



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL GENERADOR DEL RITMO RESPIRATORIO POR LA
INTERLEUCINA-1BETA Y LA ACTIVACIÓN MICROGLIAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. JONATHAN JULIO ISMAEL LOREA HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. José Fernando Peña Ortega

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. José Jesús García Colunga

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Dr. Manuel Miranda Anaya

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE DOCENCIA E
INVESTIGACIÓN, FACULTAD DE CIENCIAS



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL GENERADOR DEL RITMO RESPIRATORIO POR LA
INTERLEUCINA-1BETA Y LA ACTIVACIÓN MICROGLIAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. JONATHAN JULIO ISMAEL LOREA HERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. José Fernando Peña Ortega

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. José Jesús García Colunga

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Dr. Manuel Miranda Anaya

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE DOCENCIA E
INVESTIGACIÓN, FACULTAD DE CIENCIAS

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ENTIDAD INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR
OFICIO CPCB/683/2020
ASUNTO: Oficio de Jurado

DR. VÍCTOR HUGO ANAYA MUÑOZ
Director de Certificación y Control Documental
Dirección General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión (Virtual) ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 17 de agosto de 2020 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del estudiante **LOREA HERNÁNDEZ JONATHAN JULIO ISMAEL** con número de cuenta **406071235** con la tesis titulada **“Modulación de la actividad del generador del ritmo respiratorio por la interleucina-1 beta y la activación microglial”**, realizada bajo la dirección del **DR. JOSÉ FERNANDO PEÑA ORTEGA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. MARÍA ELVIRA GALARRAGA PALACIO
Vocal: DRA. CLAUDIA GÓMEZ ACEVEDO
Secretario: DR. MANUEL MIRANDA ANAYA
Suplente: DRA. YAZMÍN RAMIRO CORTÉS
Suplente: DRA. SOFIA YOLANDA DÍAZ MIRANDA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 19 de octubre de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos Institucionales:

En primer lugar, agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la formación recibida durante mi participación en su programa de doctorado.

Agradezco al CONACYT por asignarme una beca con la que me fue posible dedicarme de tiempo completo a mis estudios y la realización de mi proyecto de doctorado.

Numero de becario: 275264

Número de beca: 412080

CVU: 357259

Agradezco especialmente a mi tutor principal, el doctor José Fernando Peña Ortega y a los miembros de mi comité tutor, el doctor Jesús García Colunga y el doctor Manuel Miranda Anaya, por su guía y retroalimentación durante el desarrollo de este proyecto.

A título personal:

Agradezco a mi madre, Cristina Lorea, a quien le debo TODO. La conclusión de este proyecto y esta etapa en mi vida representan una gran satisfacción que deseo compartir con ella, esperando retribuir de esta manera algo de la confianza que ha depositado en mí.

Una mención especial para mis abuelos, Teresa Hernández y Raymundo Lorea, quienes representan una gran y positiva influencia que ha definido en buena parte la persona que soy y que me ha ayudado a cumplir los objetivos que hasta hoy me he fijado.

Gracias a toda mi familia en general, por su apoyo y amor incondicionales, por su aliento constante que me ha impulsado hasta este punto en mi vida.

Un agradecimiento especial para Alhelí Marín, por todo el apoyo que me ha brindado, por todo el cariño y el tiempo que ha compartido conmigo. JTM

Gracias también a todos mis amigos y compañeros del laboratorio C-01 de circuitos neuronales, por hacer más enriquecedora mi estancia ahí.

Agradezco en especial al Dr. Benito Ordaz Sánchez, por brindarme su amistad y su consejo, además de su apoyo técnico, que fue fundamental para la realización de este proyecto.

Agradezco también por el apoyo brindado por parte del bioterio del campus Juriquilla de la UNAM, a cargo del Dr. José Martín García Servín y por parte de la Dra. Alejandra Castilla León.

