A2a receptor involves activation of both N- and P-type calcium channels by different G proteins and protein

- kinases in the same striatal nerve terminals. *Journal of neurochemistry* 67:374-381.
- Gundlfinger A, Bischofberger J, Jochenning FW, Torvinen M, Schmitz D, Breustedt J (2007) Adenosine modulates transmission at the hippocampal mossy fibre synapse via direct inhibition of presynaptic calcium channels. *The Journal of physiology* 582:263-277.
- Haddad GG, Mellins RB (1984) Hypoxia and respiratory control in early life. *Annual review of physiology* 46:629-643.
- Hall JE, Guyton AC (2011) *Guyton and Hall textbook of medical physiology*, 12th Edition. Philadelphia, Pa.: Saunders/Elsevier.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 391:85-100.
- Hammond C, Crepel V, Gozlan H, Ben-Ari Y (1994) Anoxic LTP sheds light on the multiple facets of NMDA receptors. *Trends in neurosciences* 17:497-503.
- Hartelt N, Skorova E, Manzke T, Suhr M, Mironova L, Kugler S, Mironov SL (2008) Imaging of respiratory network topology in living brainstem slices. *Molecular and Cellular Neuroscience* 37:425-431.
- Hasuo H, Shoji S, Gallagher JP, Akasu T (1992) Adenosine inhibits the synaptic potentials in rat septal nucleus neurons mediated through pre- and postsynaptic A1-adenosine receptors. *Neuroscience research* 13:281-299.

- Hayes JA, Del Negro CA (2007) Neurokinin receptor-expressing pre-botzinger complex neurons in neonatal mice studied in vitro. *Journal of neurophysiology* 97:4215-4224.
- Heimer G, Bar-Gad I, Goldberg JA, Bergman H (2002) Dopamine replacement therapy reverses abnormal synchronization of pallidal neurons in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine primate model of parkinsonism. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:7850-7855.
- Herlenius E, Lagercrantz H (1999) Adenosinergic modulation of respiratory neurones in the neonatal rat brainstem in vitro. *The Journal of physiology* 518 (Pt 1):159-172.
- Herlenius E, Lagercrantz H, Yamamoto Y (1997) Adenosine modulates inspiratory neurons and the respiratory pattern in the brainstem of neonatal rats. *Pediatric research* 42:46-53.
- Hernández-Vazquez F, Chavarria K, Garduno J, Hernández-Lopez S, Mihailescu SP (2014) Nicotine increases GABAergic input on rat dorsal raphe serotonergic neurons through alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor. *Journal of neurophysiology* 112(12):3154-63.
- Heurteaux C, Lauritzen I, Widmann C, Lazdunski M (1995) Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP-sensitive K⁺ channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:4666-4670.
- Hilaire G, Pasaro R (2003) Genesis and control of the respiratory rhythm in adult mammals. *News in physiological sciences : an international journal*

- of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society 18:23-28.
- Hilaire G, Monteau R, Bianchi AL (1984) A cross-correlation study of interactions among respiratory neurons of dorsal, ventral and retrofacial groups in cat medulla. *Brain research* 302:19-31.
- Hilaire G, Monteau R, Gauthier P, Rega P, Morin D (1990) Functional significance of the dorsal respiratory group in adult and newborn rats: in vivo and in vitro studies. *Neuroscience letters* 111:133-138.
- Hille B (2001) *Ion channels of excitable membranes*, 3rd Edition. Sunderland, Mass.: Sinauer.
- Hodges MR, Wehner M, Aungst J, Smith JC, Richerson GB (2009) Transgenic mice lacking serotonin neurons have severe apnea and high mortality during development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:10341-10349.
- Hooper SL, Marder E (1987) Modulation of the lobster pyloric rhythm by the peptide proctolin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 7:2097-2112.
- Hopfield JJ (1982) Neural networks and physical systems with emergent collective computational abilities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79:2554-2558.
- Jacobson KA, Gao ZG (2006) Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nature Review Drug Discovery* 5:247-264.
- Jha A, Deshpande SB (2003) Aglycemia and ischemia depress spinal synaptic transmission via inhibitory systems involving NMDA receptors. *European journal of pharmacology* 481:189-196.

- Johnson SM, Koshiya N, Smith JC (2001) Isolation of the kernel for respiratory rhythm generation in a novel preparation: the pre-Botzinger complex "island". *Journal of neurophysiology* 85:1772-1776.
- Johnson SM, Smith JC, Funk GD, Feldman JL (1994) Pacemaker behavior of respiratory neurons in medullary slices from neonatal rat. *Journal of neurophysiology* 72:2598-2608.
- Jordan D (2001) Central nervous pathways and control of the airways. *Respiration physiology* 125:67-81.
- Kashiwagi M, Onimaru H, Homma I (1993) Correlation analysis of respiratory neuron activity in ventrolateral medulla of brainstem-spinal cord preparation isolated from newborn rat. *Experimental brain research* 95:277-290.
- Katchman AN, Hershkowitz N (1993a) Adenosine antagonists prevent hypoxia-induced depression of excitatory but not inhibitory synaptic currents. *Neuroscience letters* 159:123-126.
- Katchman AN, Hershkowitz N (1993b) Early anoxia-induced vesicular glutamate release results from mobilization of calcium from intracellular stores. *Journal of neurophysiology* 70:1-7.
- Kawai A, Okada Y, Muckenhoff K, Scheid P (1995) Theophylline and hypoxic ventilatory response in the rat isolated brainstem-spinal cord. *Respiration physiology* 100:25-32.
- Kirkwood PA (1979) On the use and interpretation of cross-correlations measurements in the mammalian central nervous system. *Journal of neuroscience methods* 1:107-132.

- Kirsch GE, Codina J, Birnbaumer L, Brown AM (1990) Coupling of ATP-sensitive K⁺ channels to A₁ receptors by G proteins in rat ventricular myocytes. *The American journal of physiology* 259:H820-826.
- Koester HJ, Sakmann B (2000) Calcium dynamics associated with action potentials in single nerve terminals of pyramidal cells in layer 2/3 of the young rat neocortex. *The Journal of physiology* 529 Pt 3:625-646.
- Koester HJ, Johnston D (2005) Target cell-dependent normalization of transmitter release at neocortical synapses. *Science* 308:863-866.
- Koizumi H, Smith JC (2008) Persistent Na⁺ and K⁺-dominated leak currents contribute to respiratory rhythm generation in the pre-Botzinger complex in vitro. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:1773-1785.
- Koizumi H, Wilson CG, Wong S, Yamanishi T, Koshiya N, Smith JC (2008) Functional imaging, spatial reconstruction, and biophysical analysis of a respiratory motor circuit isolated in vitro. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:2353-2365.
- Koizumi H, Smerin SE, Yamanishi T, Moorjani BR, Zhang R, Smith JC (2010) TASK channels contribute to the K⁺-dominated leak current regulating respiratory rhythm generation in vitro. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:4273-4284.
- Koshiya N, Smith JC (1999) Neuronal pacemaker for breathing visualized in vitro. *Nature* 400:360-363.
- Krnjevic K, Leblond J (1989) Changes in membrane currents of hippocampal neurons evoked by brief anoxia. *Journal of neurophysiology* 62:15-30.

- Kulik A, Trapp S, Ballanyi K (2000) Ischemia but not anoxia evokes vesicular and Ca(2+)-independent glutamate release in the dorsal vagal complex in vitro. *Journal of neurophysiology* 83:2905-2915.
- Kull B, Svenningsson P, Fredholm BB (2000) Adenosine A(2A) receptors are colocalized with and activate g(olf) in rat striatum. *Molecular Pharmacology* 58:771-777.
- Kyung Park Y, Jun Jung S, Kwak J, Kim J (2002) Effect of hypoxia on excitatory transmission in the rat substantia gelatinosa neurons. *Biochemical and biophysical research communications* 295:929-936.
- Lagercrantz H, Yamamoto Y, Fredholm BB, Prabhakar NR, von Euler C (1984) Adenosine analogues depress ventilation in rabbit neonates. Theophylline stimulation of respiration via adenosine receptors? *Pediatric research* 18:387-390.
- Lalley PM, Mifflin SW (2012) Opposing effects on the phrenic motor pathway attributed to dopamine-D1 and -D3/D2 receptor activation. *Respiratory physiology & neurobiology* 181:183-193.
- Latini S, Bordoni F, Corradetti R, Pepeu G, Pedata F (1998) Temporal correlation between adenosine outflow and synaptic potential inhibition in rat hippocampal slices during ischemia-like conditions. *Brain research* 794:325-328.
- Li YM, Shen L, Peever JH, Duffin J (2003) Connections between respiratory neurones in the neonatal rat transverse medullary slice studied with cross-correlation. *The Journal of physiology* 549:327-332.

- Lieske SP, Thoby-Brisson M, Ramirez JM (2001) Reconfiguration of the central respiratory network under normoxic and hypoxic conditions. *Advances in experimental medicine and biology* 499:171-178.
- Lieske SP, Thoby-Brisson M, Telgkamp P, Ramirez JM (2000) Reconfiguration of the neural network controlling multiple breathing patterns: eupnea, sighs and gasps [see comment]. *Nature neuroscience* 3:600-607.
- Lindsey BG, Morris KF, Segers LS, Shannon R (2000) Respiratory neuronal assemblies. *Respiration physiology* 122:183-196.
- Lindsey BG, Hernández YM, Morris KF, Shannon R, Gerstein GL (1992) Dynamic reconfiguration of brain stem neural assemblies: respiratory phase-dependent synchrony versus modulation of firing rates. *Journal of neurophysiology* 67:923-930.
- Lindsey BG, Arata A, Morris KF, Hernández YM, Shannon R (1998) Medullary raphe neurones and baroreceptor modulation of the respiratory motor pattern in the cat. *The Journal of physiology* 512 (Pt 3):863-882.
- Lipton P, Whittingham TS (1979) The effect of hypoxia on evoked potentials in the in vitro hippocampus. *The Journal of physiology* 287:427-438.
- Lovering AT, Fraigne JJ, Dunin-Barkowski WL, Vidruk EH, Orem JM (2006) Medullary respiratory neural activity during hypoxia in NREM and REM sleep in the cat. *Journal of neurophysiology* 95:803-810.
- Luhmann HJ, Heinemann U (1992) Hypoxia-induced functional alterations in adult rat neocortex. *Journal of neurophysiology* 67:798-811.
- Luhmann HJ, Kral T (1997) Hypoxia-induced dysfunction in developing rat neocortex. *Journal of neurophysiology* 78:1212-1221.

- Mahamed S, Strey KA, Mitchell GS, Baker-Herman TL (2011) Reduced respiratory neural activity elicits phrenic motor facilitation. *Respiratory physiology & neurobiology* 175:303-309.
- Marder E, Abbott LF, Turrigiano GG, Liu Z, Golowasch J (1996) Memory from the dynamics of intrinsic membrane currents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:13481-13486.
- Marder E, Calabrese RL (1996) Principles of rhythmic motor pattern generation. *Physiological reviews* 76:687-717.
- Marder E, Bucher D, Schulz DJ, Taylor AL (2005) Invertebrate central pattern generation moves along. *Current biology* : CB 15:R685-699.
- Martin AR (1966) Quantal Nature of Synaptic Transmission. *Physiological Reviews* 46:51-66.
- Martin ED, Fernandez M, Perea G, Pascual O, Haydon PG, Araque A, Cena V (2007) Adenosine released by astrocytes contributes to hypoxia-induced modulation of synaptic transmission. *Glia* 55:36-45.
- Maxova H, Vizek M (2001) Biphasic ventilatory response to hypoxia in unanesthetized rats. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 50:91-96.
- McKay LC, Janczewski WA, Feldman JL (2005) Sleep-disordered breathing after targeted ablation of preBotzinger complex neurons. *Nature neuroscience* 8:1142-1144.
- Mellen NM, Mishra D (2010) Functional anatomical evidence for respiratory rhythmogenic function of endogenous bursters in rat medulla. *The*

- Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 30:8383-8392.
- Mironov S (2009) Respiratory circuits: function, mechanisms, topology, and pathology. *Neuroscientist* 15:194-208.
- Mironov SL (2008) Metabotropic glutamate receptors activate dendritic calcium waves and TRPM channels which drive rhythmic respiratory patterns in mice. *The Journal of physiology* 586:2277-2291.
- Mironov SL (2013) Calmodulin and calmodulin kinase II mediate emergent bursting activity in the brainstem respiratory network (preBotzinger complex). *The Journal of physiology* 591:1613-1630.
- Mironov SL, Richter DW (1998) L-type Ca²⁺ channels in inspiratory neurones of mice and their modulation by hypoxia. *The Journal of physiology* 512 (Pt 1):75-87.
- Mironov SL, Richter DW (1999) Cytoskeleton mediates inhibition of the fast Na⁺ current in respiratory brainstem neurons during hypoxia. *The European journal of neuroscience* 11:1831-1834.
- Mironov SL, Richter DW (2000a) Intracellular signalling pathways modulate K(ATP) channels in inspiratory brainstem neurones and their hypoxic activation: involvement of metabotropic receptors, G-proteins and cytoskeleton. *Brain research* 853:60-67.
- Mironov SL, Richter DW (2000b) Hypoxic modulation of L-type Ca(2+) channels in inspiratory brainstem neurones: intracellular signalling pathways and metabotropic glutamate receptors. *Brain research* 869:166-177.

- Mironov SL, Langohr K, Richter DW (1999) A1 adenosine receptors modulate respiratory activity of the neonatal mouse via the cAMP-mediated signaling pathway. *Journal of neurophysiology* 81:247-255.
- Mironov SL, Langohr K, Richter DW (2000) Hyperpolarization-activated current, I_h, in inspiratory brainstem neurons and its inhibition by hypoxia. *The European journal of neuroscience* 12:520-526.
- Mironov SL, Langohr K, Haller M, Richter DW (1998) Hypoxia activates ATP-dependent potassium channels in inspiratory neurones of neonatal mice. *The Journal of physiology* 509 (Pt 3):755-766.
- Mitchell JB, Lupica CR, Dunwiddie TV (1993) Activity-dependent release of endogenous adenosine modulates synaptic responses in the rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 13:3439-3447.
- Molkov YI, Abdala AP, Bacak BJ, Smith JC, Paton JF, Rybak IA (2010) Late-expiratory activity: emergence and interactions with the respiratory CpG. *Journal of neurophysiology* 104:2713-2729.
- Montandon G, Qin W, Liu H, Ren J, Greer JJ, Horner RL (2011) PreBotzinger complex neurokinin-1 receptor-expressing neurons mediate opioid-induced respiratory depression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:1292-1301.
- Morris KF, Arata A, Shannon R, Lindsey BG (1996) Inspiratory drive and phase duration during carotid chemoreceptor stimulation in the cat: medullary neurone correlations. *The Journal of physiology* 491 (Pt 1):241-259.
- Morris KF, Nuding SC, Segers LS, Baekey DM, Shannon R, Lindsey BG, Dick TE (2010) Respiratory and Mayer wave-related discharge patterns of

- raphe and pontine neurons change with vagotomy. *Journal of applied physiology* 109:189-202.
- Mulkey DK, Stornetta RL, Weston MC, Simmons JR, Parker A, Bayliss DA, Guyenet PG (2004) Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. *Nature neuroscience* 7:1360-1369.
- Mulkey DK, Rosin DL, West G, Takakura AC, Moreira TS, Bayliss DA, Guyenet PG (2007) Serotonergic neurons activate chemosensitive retrotrapezoid nucleus neurons by a pH-independent mechanism. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:14128-14138.
- Muller KJ, Tsechpenakis G, Homma R, Nicholls JG, Cohen LB, Eugenin J (2009) Optical analysis of circuitry for respiratory rhythm in isolated brainstem of foetal mice. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 364:2485-2491.
- Nattie EE (2001) Central chemosensitivity, sleep, and wakefulness. *Respiration physiology* 129:257-268.
- Nieto-Posadas A, Flores-Martínez E, Lorea-Hernández JJ, Rivera-Angulo AJ, Pérez-Ortega JE, Bargas J, Peña-Ortega F (2014) Change in network connectivity during fictive-gasping generation in hypoxia: prevention by a metabolic intermediate. *Frontiers in physiology* 5:265.
- Nini A, Feingold A, Slovin H, Bergman H (1995) Neurons in the globus pallidus do not show correlated activity in the normal monkey, but phase-locked oscillations appear in the MPTP model of parkinsonism. *Journal of neurophysiology* 74:1800-1805.

- Nunez-Abades PA, Pasaro R, Bianchi AL (1992) Study of the topographical distribution of different populations of motoneurons within rat's nucleus ambiguus, by means of four different fluorochromes. *Neuroscience letters* 135:103-107.
- Nusbaum MP, Blitz DM, Swensen AM, Wood D, Marder E (2001) The roles of co-transmission in neural network modulation. *Trends in neurosciences* 24:146-154.
- Ogilvie MD, Gottschalk A, Anders K, Richter DW, Pack AI (1992) A network model of respiratory rhythmogenesis. *The American journal of physiology* 263:R962-975.
- Okada Y, Sasaki T, Oku Y, Takahashi N, Seki M, Ujita S, Tanaka KF, Matsuki N, Ikegaya Y (2012) Preinspiratory calcium rise in putative pre-Botzinger complex astrocytes. *The Journal of physiology* 590:4933-4944.
- Onimaru H, Homma I (2003) A novel functional neuron group for respiratory rhythm generation in the ventral medulla. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:1478-1486.
- Onimaru H, Arata A, Homma I (1988) Primary respiratory rhythm generator in the medulla of brainstem-spinal cord preparation from newborn rat. *Brain research* 445:314-324.
- Onimaru H, Kashiwagi M, Arata A, Homma I (1993) Possible mutual excitatory couplings between inspiratory neurons in caudal ventrolateral medulla of brainstem-spinal cord preparation isolated from newborn rat. *Neuroscience letters* 150:203-206.

- Onimaru H, Ballanyi K, Richter DW (1996) Calcium-dependent responses in neurons of the isolated respiratory network of newborn rats. *The Journal of physiology* 491 (Pt 3):677-695.
- Ott MM, Nuding SC, Segers LS, Lindsey BG, Morris KF (2011) Ventrolateral medullary functional connectivity and the respiratory and central chemoreceptor-evoked modulation of retrotrapezoid-parafacial neurons. *Journal of neurophysiology* 105:2960-2975.
- Ott MM, Nuding SC, Segers LS, O'Connor R, Morris KF, Lindsey BG (2012) Central chemoreceptor modulation of breathing via multipath tuning in medullary ventrolateral respiratory column circuits. *Journal of neurophysiology* 107:603-617.
- Pan WJ, Osmanovic SS, Shefner SA (1994) Adenosine decreases action potential duration by modulation of A-current in rat locus coeruleus neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 14:1114-1122.
- Paton JF, Abdala AP, Koizumi H, Smith JC, St-John WM (2006) Respiratory rhythm generation during gasping depends on persistent sodium current. *Nature neuroscience* 9:311-313.
- Pearson T, Frenguelli BG (2004) Adrenoceptor subtype-specific acceleration of the hypoxic depression of excitatory synaptic transmission in area CA1 of the rat hippocampus. *The European journal of neuroscience* 20:1555-1565.
- Pearson T, Currie AJ, Etherington LA, Gadalla AE, Damian K, Llaudet E, Dale N, Frenguelli BG (2003) Plasticity of purine release during cerebral

- ischemia: clinical implications? *Journal of cellular and molecular medicine* 7:362-375.
- Peña F (2008) Contribution of pacemaker neurons to respiratory rhythms generation in vitro. *Advances in experimental medicine and biology* 605:114-118.
- Peña F, Ramirez JM (2004) Substance P-mediated modulation of pacemaker properties in the mammalian respiratory network. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:7549-7556.
- Peña F, Ramirez JM (2005) Hypoxia-induced changes in neuronal network properties. *Molecular Neurobiology* 32:251-283.
- Peña F, García O (2006) Breathing generation and potential pharmacotherapeutic approaches to central respiratory disorders. *Current Medical Chemistry* 13:2681-2693.
- Peña F, Aguilera MA (2007) Effects of riluzole and flufenamic acid on eupnea and gasping of neonatal mice in vivo. *Neuroscience letters* 415:288-293.
- Peña F, Parkis MA, Tryba AK, Ramirez JM (2004) Differential contribution of pacemaker properties to the generation of respiratory rhythms during normoxia and hypoxia. *Neuron* 43:105-117.
- Peña F, Meza-Andrade R, Páez-Zayas V, González-Marín MC (2008) Gasping generation in developing Swiss-Webster mice in vitro and in vivo. *Neurochemical Research* 33:1492-1500.
- Peña F (2009) Neuronal network properties underlying the generation of gasping. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 36:1218-1228.

- Peña-Ortega F (2012) Tonic neuromodulation of the inspiratory rhythm generator. *Frontiers in physiology* 3:253.
- Pérez-León J, Frech MJ, Schroder JE, Fischer F, Kneussel M, Wassle H, Backus KH (2003) Spontaneous synaptic activity in an organotypic culture of the mouse retina. *Investigative ophthalmology & visual science* 44:1376-1387.
- Perkel DH, Gerstein GL, Moore GP (1967) Neuronal spike trains and stochastic point processes. II. Simultaneous spike trains. *Biophysical Journal* 7:419-440.
- Phillis JW, O'Regan MH, Perkins LM (1992) Measurement of rat plasma adenosine levels during normoxia and hypoxia. *Life sciences* 51:PL149-152.
- 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. *The Journal of physiology* 591:2687-2703.
- Ptak K, Yamanishi T, Aungst J, Milesco LS, Zhang R, Richerson GB, Smith JC (2009) Raphe neurons stimulate respiratory circuit activity by multiple mechanisms via endogenously released serotonin and substance P. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:3720-3737.
- Quiñ Quiroga R, Panzeri S (2013) *Principles of neural coding*. Boca Raton: CRC Press.
- Ramirez JM, Richter DW (1996) The neuronal mechanisms of respiratory rhythm generation. *Current opinion in neurobiology* 6:817-825.

- Ramirez JM, Lieske SP (2003) Commentary on the definition of eupnea and gasping. *Respiratory physiology & neurobiology* 139:113-119.
- Ramirez JM, Quellmalz UJ, Richter DW (1996) Postnatal changes in the mammalian respiratory network as revealed by the transverse brainstem slice of mice. *The Journal of physiology* 491 (Pt 3):799-812.
- Ramirez JM, Tryba AK, Peña F (2004) Pacemaker neurons and neuronal networks: an integrative view. *Current opinion in neurobiology* 14:665-674.
- Ramirez JM, Quellmalz UJ, Wilken B, Richter DW (1998a) The hypoxic response of neurones within the in vitro mammalian respiratory network. *The Journal of physiology* 507 (Pt 2):571-582.
- Ramirez JM, Telgkamp P, Elsen FP, Quellmalz UJ, Richter DW (1997) Respiratory rhythm generation in mammals: synaptic and membrane properties. *Respiration physiology* 110:71-85.
- Ramirez JM, Schwarzacher SW, Pierrefiche O, Olivera BM, Richter DW (1998b) Selective lesioning of the cat pre-Botzinger complex in vivo eliminates breathing but not gasping. *The Journal of physiology* 507 (Pt 3):895-907.
- Ramirez JM, Folkow LP, Blix AS (2007) Hypoxia tolerance in mammals and birds: from the wilderness to the clinic. *Annual review of physiology* 69:113-143.
- Ramirez JM, Garcia AJ, 3rd, Anderson TM, Koschnitzky JE, Peng YJ, Kumar GK, Prabhakar NR (2013) Central and peripheral factors contributing to obstructive sleep apneas. *Respiratory physiology & neurobiology* 189:344-353.

- Ramirez-Jarquin JO, Lara-Hernandez S, Lopez-Guerrero JJ, Aguilera MA, Rivera-Angulo AJ, Sampieri A, Vaca L, Ordaz B, Pena-Ortega F (2012) Somatostatin modulates generation of inspiratory rhythms and determines asphyxia survival. *Peptides* 34:360-372.
- Ray RS, Corcoran AE, Brust RD, Kim JC, Richerson GB, Nattie E, Dymecki SM (2011) Impaired respiratory and body temperature control upon acute serotonergic neuron inhibition. *Science* 333:637-642.
- Redman S (1990) Quantal analysis of synaptic potentials in neurons of the central nervous system. *Physiological reviews* 70:165-198.
- Rekling JC, Feldman JL (1998) PreBotzinger complex and pacemaker neurons: hypothesized site and kernel for respiratory rhythm generation. *Annual review of physiology* 60:385-405.
- Rekling JC, Champagnat J, Denavit-Saubie M (1996) Electroresponsive properties and membrane potential trajectories of three types of inspiratory neurons in the newborn mouse brain stem in vitro. *Journal of neurophysiology* 75:795-810.
- Ren J, Greer JJ (2006) Neurosteroid modulation of respiratory rhythm in rats during the perinatal period. *The Journal of physiology* 574:535-546.
- Reynolds LB, Jr. (1962) Characteristics of an inspiration-augmenting reflex in anesthetized cats. *Journal of Applied Physiology* 17:683-688.
- Ribeiro JA, Sebastiao AM, de Mendonca A (2002) Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Progress in neurobiology* 68:377-392.

- Richter DW, Spyer KM (2001) Studying rhythmogenesis of breathing: comparison of in vivo and in vitro models. *Trends in neurosciences* 24:464-472.
- Richter DW, Smith JC (2014) Respiratory rhythm generation in vivo. *Physiology* 29:58-71.
- Richter DW, Ballanyi K, Schwarzacher S (1992) Mechanisms of respiratory rhythm generation. *Current opinion in neurobiology* 2:788-793.
- Richter DW, Bischoff A, Anders K, Bellingham M, Windhorst U (1991) Response of the medullary respiratory network of the cat to hypoxia. *The Journal of physiology* 443:231-256.
- Richter DW, Schmidt-Garcon P, Pierrefiche O, Bischoff AM, Lalley PM (1999) Neurotransmitters and neuromodulators controlling the hypoxic respiratory response in anaesthetized cats. *The Journal of physiology* 514 (Pt 2):567-578.
- Rivera-Angulo AJ, Peña-Ortega F (2014) Isocitrate supplementation promotes breathing generation, gasping, and autoresuscitation in neonatal mice. *Journal of Neuroscience Research* 92:375-388.
- Road JD, Ford TW, Kirkwood PA (2013) Connections between expiratory bulbospinal neurons and expiratory motoneurons in thoracic and upper lumbar segments of the spinal cord. *Journal of neurophysiology* 109:1837-1851.
- Rosen AS, Morris ME (1993) Anoxic depression of excitatory and inhibitory postsynaptic potentials in rat neocortical slices. *Journal of neurophysiology* 69:109-117.

- Rubin JE, Hayes JA, Mendenhall JL, Del Negro CA (2009a) Calcium-activated nonspecific cation current and synaptic depression promote network-dependent burst oscillations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:2939-2944.
- Rubin JE, Shevtsova NA, Ermentrout GB, Smith JC, Rybak IA (2009b) Multiple rhythmic states in a model of the respiratory central pattern generator. *Journal of neurophysiology* 101:2146-2165.
- Runold M, Lagercrantz H, Prabhakar NR, Fredholm BB (1989) Role of adenosine in hypoxic ventilatory depression. *Journal of applied physiology* 67:541-546.
- Rybak IA, Ptak K, Shevtsova NA, McCrimmon DR (2003) Sodium currents in neurons from the rostroventrolateral medulla of the rat. *Journal of neurophysiology* 90:1635-1642.
- Rybak IA, Molkov YI, Jasinski PE, Shevtsova NA, Smith JC (2014) Rhythmic bursting in the pre-Botzinger complex: mechanisms and models. *Progress in brain research* 209:1-23.
- Rybak IA, Paton JF, Schwaber JS (1997a) Modeling neural mechanisms for genesis of respiratory rhythm and pattern. I. Models of respiratory neurons. *Journal of neurophysiology* 77:1994-2006.
- Rybak IA, Paton JF, Schwaber JS (1997b) Modeling neural mechanisms for genesis of respiratory rhythm and pattern. II. Network models of the central respiratory pattern generator. *Journal of neurophysiology* 77:2007-2026.
- Rybak IA, Paton JF, Schwaber JS (1997c) Modeling neural mechanisms for genesis of respiratory rhythm and pattern. III. Comparison of model

- performances during afferent nerve stimulation. *Journal of neurophysiology* 77:2027-2039.
- Rybak IA, Abdala AP, Markin SN, Paton JF, Smith JC (2007) Spatial organization and state-dependent mechanisms for respiratory rhythm and pattern generation. *Progress in brain research* 165:201-220.
- Rybak IA, O'Connor R, Ross A, Shevtsova NA, Nuding SC, Segers LS, Shannon R, Dick TE, Dunin-Barkowski WL, Orem JM, Solomon IC, Morris KF, Lindsey BG (2008) Reconfiguration of the pontomedullary respiratory network: a computational modeling study with coordinated in vivo experiments. *Journal of neurophysiology* 100:1770-1799.
- Sasaki T, Matsuki N, Ikegaya Y (2011) Action-potential modulation during axonal conduction. *Science* 331:599-601.
- Schmidt C, Bellingham MC, Richter DW (1995) Adenosinergic modulation of respiratory neurones and hypoxic responses in the anaesthetized cat. *The Journal of physiology* 483 (Pt 3):769-781.
- Sebastiao AM, Ribeiro JA (1996) Adenosine A2 receptor-mediated excitatory actions on the nervous system. *Progress in neurobiology* 48:167-189.
- Sebastiao AM, Ribeiro JA (2009) Adenosine receptors and the central nervous system. *Handbook of experimental pharmacology*:471-534.
- Segers LS, Shannon R, Saporta S, Lindsey BG (1987) Functional associations among simultaneously monitored lateral medullary respiratory neurons in the cat. I. Evidence for excitatory and inhibitory actions of inspiratory neurons. *Journal of neurophysiology* 57:1078-1100.

- Segers LS, Nuding SC, Dick TE, Shannon R, Baekey DM, Solomon IC, Morris KF, Lindsey BG (2008) Functional connectivity in the pontomedullary respiratory network. *Journal of neurophysiology* 100:1749-1769.
- Segers LS, Nuding SC, Ott MM, Dean JB, Bolser DC, O'Connor R, Morris KF, Lindsey BG (2015) Peripheral chemoreceptors tune inspiratory drive via tonic expiratory neuron hubs in the medullary ventral respiratory column network. *Journal of neurophysiology* 113:352-368.
- Segers LS, Nuding SC, Vovk A, Pitts T, Baekey DM, O'Connor R, Morris KF, Lindsey BG, Shannon R, Bolser DC (2012) Discharge Identity of Medullary Inspiratory Neurons is Altered during Repetitive Fictive Cough. *Frontiers in physiology* 3:223.
- Shan HQ, Cheng JS (2000) Effect of adenosine on adenosine triphosphate-sensitive potassium channel during hypoxia in rat hippocampal neurons. *Neuroscience letters* 286:45-48.
- Shannon R, Baekey DM, Morris KF, Li Z, Lindsey BG (2000) Functional connectivity among ventrolateral medullary respiratory neurones and responses during fictive cough in the cat. *The Journal of physiology* 525 Pt 1:207-224.
- Shao XM, Feldman JL (1997) Respiratory rhythm generation and synaptic inhibition of expiratory neurons in pre-Botzinger complex: differential roles of glycinergic and GABAergic neural transmission. *Journal of neurophysiology* 77:1853-1860.
- Shen L, Peever JH, Duffin J (2002) Bilateral coordination of inspiratory neurones in the rat. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 443:829-835.

- Shim JO, Shin CY, Lee TS, Yang SJ, An JY, Song HJ, Kim TH, Huh IH, Sohn UD (2002) Signal transduction mechanism via adenosine A1 receptor in the cat esophageal smooth muscle cells. *Cellular Signalling* 14:365-372.
- Sirota A, Montgomery S, Fujisawa S, Isomura Y, Zugaro M, Buzsaki G (2008) Entrainment of neocortical neurons and gamma oscillations by the hippocampal theta rhythm. *Neuron* 60:683-697.
- Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW, Feldman JL (1991) Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* 254:726-729.
- Smith JC, Abdala AP, Koizumi H, Rybak IA, Paton JF (2007) Spatial and functional architecture of the mammalian brain stem respiratory network: a hierarchy of three oscillatory mechanisms. *Journal of neurophysiology* 98:3370-3387.
- Smith JC, Abdala AP, Borgmann A, Rybak IA, Paton JF (2013) Brainstem respiratory networks: building blocks and microcircuits. *Trends in neurosciences* 36:152-162.
- Smith JC, Butera RJ, Koshiya N, Del Negro C, Wilson CG, Johnson SM (2000) Respiratory rhythm generation in neonatal and adult mammals: the hybrid pacemaker-network model. *Respiration physiology* 122:131-147.
- St-John WM (1998) Neurogenesis of patterns of automatic ventilatory activity. *Progress in neurobiology* 56:97-117.
- St-John WM (1999) Rostral medullary respiratory neuronal activities of decerebrate cats in eupnea, apneusis and gasping. *Respiration physiology* 116:47-65.

- St-John WM, Bianchi AL (1985) Responses of bulbospinal and laryngeal respiratory neurons to hypercapnia and hypoxia. *Journal of applied physiology* 59:1201-1207.
- Stevens CF (1993) Quantal release of neurotransmitter and long-term potentiation. *Cell* 72 Suppl:55-63.
- 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-Botzinger complex. *The Journal of comparative neurology* 455:499-512.
- Strey KA, Nichols NL, Baertsch NA, Broytman O, Baker-Herman TL (2012) Spinal atypical protein kinase C activity is necessary to stabilize inactivity-induced phrenic motor facilitation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:16510-16520.
- Super H, Roelfsema PR (2005) Chronic multiunit recordings in behaving animals: advantages and limitations. *Progress in brain research* 147:263-282.
- Suzue T (1984) Respiratory rhythm generation in the in vitro brain stem-spinal cord preparation of the neonatal rat. *The Journal of physiology* 354:173-183.
- Takahashi S, Sakurai Y (2009) Sub-Millisecond Firing Synchrony of Closely Neighboring Pyramidal Neurons in Hippocampal CA1 of Rats During Delayed Non-Matching to Sample Task. *Frontiers in neural circuits* 3:9.
- Takakura AC, Moreira TS, Colombari E, West GH, Stornetta RL, Guyenet PG (2006) Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats. *The Journal of physiology* 572:503-523.

- Tan W, Janczewski WA, Yang P, Shao XM, Callaway EM, Feldman JL (2008) Silencing preBotzinger complex somatostatin-expressing neurons induces persistent apnea in awake rat. *Nature neuroscience* 11:538-540.
- Tchumatchenko T, Geisel T, Volgushev M, Wolf F (2011) Spike correlations - what can they tell about synchrony? *Frontiers in Neuroscience* 5:68.
- Thoby-Brisson M, Ramirez JM (2000) Role of inspiratory pacemaker neurons in mediating the hypoxic response of the respiratory network in vitro. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:5858-5866.
- Thoby-Brisson M, Ramirez JM (2001) Identification of two types of inspiratory pacemaker neurons in the isolated respiratory neural network of mice. *Journal of neurophysiology* 86:104-112.
- Thurston JH, Hauhard RE, Dirgo JA (1978) Aminophylline increases cerebral metabolic rate and decreases anoxic survival in young mice. *Science* 201:649-651.
- Tian GF, Duffin J (1998) The role of dorsal respiratory group neurons studied with cross-correlation in the decerebrate rat. *Experimental brain research* 121:29-34.
- Toporikova N, Butera RJ (2011) Two types of independent bursting mechanisms in inspiratory neurons: an integrative model. *Journal of computational neuroscience* 30:515-528.
- Tryba AK, Peña F, Ramirez JM (2003) Stabilization of bursting in respiratory pacemaker neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:3538-3546.

- Tryba AK, Peña F, Ramirez JM (2006) Gasping activity in vitro: a rhythm dependent on 5-HT_{2A} receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:2623-2634.
- Turrigiano G, Abbott LF, Marder E (1994) Activity-dependent changes in the intrinsic properties of cultured neurons. *Science* 264:974-977.
- Turrigiano GG, Leslie KR, Desai NS, Rutherford LC, Nelson SB (1998) Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature* 391:892-896.
- Turrigiano GG, Nelson SB (2004) Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nature reviews Neuroscience* 5:97-107.
- Vachon BR, Duffin J (1978) Cross-correlation of medullary respiratory neurons in the cat. *Experimental neurology* 61:15-30.
- van Calker D, Muller M, Hamprecht B (1979) Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *Journal of neurochemistry* 33:999-1005.
- Van Dijck G, Van Hulle MM, Heiney SA, Blazquez PM, Meng H, Angelaki DE, Arenz A, Margrie TW, Mostofi A, Edgley S, Bengtsson F, Ekerot CF, Jorntell H, Dalley JW, Holtzman T (2013) Probabilistic identification of cerebellar cortical neurones across species. *PloS one* 8:e57669.
- Vandam RJ, Shields EJ, Kelty JD (2008) Rhythm generation by the pre-Botzinger complex in medullary slice and island preparations: effects of adenosine A₁ receptor activation. *BMC Neuroscience* 9:95.
- Vlemincx E, Van Diest I, De Peuter S, Bresseleers J, Bogaerts K, Fannes S, Li W, Van Den Bergh O (2009) Why do you sigh? Sigh rate during induced stress and relief. *Psychophysiology* 46:1005-1013.

- Visentin S, Wu SN, Belardinelli L (1990) Adenosine-induced changes in atrial action potential: contribution of Ca and K currents. *The American journal of physiology* 258:H1070-1078.
- Wallen-Mackenzie A, Gezelius H, Thoby-Brisson M, Nygard A, Enjin A, Fujiyama F, Fortin G, Kullander K (2006) Vesicular glutamate transporter 2 is required for central respiratory rhythm generation but not for locomotor central pattern generation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:12294-12307.
- Walsh MP, Marshall JM (2006) The role of adenosine in the early respiratory and cardiovascular changes evoked by chronic hypoxia in the rat. *The Journal of physiology* 575:277-289.
- Wang X, Hayes JA, Revill AL, Song H, Kottick A, Vann NC, LaMar MD, Picardo MC, Akins VT, Funk GD, Del Negro CA (2014) Laser ablation of Dbx1 neurons in the pre-Botzinger complex stops inspiratory rhythm and impairs output in neonatal mice. *eLife* 3:e03427.
- Wassink G, Bennet L, Davidson JO, Westgate JA, Gunn AJ (2013) Pre-existing hypoxia is associated with greater EEG suppression and early onset of evolving seizure activity during brief repeated asphyxia in near-term fetal sheep. *PloS one* 8:e73895.
- Wenninger JM, Pan LG, Klum L, Leekley T, Bastastic J, Hodges MR, Feroah T, Davis S, Forster HV (2004) Small reduction of neurokinin-1 receptor-expressing neurons in the pre-Botzinger complex area induces abnormal breathing periods in awake goats. *Journal of applied physiology* 97:1620-1628.

- Wirkner K, Assmann H, Koles L, Gerevich Z, Franke H, Norenberg W, Boehm R, Illes P (2000) Inhibition by adenosine A(2A) receptors of NMDA but not AMPA currents in rat neostriatal neurons. *British journal of pharmacology* 130:259-269.
- Wong-Riley MT, Liu Q (2005) Neurochemical development of brain stem nuclei involved in the control of respiration. *Respiratory physiology & neurobiology* 149:83-98.
- Wu LG, Saggau P (1994) Adenosine inhibits evoked synaptic transmission primarily by reducing presynaptic calcium influx in area CA1 of hippocampus. *Neuron* 12:1139-1148.
- Xu ZC, Pulsinelli WA (1996) Electrophysiological changes of CA1 pyramidal neurons following transient forebrain ischemia: an in vivo intracellular recording and staining study. *Journal of neurophysiology* 76:1689-1697.
- Young JN, Somjen GG (1992) Suppression of presynaptic calcium currents by hypoxia in hippocampal tissue slices. *Brain research* 573:70-76.
- Zavala-Tecuapetla C, Aguilera MA, Lopez-Guerrero JJ, González-Marín MC, Peña F (2008) Calcium-activated potassium currents differentially modulate respiratory rhythm generation. *The European journal of neuroscience* 27:2871-2884.
- Zavala-Tecuapetla C, Tapia D, Rivera-Angulo AJ, Galarraga E, Peña-Ortega F (2014) Morphological characterization of respiratory neurons in the pre-bötzinger complex. *Progress in brain research* 209:39-56.
- Zetterstrom T, Vernet L, Ungerstedt U, Tossman U, Jonzon B, Fredholm BB (1982) Purine levels in the intact rat brain. Studies with an implanted perfused hollow fibre. *Neuroscience letters* 29:111-115.

- Zhang W, Linden DJ (2009) Neuromodulation at single presynaptic boutons of cerebellar parallel fibers is determined by bouton size and basal action potential-evoked Ca transient amplitude. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:15586-15594.
- Zhu PJ, Krnjevic K (1997) Endogenous adenosine on membrane properties of CA1 neurons in rat hippocampal slices during normoxia and hypoxia. *Neuropharmacology* 36:169-176.

11.- Apéndice

En la presente sección se muestra el artículo publicado que derivó del proyecto presentado en esta tesis.



Change in network connectivity during fictive-gasping generation in hypoxia: prevention by a metabolic intermediate

Andrés Nieto-Posadas^{1†}, Ernesto Flores-Martínez^{1†}, Jonathan-Julio Lorea-Hernández^{1†}, Ana-Julia Rivera-Angulo¹, Jesús-Esteban Pérez-Ortega², José Bargas² and Fernando Peña-Ortega^{1*}

¹ Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, México

² División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México

Edited by:

Thiago S. Moreira, University of Sao Paulo, Brazil

Reviewed by:

Rodrigo Iturriaga, P Universidad Católica Chile, Chile
Ana Paula Abdala, University of Bristol, UK

*Correspondence:

Fernando Peña-Ortega, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Boulevard Juriquilla 3001, Querétaro, CP 76230, Mexico
e-mail: jfpena@unam.mx

[†] These authors have contributed equally to this work.

The neuronal circuit in charge of generating the respiratory rhythms, localized in the pre-Bötzinger complex (preBötC), is configured to produce fictive-eupnea during normoxia and reconfigures to produce fictive-gasping during hypoxic conditions *in vitro*. The mechanisms involved in such reconfiguration have been extensively investigated by cell-focused studies, but the actual changes at the network level remain elusive. Since a failure to generate gasping has been linked to Sudden Infant Death Syndrome (SIDS), the study of gasping generation and pharmacological approaches to promote it may have clinical relevance. Here, we study the changes in network dynamics and circuit reconfiguration that occur during the transition to fictive-gasping generation in the brainstem slice preparation by recording the preBötC with multi-electrode arrays and assessing correlated firing among respiratory neurons or clusters of respiratory neurons (multiunits). We studied whether the respiratory network reconfiguration in hypoxia involves changes in either the number of active respiratory elements, the number of functional connections among elements, or the strength of these connections. Moreover, we tested the influence of isocitrate, a Krebs cycle intermediate that has recently been shown to promote breathing, on the configuration of the preBötC circuit during normoxia and on its reconfiguration during hypoxia. We found that, in contrast to previous suggestions based on cell-focused studies, the number and the overall activity of respiratory neurons change only slightly during hypoxia. However, hypoxia induces a reduction in the strength of functional connectivity within the circuit without reducing the number of connections. Isocitrate prevented this reduction during hypoxia while increasing the strength of network connectivity. In conclusion, we provide an overview of the configuration of the respiratory network under control conditions and how it is reconfigured during fictive-gasping. Additionally, our data support the use of isocitrate to favor respiratory rhythm generation under normoxia and to prevent some of the changes in the respiratory network under hypoxic conditions.

Keywords: pre-Bötzinger complex, gasping, SIDS, Krebs cycle, network analysis

INTRODUCTION

Neuronal assemblies are embedded in complex networks that act in concert to generate the function of a given brain region (Lindsey et al., 2000; Ramirez et al., 2004, 2007; Carrillo-Reid et al., 2008; Segers et al., 2008; Galan et al., 2010; Jaidar et al., 2010; Ott et al., 2011). Several neural circuits produce spontaneous synchronous activity through the interactions of the intrinsic properties of their neurons and the chemical and electrical synapses that link them into assemblies and networks (Ramirez et al., 2004; Carrillo-Reid et al., 2008; Peña, 2009; Jaidar et al., 2010; Zavala-Tecuapetla et al., 2014). Neuronal assembly bursting is an important feature that ensures the reliability of synaptic transmission, plasticity, and information processing (Lisman, 1997). It induces the activity of central pattern generators (CPGs), which

are responsible for vital functions such as breathing (Ramirez et al., 2004, 2013; Peña, 2009), whose CPG is located in the pre-Bötzinger Complex (preBötC; Smith et al., 1991). Although some insights about the respiratory network configurations required to produce different patterns of breathing activity have been revealed by extensive cell-focused studies (St. John and Bianchi, 1985; Richter et al., 1991; Ballanyi et al., 1994; England et al., 1995; Ramirez et al., 1998; St. John, 1999; Lieske et al., 2000; Thoby-Brisson and Ramirez, 2000; Peña et al., 2004; Paton et al., 2006; Zavala-Tecuapetla et al., 2008; Lalley and Mifflin, 2012; Ramírez-Jarquín et al., 2012), a more detailed description of respiratory circuit configurations is emerging from structural imaging (Hartelt et al., 2008; Mironov, 2009) and the evaluation of cell assemblies while maintaining single-cell resolution using

dynamic calcium imaging (Okada et al., 2012; Gourévitch and Mellen, 2014) or multielectrode arrays (MEAs; Segers et al., 2008; Galan et al., 2010; Morris et al., 2010; Ott et al., 2011; Carroll and Ramirez, 2013; Carroll et al., 2013). These techniques allow functional network analysis and may reveal distinct configurations of neural circuits in control conditions or under various physiological and/or pathological conditions (Ramirez et al., 2004; Carrillo-Reid et al., 2008; Mironov, 2009; Jaidar et al., 2010; Peña et al., 2010).

The preBötC is able to adjust its function to fit different metabolic demands by acquiring different configurations (Richter et al., 1991; Ballanyi et al., 1994; England et al., 1995; Ramirez et al., 1998; Peña, 2009; Rivera-Angulo and Peña-Ortega, 2014). The network focused studies of the respiratory network have started to reveal that the preBötC forms dense clusters of respiratory cells with occasional connections between them (Hartelt et al., 2008; Mironov, 2009; Gaiteri and Rubin, 2011) that can be reconfigured in a cycle-by-cycle manner (Carroll et al., 2013; Carroll and Ramirez, 2013; Koshiya et al., 2014). Modeling based on this evidence indicates that the activity of the preBötC is highly dependent on its circuit configurations, the intrinsic dynamics of neurons at central network positions, and the strength of synaptic connections between neurons (Gaiteri and Rubin, 2011). These results suggest that the study of circuit configurations and reconfigurations is key to understand the flexibility of breathing generation during different metabolic states (Mironov, 2009; Galan et al., 2010). One of the extreme examples of respiratory network flexibility is the reconfiguration process that this network undergoes under extreme hypoxic conditions (Lieske et al., 2000; Peña and Ramirez, 2005; Rivera-Angulo and Peña-Ortega, 2014): Lieske et al. (2000) documented that this process allows the preBötC to change its burst pattern from fictive-eupnea in normoxia to fictive-gasping in hypoxia. Since the changes in the burst pattern as well as in firing patterns of respiratory neurons observed in the brainstem slice preparation closely resemble those observed *in vivo* during the transition from actual eupnea to actual gasping, we adopted the term “fictive” to refer to those patterns generated by the preBötC *in vitro* (Lieske et al., 2000; Lieske and Ramirez, 2003). Extensive cell-focused studies revealed some of the changes in both the intrinsic and synaptic properties of the respiratory neurons involved in this transition (Richter et al., 1991; Ballanyi et al., 1994; Ramirez et al., 1998; Lieske et al., 2000; Thoby-Brisson and Ramirez, 2000; Peña et al., 2004; Paton et al., 2006; Zavala-Tecuapetla et al., 2008; Ramírez-Jarquín et al., 2012). However, the main changes in circuit configuration when passing from normoxia to hypoxia have not been described. With the help of multi-electrode array (MEA) recordings (Lindsey et al., 2000; Segers et al., 2008; Galan et al., 2010; Ott et al., 2011; Carroll and Ramirez, 2013; Carroll et al., 2013), we wanted to establish whether the respiratory network reconfiguration in hypoxia involves changes in the number of active respiratory elements, in the functional connections among the elements, or in the strength of these functional connections. The other aim of this study was to characterize the changes in respiratory network configuration upon the application of a citric acid cycle intermediate (isocitrate), particularly during fictive-gasping generation (Rivera-Angulo and Peña-Ortega, 2014). Since a failure

to generate gasping has been linked to Sudden Infant Death Syndrome (SIDS; Lijowska et al., 1985; Poets et al., 1999; Peña and García, 2006; Peña, 2009), the study of gasping generation, as well as the identification of pharmacological approaches to promote it, may have clinical relevance as a preventive intervention in babies at risk for SIDS (Peña and García, 2006; Peña, 2009).

We have recently shown that supplementation of the respiratory network with the metabolic intermediate isocitrate increases preBötC activity in normoxia and favors gasping generation in hypoxia both *in vitro* and *in vivo* (Rivera-Angulo and Peña-Ortega, 2014). Several metabolic intermediates can modulate both the intrinsic and the synaptic properties (Dehaven and Carpenter, 1964; Böhmer et al., 1976; Chaplain et al., 1976; Dinse et al., 1976; Shoji, 1992) of neurons in different networks, including those in the respiratory network (Dehaven and Carpenter, 1964; Böhmer et al., 1976; Chaplain et al., 1976; Dinse et al., 1976), therefore we hypothesized that isocitrate could influence respiratory network configuration and also modulate its reconfiguration in hypoxia.

We analyzed neuronal activity recorded by two types of respiratory recording elements: those arising from single neurons (unitary activity) and those arising from groups of neurons [multiunitary activity (MUA)] (Kirkwood, 1979; Kashiwagi et al., 1993; Shen et al., 2002; Li et al., 2003; Eugenin et al., 2006; Segers et al., 2008; Ott et al., 2011; Lalley and Mifflin, 2012; Road et al., 2013). We used the correlated firing among respiratory elements as an assessment of “functional connectivity,” and the correlation value was assumed to be proportional to the connectivity strength (Kirkwood, 1979; Kashiwagi et al., 1993; Shen et al., 2002; Li et al., 2003; Eugenin et al., 2006; Segers et al., 2008; Ott et al., 2011; Lalley and Mifflin, 2012; Road et al., 2013). We did not investigate how many of these functional connections are formed by real synaptic connections and how many of them were synchronized by other elements of the net. Finally, we built correlation linkage maps in order to illustrate and compare functional configurations of the respiratory circuit in the different experimental conditions (Segers et al., 2008; Ott et al., 2011). Surprisingly, and in contrast with previous suggestions from cell-focused studies (Peña, 2009), our results show that during the transition to fictive-gasping generation, the number of active respiratory elements, their activity (firing frequency), and the number of their functional links do not change dramatically. In contrast, the main change in the reconfiguration of the respiratory network during hypoxia involved a complex modification of the amount of correlated activity between the elements of the circuit, suggesting a global reduction in the strength of network interactions. Interestingly, isocitrate prevents these changes in the strength of circuit connectivity under hypoxic conditions.

MATERIALS AND METHODS

ANIMALS

Experiments were performed using 6–9-day-old (P6–P9) CD-1 mice ($N = 12$). All experimental protocols were approved by the local Committee on Ethics of Animal Experimentation (INB-UNAM). Experiments were performed according to the Mexican Official Norm for the Use and Care of Laboratory Animals (NOM-062-ZOO-1999).

BRAINSTEM SLICE PREPARATION

Details of the slice preparation have been previously reported (Peña et al., 2004, 2008). Briefly, animals were anesthetized and decapitated, and the brainstem was quickly removed and placed in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (ACSF) constantly bubbled with carbogen (95% O₂ and 5% CO₂). The ACSF contained (in mM) 119 NaCl, 3 KCl, 1.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 25 NaHCO₃, and 30 D-glucose (pH 7.4). The brainstem was glued rostral-end upward onto an agar block, mounted on a vibratome (Vibratome Company, St. Louis, MO), and serially sliced until the rostral boundary of the preBötC was identified using anatomical landmarks such as the disappearance of the facial nucleus and appearance of the inferior olive as well as the ambiguous and hypoglossal nuclei (**Figure 1A**). A single slice (550 μm thick; Peña and Ramirez, 2002) per animal was obtained and transferred into a recording chamber with a total volume of 2 ml and containing a MEA at the bottom (Multi-Channel Systems; Reutlingen, Germany; **Figure 1A**). There, the slice was continuously perfused by recirculating 200 ml ACSF at a flow rate of 10 ml/min and constantly bubbled with carbogen to ensure efficient oxygenation and exchange of the solution (Peña et al., 2004, 2008; Zavala-Tecuapetla et al., 2008, 2014). A temperature controller (Multi-Channel Systems; Reutlingen, Germany) maintained the temperature at 30 ± 1°C. To allow long-term recordings of rhythmic population activity, extracellular KCl was elevated from 3 to 8 mM over a span of 75 min before starting the recordings (Tryba et al., 2003; **Figure 1A**). Hypoxic conditions were induced by removing carbogen and bubbling the ACSF for 15 min with 95% N₂ and 5% CO₂ (Peña et al., 2004, 2008 **Figure 1A**). Our experimental conditions are almost identical to those used and characterized by Hill et al. (2011). When ACSF was bubbled with carbogen under these conditions, the PO₂ in the recording chamber was 679 ± 30 Torr, while at a depth of 300 μm within the slices, PO₂ was 58 ± 16 Torr, which can be considered normoxic conditions (Hill et al., 2011). In contrast, when ACSF was bubbled with 95% N₂ and 5% CO₂, the PO₂ in the recording chamber was 38 ± 28 Torr, while 300 μm deep in the slices PO₂ was 5 ± 6 Torr, which can be considered hypoxic (Hill et al., 2011). Isocitrate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was bath applied at a final concentration of 3 mM for 1 h, as previously reported using the same preparation (Hülsmann et al., 2000; Rivera-Angulo and Peña-Ortega, 2014). Fresh, 1000× isocitrate stock solution was prepared by dissolving it in distilled water. The last 10 min of isocitrate application or hypoxia, along with 10 min of control, were used for the analysis (Rivera-Angulo and Peña-Ortega, 2014).

RECORDINGS

Multisite extracellular recordings were performed using the MEA2100-system (Multi-Channel Systems, Reutlingen, Germany; **Figure 1A**). A 60-electrode array (TiN/SiN) is composed of a 6 × 10 grid with 100-μm inter-electrode spacing and 30-μm electrode diameter (**Figure 1A**). Data acquisition was controlled by MC_Rack software (Multi-Channel Systems Reutlingen, Germany). Raw data was digitized at 25 kHz and stored in a personal computer for off-line analysis.

ANALYSIS

To evaluate the population burst pattern of preBötC activity we measured the peak-to-peak amplitude of the raw signal every 45 ms. By averaging the amplitude signals for several bursts, it is possible to clearly distinguish the changes in burst pattern occurring during the transition from fictive-eupnea to fictive-gasping (**Figure 1A**, inset; Lieske et al., 2000; Lieske and Ramirez, 2003; Peña et al., 2008). Recordings were pass-band filtered (250–7000 Hz) with MC_Rack Software (Multi-Channel Systems, Reutlingen, Germany). The channels exhibiting respiratory activity were selected (an average of 25 channels covering an area of 400 by 400 μm; **Figure 1A**; Carroll and Ramirez, 2013). Filtered channels containing the high frequency component of neural activity were exported to an OFFline Sorter program (v. 3.3.1; Plexon Inc., USA; Carroll and Ramirez, 2013). Files of those recordings were merged using PlexUtil program (v. 4.0.1; Plexon Inc., USA) with the last 10 min of isocitrate and/or hypoxia recordings merged to 10 min of control recordings. Back in OFFline Sorter, spikes were detected by setting a threshold 2.6 *SD* of the signal (Supér and Roelfsema, 2005; Galan et al., 2010), and individual units were distinguished from biological and electrical noise through principle component analysis (PCA) of the spike waveform patterns (**Figure 1B**; Supér and Roelfsema, 2005; Galan et al., 2010), with a semi-automatic approach using the standard expectation-maximization algorithm from OFFline sorter. When rhythmic spiking activity could not be classified as coming from individual respiratory units (unitary), we recorded MUA produced by a cluster or group of neurons (Bedenbaugh and Gerstein, 1997; Supér and Roelfsema, 2005). In such a case, to decrease the noise in multiunit activity, the threshold for spike detection was raised to 4.0 *SD* of the signal. Spikes that occurred within the refractory period (set as 2 ms) of the selected units or multiunits (always less than 0.5%) were discarded (**Figure 1B**). The sorting was verified by the existence of a refractory period in the interspike interval histogram (2 ms), as well as auto- and cross-correlation histograms examined with Neuroexplorer (v. 4.126, Nex Technologies, USA; **Figure 1B**), as a check on sorting results (Bedenbaugh and Gerstein, 1997; Supér and Roelfsema, 2005). Timestamps of unitary and multiunitary recordings were used to build raster plots (**Figure 2A**), which were exported to MATLAB (version R2011b) to be further analyzed with custom-made routines. Detected spikes were converted to binary times of occurrence with a 1-ms bin (**Figures 1B, 2A**). The quasi-simultaneous occurrence of action potentials among pairs of respiratory units and/or multiunits was assessed by means of cross-correlation analysis (**Figure 3A**; Perkel et al., 1967; Kirkwood, 1979; Kashiwagi et al., 1993; Bedenbaugh and Gerstein, 1997; Shen et al., 2002; Li et al., 2003; Supér and Roelfsema, 2005; Eugenin et al., 2006; Segers et al., 2008; Ott et al., 2011; Lalley and Mifflin, 2012; Road et al., 2013) with a lag window of ± 5 ms (**Figure 3A**). Autocorrelation and cross-correlation functions were normalized to the firing rate to assure that any change in correlation values was independent of changes in firing frequency (Nini et al., 1995; Heimer et al., 2002). Cross-correlations were considered significant when the correlation peak reached values > 5 *SD* of the correlation noise (>99.9% confidence interval). We calculated the mean frequency

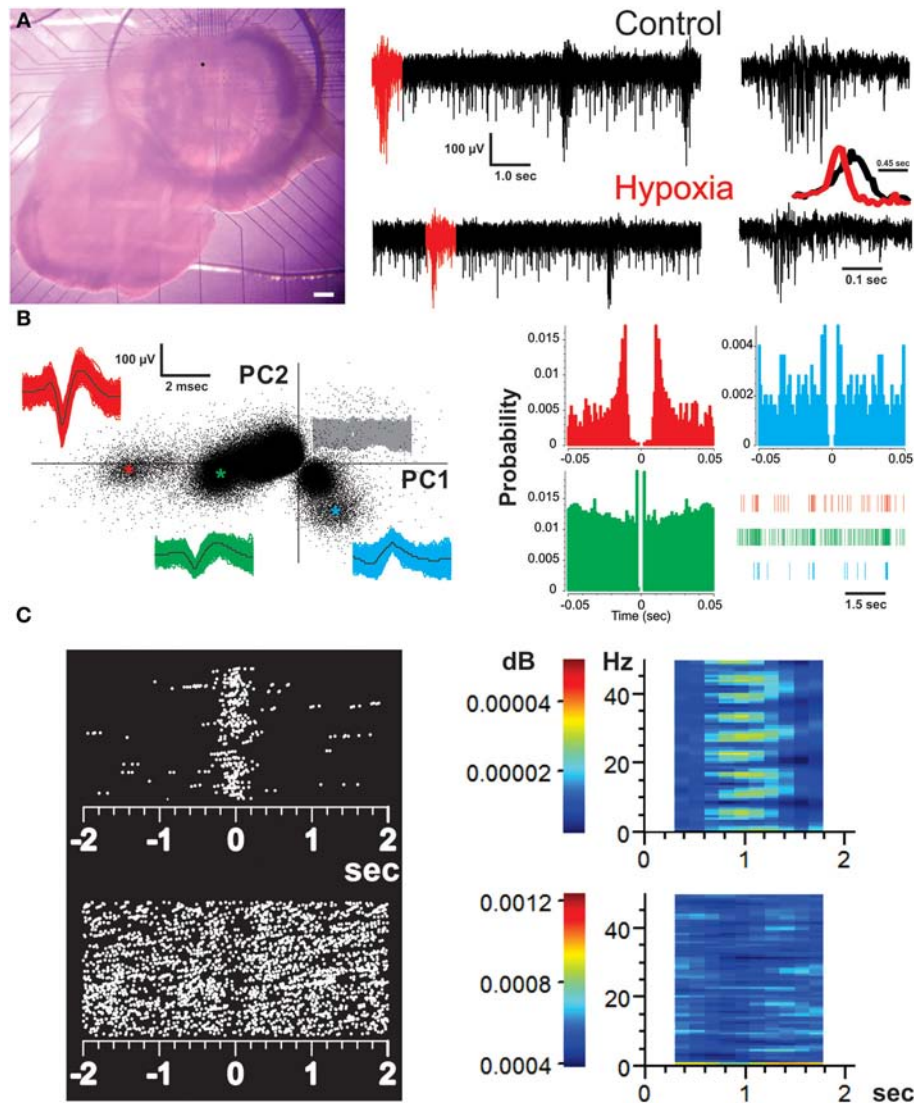
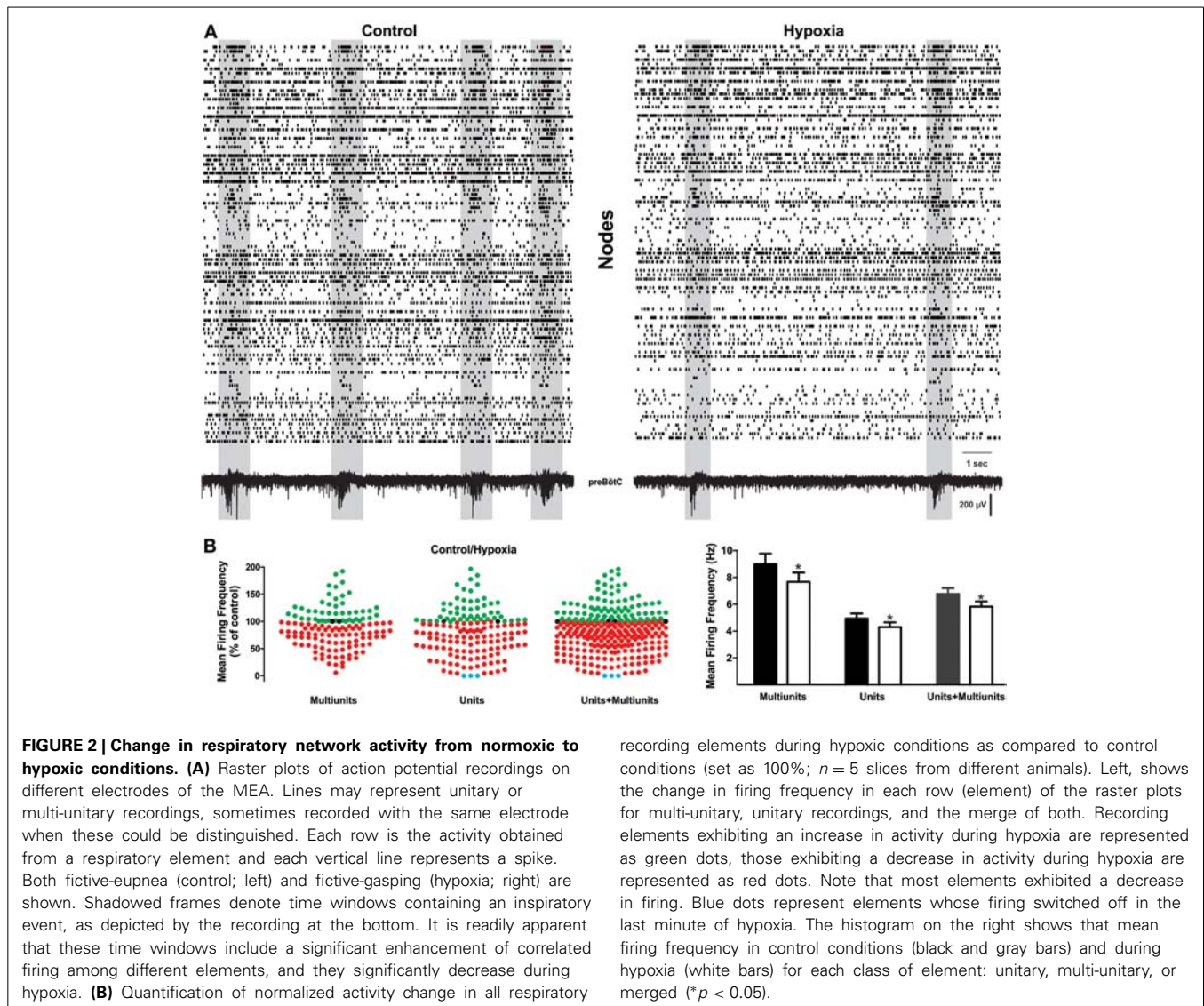


FIGURE 1 | Recording of the respiratory network with multielectrode arrays (MEAs) and identification of respiratory units. (A) Micrograph of a brainstem slice preparation on top of a MEA that covers the area of the ventral respiratory group (including the preBötC). Scale bar represents 200 μm. The dot on the slice represents the location of the MEA electrode from which the recordings represented on the right were taken. The recordings from the chosen electrode show spontaneous activity of the preBötC in normoxic (control) and hypoxic conditions. The bursts in red were expanded on the right to better appreciate the difference in burst pattern between fictive-eupnea (control) and fictive-gasping (hypoxia). The inset shows the averaged peak-to-peak amplitude for 30 bursts in normoxia (black) and hypoxia (red). Note the reduction in burst duration and rise-time in those bursts generated in hypoxia. **(B)** Spike sorting analysis of the chosen

electrode to discriminate individual respiratory units recorded from it. The graph on the left is a two dimensional feature space spanned by the weights of the first and second principal components (PC1 and 2). Each point indicates one threshold-crossing event (2.6 SD of noise). The insets show all spike waveforms (and their mean in black) obtained from the individual clusters identified by colors (as * in the PC plot). The signals belonging to the noise (central clusters) are represented in gray. The corresponding auto-correlograms on the right (color-coded as on the left) display clear refractory periods. A raster of each unit in a given time is provided. Each vertical line represents a spike. **(C)** Perievent raster plots (left) and perievent spectrograms (right) of representative inspiratory (top) and expiratory (bottom) neurons. Each dot represents a spike. Color bars in the spectrograms represent the power value.

of recordings for both units and multiunits. The reciprocal of the median inter-spike intervals (ISI) was taken to obtain an approximation of intraburst frequency of inspiratory neurons (Galan et al., 2010). Our analysis included both inspiratory and expiratory neurons (or non-inspiratory neurons). Correlation linkage matrices were built for each slice in each experimental condition

(Figures 3B, 5A; Segers et al., 2008; Ott et al., 2011). The matrices contain the correlation value of those interactions that reached the significance threshold (5 SD of correlation noise); correlations that did not reach this threshold received a value of zero (Figures 3A, 5A). To compare the strength of the correlations in the presence of hypoxia and/or isocitrate, we subtracted the



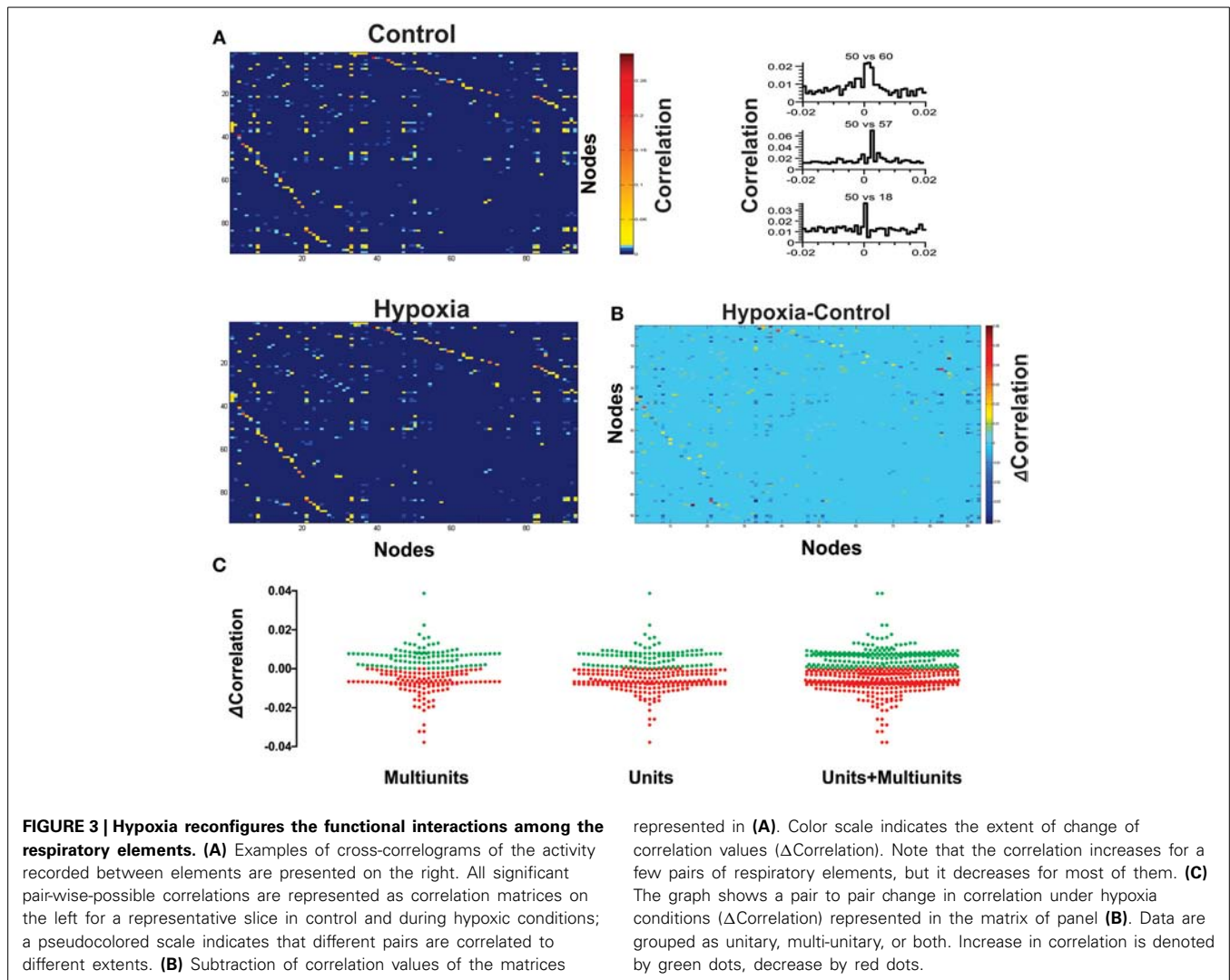
control correlation matrix from the correlation matrices in any given experimental conditions and used the resulting values as the change in correlation (Δ Correlation) (Figures 3B, 5B). Similarly, the correlation matrices in the presence of isocitrate were subtracted from the control matrices in hypoxic conditions in the presence of isocitrate. The graphic representation of the network in any given condition was made with the open access software Cytoscape (Cytoscape Consortium).

All quantifications were grouped by unitary, multi-unitary, or the merge of both. Representative data are given as mean \pm s.e.m., and the median frequency is reported with the interquartile range. Statistical differences among groups were tested using either a paired or unpaired Student's *t*-test or Repeated Measures ANOVA followed by a *post-hoc* pair-wise Tukey's or Dunnett's test as needed using GraphPad Prism and, in a few cases, (as for median frequency) Kruskal-Wallis ANOVA followed by the Dunn's test. Statistical significance was accepted at p -values < 0.05 .

RESULTS

CHANGES IN THE RESPIRATORY NETWORK DURING HYPOXIA

Brainstem slices were placed on top of 6×10 MEA arrays (Figure 1A) and recorded in an area including the preBötC. They show the typical fictive-eupnea activity generated by the preBötC in control conditions and the change in burst pattern that characterizes the transition to fictive-gasping (fewer, shorter, sudden, and decreasing bursts; Lieske et al., 2000; Peña, 2009) in hypoxia (Figure 1A, inset). From the MEA recordings of 12 slices, a total of 427 respiratory units (17 to 59 per slice; Figure 1B) and 322 multi-unitary recordings (13–44 per slice; Hartelt et al., 2008; Mironov, 2009) were included. Thus, a total of 560,252 pair-wise cross-correlations were performed, and 0.5% of those correlations exhibited significant peaks with values $5 SD$ above the correlation noise (confidence interval $> 99.9\%$) and within a lag period of ± 5 ms. As expected, respiratory multiunitary recordings exhibited inspiratory activity. Of the unitary recordings, 87% were also identified as inspiratory units (range: 73–100%)



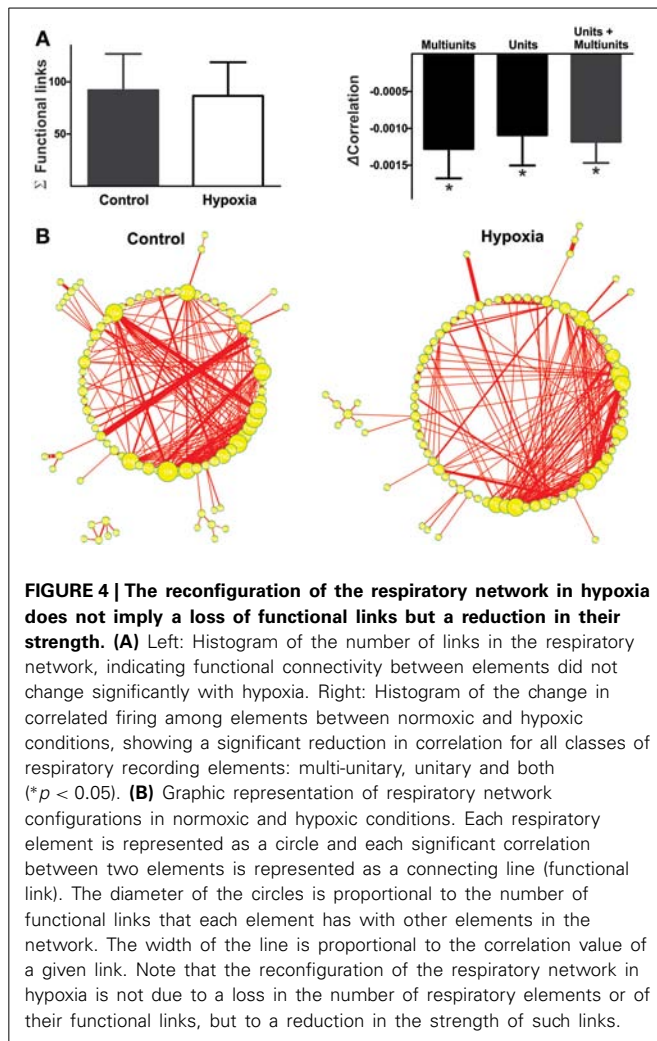
(Figures 1C, 2A). The rest of the respiratory units (13%; range: 0–27%) were cataloged as expiratory or non-inspiratory units (Figures 1C, 2A).

Representative raster plots of the preBötC activity are displayed in Figure 2A in control conditions (Figure 2A, left) and at the end of the hypoxic period (15 min; Figure 2A, right). Each row in the raster plots represents the activity obtained from a respiratory element recorded from an electrode of the MEA. Rows include both unitary (bottom) and multi-unitary (top) recordings (Figure 2A). From these activity rasters and from the quantification of the firing frequency, it can be observed that the transition from fictive-eupnea to fictive-gasping activity involves diverse, and even opposed, changes in firing frequency (Figure 2) for different elements recorded by the electrodes of the MEA. A subset of neurons clearly increase their firing frequency to $135 \pm 6\%$ (mean \pm s.e.m.) of the control (Figures 2B, 4), whereas another subset of neurons decrease their firing rate to $64 \pm 2\%$ of the control (Figure 2B). However, a larger proportion (66%) of the neurons decrease their firing rate. Globally, the average firing rate in the circuit

decreases in hypoxia to $88 \pm 3\%$ of the control ($p < 0.05$; Figure 2B).

To approximate the change in intraburst frequency in hypoxia (Galan et al., 2010), we measured the inverse of the median interspike interval, which had a median value in control conditions of 5.26 Hz (interquartile range: 1.72–12.82 Hz) and was significantly reduced to 3.81 Hz in hypoxia (interquartile range: 1.16–11.43 Hz). Surprisingly, very few elements (0.4%) of the net stopped firing (Figure 2B; blue dots). These results contrast with previous suggestions by cell-focused studies, using patch clamp recordings in synaptically isolated neurons (Peña, 2009). Therefore, as a first conclusion, hypoxia shuts down the activity of very few respiratory neurons; on the contrary, it may increase the firing frequency of many of them. In general, however, the dominant tendency is a decreased firing frequency in most recorded elements and thus, reduced global network activity (Figure 2B).

Next, we proceeded to characterize network interactions by means of cross-correlation analysis among respiratory elements (Figure 3). Cross-correlograms obtained from pairwise analysis between elements in a given slice exhibit a wide variety



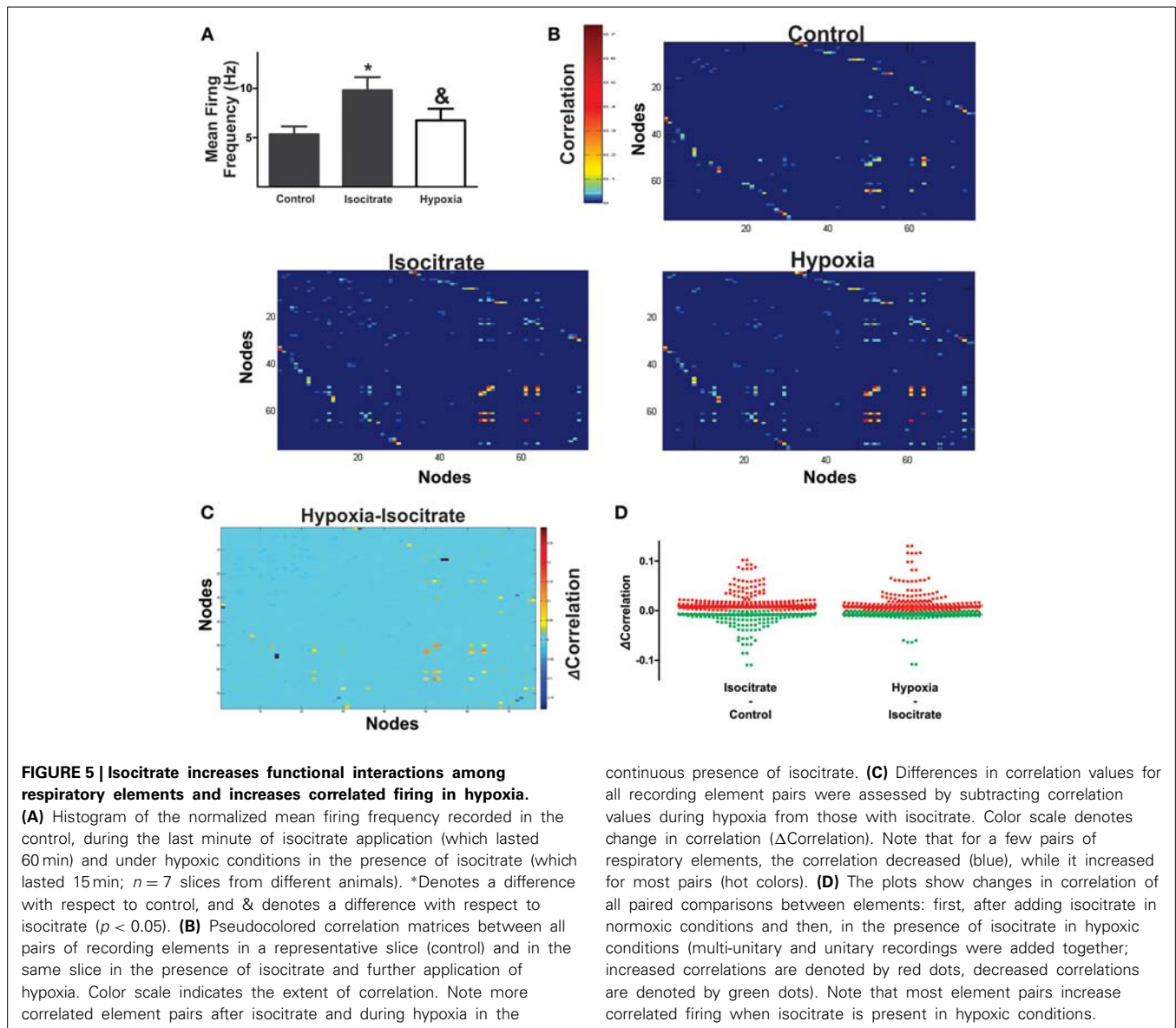
of shapes (Figure 3A, right): peaks that included the zero lag (38% for the network shown in Figure 3A), peaks with lags between 0.1 and 2 ms (37% for the network shown in Figure 3A), and peaks with lags between 2.1 and 5.0 ms (25% for the network shown in Figure 3A). Of the correlograms that exhibited a peak at zero, some were broad peaks (25%) and the rest were sharp peaks (75% of the network shown in Figure 3A). As already mentioned, only correlations with peaks $> 5 SD$ of the noise correlation were considered functional connections and included in correlation linkage matrices. In general, the larger the correlation values above this threshold, the stronger we considered the strength of the functional connections between the elements recorded by the electrodes of the MEA to be (Figure 3A). Correlation linkage matrices reveal that the strength of the interactions among respiratory elements is quite diverse (Figure 3A). Moreover, such interactions among respiratory elements change during the reconfiguration of the respiratory network in hypoxia (Figure 3). While the correlation value of some links increased during hypoxia, in most links it decreased (Figures 3B,C), suggesting that the strength of network interaction is diminished (Figures 3C, 4A). The averaged change in correlation (Δ Correlation) was significantly negative for units,

multiunits, and both (Figure 4A). Despite this reduction in the strength of the functional links among elements in hypoxic conditions, the actual number of functional links in the network remained unaltered in hypoxia (92 ± 35 in normoxia and 87 ± 33 in hypoxia Figure 4A; NS, $N = 5$ slices). Figure 4B illustrates the configuration of the respiratory network both in normoxic and hypoxic conditions. Elements are denoted by circles and functional links by lines; the larger the circle, the more connections it has. Thicker lines mean more correlated firing between the elements involved. In summary, the respiratory circuit exhibits a significant decrease in overall activity and a significant parallel decrease in the strength of functional connectivity, but neither the number of active neurons nor the number of functional connections changed significantly (Figure 4B).

ACTIONS OF ISOCITRATE DURING NORMOXIA AND HYPOXIA

As previously reported (Hülsmann et al., 2000; Rivera-Angulo and Peña-Ortega, 2014), isocitrate has an excitatory effect on the respiratory network. Upon isocitrate application during normoxia, most of the respiratory elements (84%) registered increases in firing frequency to $463 \pm 45\%$ of the control, whereas another small subset of elements recorded decreases in firing rate to $58 \pm 38\%$ of the control (Figure 5A). Intra-burst firing frequency exhibited a median of 2.39 Hz (interquartile range: 0.85–10.36 Hz) in control conditions and was significantly increased by isocitrate to 4.57 Hz (interquartile range: 1.89–15.15 Hz).

Correlation matrices show that isocitrate increases the strength of most of the functional links among respiratory elements (Figures 5B–D). Thus, the averaged change in correlation (Δ Correlation) was significantly positive upon isocitrate application (Figure 6A). Despite this increase in the strength of the functional links among elements upon isocitrate application, the actual number of functional links in the network remained unaltered (133 ± 21 in normoxia and 108 ± 18 in isocitrate, Figure 6A; NS; $n = 7$ slices; $p > 0.05$ by means of ANOVA). Figure 6B illustrates the change in respiratory network configuration in the presence of isocitrate, showing that isocitrate increases not only the activity of the respiratory elements (Figure 5A) but also the strength of the functional links in the circuit in normoxic conditions. A question is whether isocitrate can prevent the loss of activity and sustain strong functional connectivity in case hypoxia supervenes (since its clinical action would be to prevent vulnerable children from entering into the hypoxic state; Peña and García, 2006). To answer this, we then subjected the isocitrate-treated tissue to hypoxic conditions (Figures 5, 6). It was seen that during hypoxia firing significantly decreased, returning to control levels (Figure 5A). Intra-burst frequency was reduced to a median of 2.47 Hz (interquartile range: 1.05–8.99 Hz), which is not significantly different from the median firing frequency before isocitrate application (2.39 Hz) but was significantly smaller than in the presence of isocitrate in normoxia (4.57 Hz). In spite of the reduction in firing frequency in hypoxia, isocitrate increased the strength of functional links in hypoxic conditions (Figures 5B–D, 6A). Since the correlation value of most functional links among respiratory elements increased when hypoxia was applied in the presence of isocitrate (Figures 5C,D), the averaged change in correlation (Δ Correlation) was a significant positive value when

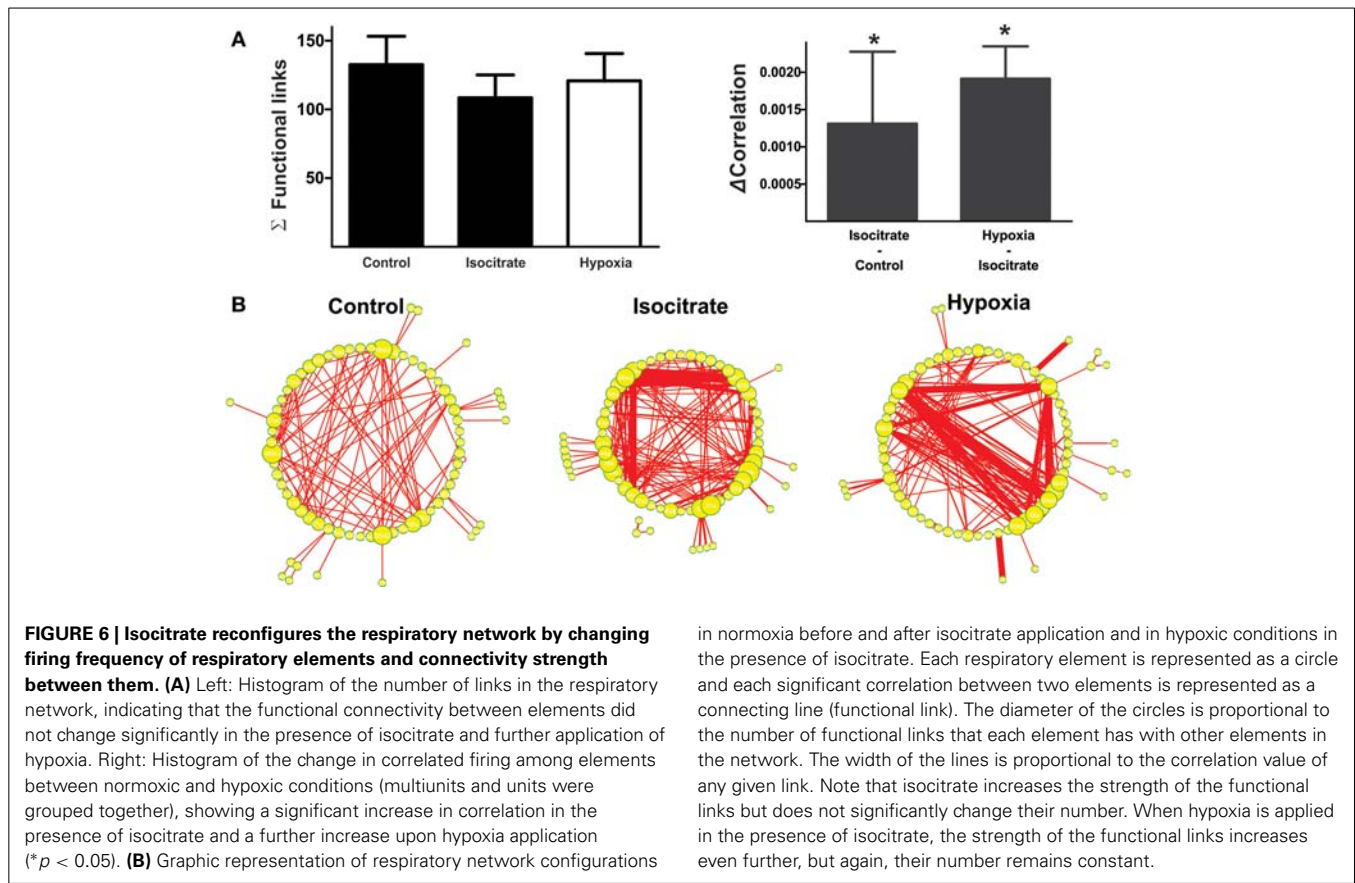


compared with its normoxic value in the presence of isocitrate (Figure 6A). Although recorded elements of the respiratory network show a decreased firing rate in hypoxic conditions in the presence of isocitrate (Figure 5A), the strength of the functional links of the circuit is increased as compared with normoxic conditions in the presence of isocitrate (Figure 6B). Note that this is contrary to what happens in slices in the absence of isocitrate (Figure 4B).

DISCUSSION

The reconfiguration of the respiratory CPG that transforms the preBötC network from a control configuration that generates fictive-eupnea in normoxia to a hypoxic configuration that generates fictive-gasping involves complex changes at single-cell and network levels (Ramirez et al., 2007, 2013; Peña, 2009). Here, we studied this reconfiguration by MEA recordings and analyzed three possible contributions to such a change: changes either in

the number of respiratory elements recorded by the MEA electrodes, changes in the functional connections among elements, and/or changes in the strength of these connections assessed by their correlated firing. We found that the reconfiguration of the respiratory network in hypoxia does not involve a significant change in the number of respiratory elements participating in network dynamics (Figure 3) or in the number of functional links among them (Figure 4). Instead, it involves changes in firing frequency and in the strength of functional connectivity among network elements (Figures 3–5). Moreover, we found that the metabolic intermediate isocitrate, by itself, changes the respiratory network configuration, increasing the strength of functional connectivity even in normoxia thereby preventing the loss of this strength during hypoxia, so that the circuit does not reach the low levels of functional connectivity found in untreated hypoxic slices. Isocitrate also increases the average firing rate of the recorded elements (Figure 5A).



Changes in respiratory network configuration leading to gasping generation have both basic and clinical implications. On the one hand, it might represent the best example of an acute and reversible network reconfiguration in a mammalian CPG (Ramirez et al., 2007; Peña, 2009), and on the other hand, understanding the cellular basis of gasping generation would help to understand SIDS pathophysiology, since babies who die from SIDS have defects in the mechanisms generating gasping and autoresuscitation (Lijowska et al., 1985; Poets et al., 1999).

Since the seminal study by Lieske et al. (2000), it has been shown that the CPG located in the preBötC is not a fixed network, but rather a highly flexible, neural circuit that can change its configuration, functionally adapting to the metabolic demands that several physiological and pathological conditions impose on breathing generation (Peña and Ramirez, 2005; Ramirez et al., 2007; Mironov, 2009; Peña, 2009; Galan et al., 2010). Reconfiguration of the respiratory network under hypoxic conditions was proposed many years ago (Lieske et al., 2000). However, other than inferences obtained by cell-focused studies (Richter et al., 1991; Ballanyi et al., 1994; Ramirez et al., 1998; Lieske et al., 2000; Thoby-Brisson and Ramirez, 2000; Peña et al., 2004; Paton et al., 2006; Zavala-Tecuapetla et al., 2008; Ramírez-Jarquín et al., 2012), there was almost no way to globally assess circuit configuration of the preBötC in both conditions (normoxia and hypoxia). Consistent with our findings, previous studies predicted that hypoxia produces a heterogeneous effect on both the

intrinsic (St. John and Bianchi, 1985; Richter et al., 1991; Ballanyi et al., 1994; England et al., 1995; Ramirez et al., 1998; St. John, 1999; Lieske et al., 2000; Thoby-Brisson and Ramirez, 2000; Peña et al., 2004; Paton et al., 2006; Zavala-Tecuapetla et al., 2008) and the synaptic properties (Richter et al., 1991; Ballanyi et al., 1994; Ramirez et al., 1998; Lieske et al., 2000; Thoby-Brisson and Ramirez, 2000) of respiratory neurons. However, whereas some cell-focused studies reported that hypoxia depressed the firing of large subsets of respiratory neurons (St. John and Bianchi, 1985; Richter et al., 1991; Ballanyi et al., 1994; England et al., 1995; St. John, 1999; Thoby-Brisson and Ramirez, 2000) others showed that hypoxia increased (Richter et al., 1991; Lovering et al., 2006) or did not change the firing of neurons within the respiratory network (Lieske et al., 2000; Thoby-Brisson and Ramirez, 2000; Lovering et al., 2006). Regarding synaptic transmission, the most consistent observation is that hypoxia depressed synaptic inhibition within the preBötC (Richter et al., 1991; Ballanyi et al., 1994; England et al., 1995; Schmidt et al., 1995; Ramirez et al., 1998; Lieske et al., 2000; Thoby-Brisson and Ramirez, 2000), and in agreement with the present findings, the effects of hypoxia on synaptic excitation were diverse (Ballanyi et al., 1994; Ramirez et al., 1998). Using a network approach we could determine the suspected heterogeneity of the effects of hypoxia on the preBötC. For instance, the change in firing frequency upon hypoxia showed both elements that decreased and others that increased their firing frequency (St. John and Bianchi, 1985; Richter et al., 1991;

Ballanyi et al., 1994; England et al., 1995; St. John, 1999; Lieske et al., 2000; Thoby-Brisson and Ramirez, 2000; Lovering et al., 2006). Nevertheless, we did not observe the switching off of many neurons, which had been suspected from cell-focused approaches (St. John and Bianchi, 1985; Richter et al., 1991; Ballanyi et al., 1994; England et al., 1995; St. John, 1999; Thoby-Brisson and Ramirez, 2000) and was recently incorporated into the current model of the network reconfiguration of the preBötC in hypoxia (Ramirez et al., 2007; Peña, 2009; Garcia et al., 2013). Using functional connectivity, as is done in systems neurophysiology (Lindsey et al., 2000; Segers et al., 2008; Ott et al., 2011), we also observed the predicted heterogeneity in the changes of connections and interactions during hypoxic conditions (Ballanyi et al., 1994; Ramirez et al., 1998) and provided quantitative evidence that these changes in functional coupling, and not a change in the number of respiratory elements or the number of functional links among them, seem to be a major component of the respiratory network reconfiguration in hypoxia.

Here we considered as “respiratory recording nodes” all electrodes in the array capable of recording both unitary and multi-unitary activity (Bedenbaugh and Gerstein, 1997; Supér and Roelfsema, 2005), as shown in different brain regions (Bedenbaugh and Gerstein, 1997; Supér and Roelfsema, 2005; Segers et al., 2008; Morris et al., 2010; Lalley and Mifflin, 2012; Road et al., 2013). Anatomical imaging studies have shown that the preBötC is constituted of clusters of highly connected respiratory neurons (Hartelt et al., 2008; Mironov, 2009); thus, multi-unitary respiratory activity is a logical outcome for the recording nodes in the MEA. However, including MUA in a network analysis may require some caution (Bedenbaugh and Gerstein, 1997; Supér and Roelfsema, 2005). For example, the changes in firing rate of individual neurons constituting a given MUA would not be perfectly reflected by the MUA firing rate if different neurons within the cluster have simultaneous but opposing effects on the firing rate (Bedenbaugh and Gerstein, 1997; Supér and Roelfsema, 2005). Additionally, the source of functional interactions (measured as a significant cross-correlation) among MUAs, or between a MUA and unitary activity, or the change in such interactions in a given experimental condition, can never be assigned to a specific pair of cells within the MUAs or to a specific cell when a MUA is correlated with a well-defined unit (Bedenbaugh and Gerstein, 1997; Supér and Roelfsema, 2005). In fact, a change in a correlation involving a MUA due to an experimental condition could just reflect a change in the composition of the neurons contributing to the MUA in this condition (Bedenbaugh and Gerstein, 1997; Supér and Roelfsema, 2005). Analyses including respiratory MUAs have provided relevant information in the past (Segers et al., 2008; Morris et al., 2010; Lalley and Mifflin, 2012; Road et al., 2013), and the global changes reported in this study were similar whether they were quantified from unitary, multi-unitary recordings, or the merge of both (Figures 2–4). Importantly, we evaluated the respiratory network configuration including interactions that occur within 5 ms (Perkel et al., 1967). The functional connections inducing respiratory network dynamics could be made either by synaptic connections among the recorded units or by using a shared common source to activate these units (Perkel et al., 1967; Kashiwagi

et al., 1993; Onimaru et al., 1993; Li et al., 2003; Ott et al., 2011). Further research would dissect the nature of these interactions and include them in a broader framework (Carrillo-Reid et al., 2008; Jaidar et al., 2010; Peña et al., 2010).

In this study we have determined the global changes occurring in the respiratory network configuration under hypoxic conditions by analyzing the changes in cross-correlation among the elements recorded by the “recording respiratory nodes” of a MEA, as previously done in different neural networks (Galan et al., 2010; Gerhard et al., 2011), including the respiratory network (Galan et al., 2010). As far as we know, this is the first global description of such changes during the hypoxic conditions, when actual fictive-gasping activity is being generated. Our main finding is that the reconfiguration of the respiratory network in hypoxia mainly consists of a reduction in the strength of network connectivity rather than a loss, proposed earlier, of respiratory elements (Ramirez et al., 2007; Peña, 2009; Garcia et al., 2013). The observed re-arrangements of network interactions among the respiratory elements is consistent with a previous report that a brief application of cyanide (chemical hypoxia) induced the retraction of neuronal processes of respiratory neurons, which was interpreted as a reduction in connectivity among respiratory neurons (Mironov, 2009). Moreover, this change in the strength of interactions within the respiratory network in hypoxia can be related to the uncoupling of preBötC activity from one of its motor outputs (the hypoglossal nucleus) during fictive-gasping generation (Ramirez et al., 1998; Peña et al., 2008). However, the activity of the phrenic nerve is also uncoupled from hypoglossal nerve activity in hypoxia, which may explain why, under hypoxic conditions, the amplitude of the phrenic output is not reduced (St-John et al., 2004; St. John and Leiter, 2009). Thus, there are two possible explanations for the fact that the amplitude of phrenic output is maintained, or even increases, in hypoxia, despite the reduced connectivity within the respiratory rhythm generator: First, although preBötC bursts are certainly shorter than those in normoxia, their amplitude is not reduced (Figure 1A, inset; Peña et al., 2008). Second, in more intact conditions, modulations provided by respiratory circuits beyond the preBötC could help to maintain or even increase the phrenic output amplitude in hypoxia (St-John et al., 2004; St. John and Leiter, 2009). Our finding that the preBötC is able to change its population burst pattern by just changing the strength of the interactions among its elements contributes to the proposal that CPGs are not simple hardwired networks that produce simple behaviors but, on the contrary, they constitute flexible circuits that can be reconfigured in response to the environmental, behavioral, and metabolic states of the animal (Marder, 1994). These reconfigurations include changes in the number of elements, the number of functional links, and/or the strength of these connections (Marder, 1994). More experimental testing and modeling will be required to determine whether or not the changes reported in this study are necessary and sufficient to induce the respiratory pattern change that occurs in the transition from normoxia to hypoxia.

The other major finding of the present study is that isocitrate can change the preBötC configuration, which would explain why isocitrate promotes eupnea and gasping generation both

in vivo and *in vitro* (Hülsmann et al., 2000; Rivera-Angulo and Peña-Ortega, 2014) and suggests that it be used as a preventative strategy to oppose some of the changes in network configuration that occur in hypoxic conditions. It is well known that the respiratory network is very efficient in anaerobic metabolism (Ballanyi et al., 1996), and that this might be the reason why an intermediate of the Krebs cycle would potentiate the activity of the respiratory network under metabolic distress (Hülsmann et al., 2000; Rivera-Angulo and Peña-Ortega, 2014). The beneficial effects of isocitrate were observed here as an increase in the strength of network interactions in normoxia and as an increase in neuronal activity; moreover, isocitrate prevented the loss of these interactions and activity during the transition to fictive-gasping generation in hypoxia. These observations agree with the finding that application of several metabolic intermediates increases spontaneous network activity in other brain circuits by modulating action potential generation as well as synaptic transmission (Perasso et al., 2008; Gavello et al., 2012; Garbati et al., 2014). Our findings are also consistent with previous reports that, in several brain areas including the respiratory network (Dehaven and Carpenter, 1964; Böhmer et al., 1976; Chaplain et al., 1976; Dinse et al., 1976), different metabolic intermediates modulate neuronal firing and synaptic transmission (Shoji, 1992; Perasso et al., 2008; Gavello et al., 2012; Garbati et al., 2014). Nevertheless, to the best of our knowledge, this is the first evidence that a metabolic intermediate induces changes in network configuration parameters (Figure 6). Moreover, our data suggest that pharmacological manipulations that increase both respiratory neuron firing rates and the functional interactions among respiratory elements are potential pharmacological tools to promote gasping generation and autoresuscitation (Peña and García, 2006; Peña, 2009), which would have a beneficial impact in those babies at risk for SIDS (Peña and García, 2006; Peña, 2009; Ramirez et al., 2013).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Benito Ordaz for technical support and Dr. Dorothy Pless for editorial comments. Andrés Nieto-Posadas, Ernesto Flores-Martínez, Ana-Julia Rivera-Angulo, and Jesús-Esteban Pérez-Ortega are doctoral students from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowships from CONACyT. Andrés Nieto-Posadas received the fellowship No. 350947/239711. Jonathan-Julio Lorea-Hernández is a master's student from Maestría en Ciencias (Neurobiología), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received a fellowship from CONACyT. This study was supported by CONACyT Grants 151261 and 181323; and by DGAPA-UNAM Grants IB200212-RR280212 and IN206511.

REFERENCES

- Ballanyi, K., Volker, A., and Richter, D. W. (1994). Anoxia induced functional inactivation of neonatal respiratory neurones *in vitro*. *Neuroreport* 6, 165–168. doi: 10.1097/00001756-199412300-00042
- Ballanyi, K., Volker, A., and Richter, D. W. (1996). Functional relevance of anaerobic metabolism in the isolated respiratory network of newborn rats. *Pflügers Arch.* 432, 741–748. doi: 10.1007/s004240050193
- Bedenbaugh, P., and Gerstein, G. L. (1997). Multiunit normalized cross correlation differs from the average single-unit normalized correlation. *Neural Comput.* 9, 1265–1275. doi: 10.1162/neco.1997.9.6.1265
- Böhmer, G., Chaplain, R. A., and Fallert, M. (1976). Metabolic control of respiratory neuronal activity and the accompanying change-expiratory neurons. *Pflügers Arch.* 365, 61–68. doi: 10.1007/BF00583628
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Tapia, D., Hernandez-Cruz, A., Galarraga, E., Drucker-Colin, R., et al. (2008). Encoding network states by striatal cell assemblies. *J. Neurophysiol.* 99, 1435–1450. doi: 10.1152/jn.01131.2007
- Carroll, M. S., and Ramirez, J. M. (2013). Cycle-by-cycle assembly of respiratory network activity is dynamic and stochastic. *J. Neurophysiol.* 109, 296–305. doi: 10.1152/jn.00830.2011
- Carroll, M. S., Viemari, J. C., and Ramirez, J. M. (2013). Patterns of inspiratory phase-dependent activity in the *in vitro* respiratory network. *J. Neurophysiol.* 109, 285–295. doi: 10.1152/jn.00619.2012
- Chaplain, R. A., Dinse, H. R., and Fallert, M. (1976). Metabolic control of respiratory neuronal activity and the accompanying changes in breathing movements of the rabbit. 1. Mainpulation of inspiratory and expiratory-inspiratory neurons. *Pflügers Arch.* 365, 49–59. doi: 10.1007/BF00583627
- Dehaven, K. E., and Carpenter, F. G. (1964). Interaction between Co₂ and citrate ions in medullary reticular formation. *Am. J. Physiol.* 207, 298–302.
- Dinse, H. R., Fallert, M., Bohmer, G., and Chaplain, R. A. (1976). Metabolic control of respiratory neuronal activity and the accompanying changes in breathing movements of the rabbit. III. Phase shifts in respiratory neurons induced by inflation and collapse of the lung, hyperventilation, or metabolic modifiers. *Pflügers Arch.* 365, 69–75. doi: 10.1007/BF00583629
- England, S. J., Melton, J. E., Douse, M. A., and Duffin, J. (1995). Activity of respiratory neurons during hypoxia in the chemodenervated cat. *J. Appl. Physiol.* (1985) 78, 856–861.
- Eugenin, J., Nicholls, J. G., Cohen, L. B., and Muller, K. J. (2006). Optical recording from respiratory pattern generator of fetal mouse brainstem reveals a distributed network. *Neuroscience* 137, 1221–1227. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.10.053
- Gaiteri, C., and Rubin, J. E. (2011). The interaction of intrinsic dynamics and network topology in determining network burst synchrony. *Front. Comput. Neurosci.* 5:10. doi: 10.3389/fncom.2011.00010
- Galan, R. F., Dick, T. E., and Baekey, D. M. (2010). Analysis and modeling of ensemble recordings from respiratory pre-motor neurons indicate changes in functional network architecture after acute hypoxia. *Front. Comput. Neurosci.* 4:131. doi: 10.3389/fncom.2010.00131
- Garbati, P., Adriano, E., Salis, A., Ravera, S., Damonte, G., Millo, E., et al. (2014). Effects of amide creatine derivatives in brain hippocampal slices, and their possible usefulness for curing creatine transporter deficiency. *Neurochem. Res.* 39, 37–45. doi: 10.1007/s11064-013-1188-8
- García, A. J. 3rd., Rotem-Kohavi, N., Doi, A., and Ramirez, J. M. (2013). Post-hypoxic recovery of respiratory rhythm generation is gender dependent. *PLoS ONE* 8:e60695. doi: 10.1371/journal.pone.0060695
- Gavello, D., Rojo-Ruiz, J., Marcantoni, A., Franchino, C., Carbone, E., and Carabelli, V. (2012). Leptin counteracts the hypoxia-induced inhibition of spontaneously firing hippocampal neurons: a microelectrode array study. *PLoS ONE* 7:e41530. doi: 10.1371/journal.pone.0041530
- Gerhard, F., Pipa, G., Lima, B., Neuenschwander, S., and Gerstner, W. (2011). Extraction of network topology from multi-electrode recordings: is there a small-world effect? *Front. Comput. Neurosci.* 5:4. doi: 10.3389/fncom.2011.00004
- Gourévitch, B., and Mellen, N. (2014). The preBotzinger complex as a hub for network activity along the ventral respiratory column in the neonate rat. *Neuroimage*. doi: 10.1016/j.neuroimage.2014.04.073. [Epub ahead of print].
- Hartelt, N., Skorova, E., Mancke, T., Suhr, M., Mironova, L., Kugler, S., et al. (2008). Imaging of respiratory network topology in living brainstem slices. *Mol. Cell. Neurosci.* 37, 425–431. doi: 10.1016/j.mcn.2007.10.011
- Heimer, G., Bar-Gad, I., Goldberg, J. A., and Bergman, H. (2002). Dopamine replacement therapy reverses abnormal synchronization of pallidal neurons in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine primate model of parkinsonism. *J. Neurosci.* 22, 7850–7855.
- Hill, A. A., García, A. J., Zanella, S., Upadhyaya, R., and Ramirez, J. M. (2011). Graded reductions in oxygenation evoke graded reconfiguration of the isolated respiratory network. *J. Neurophysiol.* 105, 625–639. doi: 10.1152/jn.00237.2010

- Hülsmann, S., Oku, Y., Zhang, W., and Richter, D. W. (2000). Metabolic coupling between glia and neurons is necessary for maintaining respiratory activity in transverse medullary slices of neonatal mouse. *Eur. J. Neurosci.* 12, 856–862. doi: 10.1046/j.1460-9568.2000.00973.x
- Jaidar, O., Carrillo-Reid, L., Hernandez, A., Drucker-Colin, R., Bargas, J., and Hernandez-Cruz, A. (2010). Dynamics of the Parkinsonian striatal microcircuit: entrainment into a dominant network state. *J. Neurosci.* 30, 11326–11336. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1380-10.2010
- Kashiwagi, M., Onimaru, H., and Homma, I. (1993). Correlation analysis of respiratory neuron activity in ventrolateral medulla of brainstem-spinal cord preparation isolated from newborn rat. *Exp. Brain Res.* 95, 277–290. doi: 10.1007/BF00229786
- Kirkwood, P. A. (1979). On the use and interpretation of cross-correlations measurements in the mammalian central nervous system. *J. Neurosci. Methods* 1, 107–132. doi: 10.1016/0165-0270(79)90009-8
- Koshiya, N., Oku, Y., Yokota, S., Oyamada, Y., Yasui, Y., and Okada, Y. (2014). Anatomical and functional pathways of rhythmogenic inspiratory premotor information flow originating in the pre-Botzinger complex in the rat medulla. *Neuroscience* 268, 194–211. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.03.002
- Lalley, P. M., and Mifflin, S. W. (2012). Opposing effects on the phrenic motor pathway attributed to dopamine-D1 and -D3/D2 receptor activation. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 181, 183–193. doi: 10.1016/j.resp.2012.03.008
- Li, Y. M., Shen, L., Peever, J. H., and Duffin, J. (2003). Connections between respiratory neurones in the neonatal rat transverse medullary slice studied with cross-correlation. *J. Physiol.* 549, 327–332. doi: 10.1113/jphysiol.2003.040204
- Lieske, S. P., and Ramirez, J. M. (2003). Commentary on the definition of eupnea and gasping. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 139, 113–119. doi: 10.1016/S1569-9048(03)00195-2
- Lieske, S. P., Thoby-Brisson, M., Telgkamp, P., and Ramirez, J. M. (2000). Reconfiguration of the neural network controlling multiple breathing patterns: eupnea, sighs and gasps [see comment]. *Nat. Neurosci.* 3, 600–607. doi: 10.1038/75776
- Lijowska, A. S., Reed, N. W., Chiadini, B. A., and Thach, B. T. (1985). Sequential arousal and airway-defensive behavior of infants in asphyxial sleep environments. *J. Appl. Physiol.* 83, 219–228.
- Lindsey, B. G., Morris, K. F., Segers, L. S., and Shannon, R. (2000). Respiratory neuronal assemblies. *Respir. Physiol.* 122, 183–196. doi: 10.1016/S0034-5687(00)00158-4
- Lisman, J. E. (1997). Bursts as a unit of neural information: making unreliable synapses reliable. *Trends Neurosci.* 20, 38–43. doi: 10.1016/S0166-2236(96)10070-9
- Lovering, A. T., Fraigne, J. J., Dunin-Barkowski, W. L., Vidruk, E. H., and Orem, J. M. (2006). Medullary respiratory neural activity during hypoxia in NREM and REM sleep in the cat. *J. Neurophysiol.* 95, 803–810. doi: 10.1152/jn.00615.2005
- Marder, E. (1994). Invertebrate neurobiology. Polymorphic neural networks. *Curr. Biol.* 4, 752–754. doi: 10.1016/S0960-9822(00)00169-X
- Mironov, S. (2009). Respiratory circuits: function, mechanisms, topology, and pathology. *Neuroscientist* 15, 194–208. doi: 10.1177/1073858408329510
- Morris, K. F., Nuding, S. C., Segers, L. S., Baekey, D. M., Shannon, R., Lindsey, B. G., et al. (2010). Respiratory and Mayer wave-related discharge patterns of raphe and pontine neurons change with vagotomy. *J. Appl. Physiol.* (1985) 109, 189–202. doi: 10.1152/jappphysiol.01324.2009
- Nini, A., Feingold, A., Slovlin, H., and Bergman, H. (1995). Neurons in the globus pallidus do not show correlated activity in the normal monkey, but phase-locked oscillations appear in the MPTP model of parkinsonism. *J. Neurophysiol.* 74, 1800–1805.
- Okada, Y., Sasaki, T., Oku, Y., Takahashi, N., Seki, M., Ujita, S., et al. (2012). Preinspiratory calcium rise in putative pre-Botzinger complex astrocytes. *J. Physiol.* 590, 4933–4944. doi: 10.1113/jphysiol.2012.231464
- Onimaru, H., Kashiwagi, M., Arata, A., and Homma, I. (1993). Possible mutual excitatory couplings between inspiratory neurons in caudal ventrolateral medulla of brainstem-spinal cord preparation isolated from newborn rat. *Neurosci. Lett.* 150, 203–206. doi: 10.1016/0304-3940(93)90536-T
- Ott, M. M., Nuding, S. C., Segers, L. S., Lindsey, B. G., and Morris, K. F. (2011). Ventrolateral medullary functional connectivity and the respiratory and central chemoreceptor-evoked modulation of retrotrapezoid-parafacial neurons. *J. Neurophysiol.* 105, 2960–2975. doi: 10.1152/jn.00262.2010
- Paton, J. F., Abdala, A. P., Koizumi, H., Smith, J. C., and St-John, W. M. (2006). Respiratory rhythm generation during gasping depends on persistent sodium current. *Nat. Neurosci.* 9, 311–313. doi: 10.1038/nn1650
- Peña, F. (2009). Neuronal network properties underlying the generation of gasping. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 36, 1218–1228. doi: 10.1111/j.1440-1681.2009.05301.x
- Peña, F., and García, O. (2006). Breathing generation and potential pharmacotherapeutic approaches to central respiratory disorders. *Curr. Med. Chem.* 13, 2681–2693. doi: 10.2174/092986706778201602
- Peña, F., Meza-Andrade, R., Paez-Zayas, V., and Gonzalez-Marin, M. C. (2008). Gasping generation in developing Swiss-Webster mice *in vitro* and *in vivo*. *Neurochem. Res.* 33, 1492–1500. doi: 10.1007/s11064-008-9616-x
- Peña, F., Ordaz, B., Balleza-Tapia, H., Bernal-Pedraza, R., Marquez-Ramos, A., Carmona-Aparicio, L., et al. (2010). Beta-amyloid protein (25–35) disrupts hippocampal network activity: role of Fyn-kinase. *Hippocampus* 20, 78–96. doi: 10.1002/hipo.20592
- Peña, F., Parkis, M. A., Tryba, A. K., and Ramirez, J. M. (2004). Differential contribution of pacemaker properties to the generation of respiratory rhythms during normoxia and hypoxia. *Neuron* 43, 105–117. doi: 10.1016/j.neuron.2004.06.023
- Peña, F., and Ramirez, J. M. (2002). Endogenous activation of serotonin-2A receptors is required for respiratory rhythm generation *in vitro*. *J. Neurosci.* 22, 11055–11064.
- Peña, F., and Ramirez, J. M. (2005). Hypoxia-induced changes in neuronal network properties. *Mol. Neurobiol.* 32, 251–283. doi: 10.1385/MN:32:3:251
- Perasso, L., Lunardi, G. L., Risso, F., Pohvozcheva, A. V., Leko, M. V., Gandolfo, C., et al. (2008). Protective effects of some creatine derivatives in brain tissue anoxia. *Neurochem. Res.* 33, 765–775. doi: 10.1007/s11064-007-9492-9
- Perkel, D. H., Gerstein, G. L., and Moore, G. P. (1967). Neuronal spike trains and stochastic point processes. II. Simultaneous spike trains. *Biophys. J.* 7, 419–440. doi: 10.1016/S0006-3495(67)86597-4
- Poets, C. F., Meny, R. G., Chobanian, M. R., and Bonofiglio, R. E. (1999). Gasping and other cardiorespiratory patterns during sudden infant deaths. *Pediatr. Res.* 45, 350–354. doi: 10.1203/00006450-199903000-00010
- Ramirez, J. M., Folkow, L. P., and Blix, A. S. (2007). Hypoxia tolerance in mammals and birds: from the wilderness to the clinic. *Annu. Rev. Physiol.* 69, 113–143. doi: 10.1146/annurev.physiol.69.031905.163111
- Ramirez, J. M., Garcia, A. J. 3rd., Anderson, T. M., Koschnitzky, J. E., Peng, Y. J., Kumar, G. K., et al. (2013). Central and peripheral factors contributing to obstructive sleep apneas. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 189, 344–353. doi: 10.1016/j.resp.2013.06.004
- Ramirez, J. M., Quellmalz, U. J., Wilken, B., and Richter, D. W. (1998). The hypoxic response of neurones within the *in vitro* mammalian respiratory network. *J. Physiol.* 507, (Pt 2), 571–582. doi: 10.1111/j.1469-7793.1998.571bt.x
- Ramirez, J. M., Tryba, A. K., and Peña, F. (2004). Pacemaker neurons and neuronal networks: an integrative view. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 665–674. doi: 10.1016/j.conb.2004.10.011
- Ramírez-Jarquín, J. O., Lara-Hernandez, S., Lopez-Guerrero, J. J., Aguilera, M. A., Rivera-Angulo, A. J., Sampieri, A., et al. (2012). Somatostatin modulates generation of inspiratory rhythms and determines asphyxia survival. *Peptides* 34, 360–372. doi: 10.1016/j.peptides.2012.02.011
- Richter, D. W., Bischoff, A., Anders, K., Bellingham, M., and Windhorst, U. (1991). Response of the medullary respiratory network of the cat to hypoxia. *J. Physiol.* 443, 231–256.
- Rivera-Angulo, A. J., and Peña-Ortega, F. (2014). Isocitrate supplementation promotes breathing generation, gasping, and autoresuscitation in neonatal mice. *J. Neurosci. Res.* 92, 375–388. doi: 10.1002/jnr.23330
- Road, J. D., Ford, T. W., and Kirkwood, P. A. (2013). Connections between expiratory bulbospinal neurons and expiratory motoneurons in thoracic and upper lumbar segments of the spinal cord. *J. Neurophysiol.* 109, 1837–1851. doi: 10.1152/jn.01008.2012
- Schmidt, C., Bellingham, M. C., and Richter, D. W. (1995). Adenosinergic modulation of respiratory neurones and hypoxic responses in the anaesthetized cat. *J. Physiol.* 483(Pt 3), 769–781.
- Segers, L. S., Nuding, S. C., Dick, T. E., Shannon, R., Baekey, D. M., Solomon, I. C., et al. (2008). Functional connectivity in the pontomedullary respiratory network. *J. Neurophysiol.* 100, 1749–1769. doi: 10.1152/jn.90414.2008

- Shen, L., Peever, J. H., and Duffin, J. (2002). Bilateral coordination of inspiratory neurones in the rat. *Pflugers Arch.* 443, 829–835. doi: 10.1007/s00424-001-0752-2
- Shoji, S. (1992). Glucose regulation of synaptic transmission in the dorsolateral septal nucleus of the rat. *Synapse* 12, 322–332. doi: 10.1002/syn.890120409
- Smith, J. C., Ellenberger, H. H., Ballanyi, K., Richter, D. W., and Feldman, J. L. (1991). Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* 254, 726–729. doi: 10.1126/science.1683005
- St. John, W. M. (1999). Rostral medullary respiratory neuronal activities of decerebrate cats in eupnea, apneusis and gasping. *Respir. Physiol.* 116, 47–65. doi: 10.1016/S0034-5687(99)00030-4
- St. John, W. M., and Bianchi, A. L. (1985). Responses of bulbospinal and laryngeal respiratory neurons to hypercapnia and hypoxia. *J. Appl. Physiol.* (1985) 59, 1201–1207.
- St. John, W. M., and Leiter, J. C. (2009). Discharge of the hypoglossal nerve cannot distinguish eupnea from gasping, as defined by phrenic discharge, in the in situ mouse. *J. Appl. Physiol.* 107, 686–695. doi: 10.1152/jappphysiol.00023.2009
- St-John, W. M., Paton, J. F., and Leiter, J. C. (2004). Uncoupling of rhythmic hypoglossal from phrenic activity in the rat. *Exp. Physiol.* 89, 727–737. doi: 10.1113/expphysiol.2004.028829
- Supér, H., and Roelfsema, P. R. (2005). Chronic multiunit recordings in behaving animals: advantages and limitations. *Prog. Brain Res.* 147, 263–282. doi: 10.1016/S0079-6123(04)47020-4
- Thoby-Brisson, M., and Ramirez, J. M. (2000). Role of inspiratory pacemaker neurons in mediating the hypoxic response of the respiratory network *in vitro*. *J. Neurosci.* 20, 5858–5866.
- Tryba, A. K., Pena, F., and Ramirez, J. M. (2003). Stabilization of bursting in respiratory pacemaker neurons. *J. Neurosci.* 23, 3538–3546.
- Zavala-Tecuapetla, C., Aguilera, M. A., Lopez-Guerrero, J. J., Gonzalez-Marin, M. C., and Pena, F. (2008). Calcium-activated potassium currents differentially modulate respiratory rhythm generation. *Eur. J. Neurosci.* 27, 2871–2884. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06214.x
- Zavala-Tecuapetla, C., Tapia, D., Rivera-Angulo, A. J., Galarraga, E., and Pena-Ortega, E. (2014). Morphological characterization of respiratory neurons in the pre-Bötzinger complex. *Prog. Brain Res.* 209, 39–56. doi: 10.1016/B978-0-444-63274-6.00003-5

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 20 May 2014; paper pending published: 05 June 2014; accepted: 25 June 2014; published online: 23 July 2014.

Citation: Nieto-Posadas A, Flores-Martínez E, Lorea-Hernández J-J, Rivera-Angulo A-J, Pérez-Ortega J-E, Bargas J and Peña-Ortega F (2014) Change in network connectivity during fictive-gasping generation in hypoxia: prevention by a metabolic intermediate. *Front. Physiol.* 5:265. doi: 10.3389/fphys.2014.00265

This article was submitted to *Integrative Physiology*, a section of the journal *Frontiers in Physiology*.

Copyright © 2014 Nieto-Posadas, Flores-Martínez, Lorea-Hernández, Rivera-Angulo, Pérez-Ortega, Bargas and Peña-Ortega. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.