Dedicatoria

A la memoria de Teresa Hernández Reyes (1932-2016)

Índice

índice de figuras.....	7
Lista de abreviaturas.....	8
Resumen.....	11
Abstract.....	12
Introducción.....	13
Marco teórico.....	14
La respiración.....	14
El generador central de la actividad respiratoria.....	15
Modulación de la actividad respiratoria.....	17
La microglía, el macrófago residente del SNC.....	19
Regulación de la actividad microglial dependiente de calcio.....	21
Modulación de la actividad neuronal por la microglía.....	23
Posible influencia de la microglía sobre la generación central de la respiración.....	24
Activación farmacológica de la microglía.....	26
El lipopolisacárido (LPS).....	26
El ácido desoxirribonucleico fragmentado (ADNf).....	26
La fractalquina.....	27
La leucadherina 1 (LKD1).....	27
Activación dirigida genéticamente a la microglía.....	28
Eliminación de la microglía con clodronato liposomal.....	29
Posible influencia de la interleucina-1beta sobre la generación central de la respiración.....	30
Antecedentes y justificación.....	30
Hipótesis.....	31
Objetivos.....	31
Objetivo general.....	31
Objetivos particulares.....	31
Materiales y métodos.....	32
Animales.....	32
Obtención de rebanadas de tallo cerebral y registro de actividad de campo del preBötC.....	32
Activación farmacológica de la microglía.....	34
Efecto de la interleucina-1beta exógena sobre la actividad del preBötC.....	34
Activación optogenética de la microglía.....	34
Activación quimiogénica de la microglía.....	35

Inmunodetección de la microglía en rebanadas de tallo cerebral	35
Caracterización morfológica de la activación microglial	35
Cuantificación de las células microgliales.....	36
Depleción de la microglía con clodronato liposomal (LipClo)	37
Microscopia electrónica y tinción negativa.....	38
Cuantificación de la liberación de especies reactivas de oxígeno con el sistema EROS	38
Análisis de resultados.....	39
Resultados	39
Discusión.....	55
Conclusión	59
Bibliografía citada.	60
Anexos.....	81
Artículo requisito de titulación.....	81

índice de figuras.

Figura 1. Esquema del procedimiento de obtención de la rebanada de tallo cerebral que contiene al preBötC.....	33
Figura 2. Posicionamiento del electrodo de registro y trazo de la actividad generada por el complejo pre-Bötzinger (preBötC).....	33
Figura 3. Procesamiento de las imágenes para realizar la caracterización morfológica de la microglial.....	36
Figura 4. Identificación y cuantificación de las células microgliales.	37
Figura 5. Micrografía representativa de liposomas tomada con microscopía electrónica de transmisión.	38
Figura 6. Efecto de diferentes activadores microgliales sobre la amplitud y la frecuencia de las ráfagas inspiratorias generadas por el preBötC.	40
Figura 7. Efecto de la aplicación exógena de diferentes concentraciones de interleucina-1beta (IL1 β) sobre la actividad generada por el preBötC.	41
Figura 8. La aplicación del antagonista endógeno de los receptores de interleucina-1beta (IL1Ra) no afecta la actividad generada por el preBötC <i>per se</i> , pero evita los efectos de la interleucina-1beta (IL-1 β).	42
Figura 9. El efecto producido por la interleucina-1beta (IL1 β) sobre la amplitud de las ráfagas inspiratorias es irreversible.	44
Figura 10. La estimulación optogenética y quimiogenética de la microglía reduce la amplitud de las ráfagas generadas en el preBötC.	45
Figura 11. La estimulación optogenética y la quimiogenética de la microglía no afectan a la frecuencia de las ráfagas generadas en el preBötC.	46
Figura 12. El pretratamiento con clodronato liposomal (LipClo) evita la reducción de la amplitud de las ráfagas respiratorias del preBötC producida por la estimulación quimiogenética de la microglía.	47
Figura 13. El tratamiento con LipClo reduce la cantidad de microglía y modifica la morfología de la microglía remanente.	48
Figura 14. La estimulación óptogenética en rebanadas de animales ChR2+/YFP+ produce cambios en la morfología de las células microgliales.	50
Figura 15. La estimulación quimiogenética en rebanadas de animales hM3Dq+ produce cambios en la morfología de las células microgliales.	51
Figura 16. Liberación de H ₂ O ₂ en la rebanada de tallo cerebral de ratones ChR2+.	52
Figura 17. Cuantificación de la liberación de H ₂ O ₂ en la rebanada de tallo cerebral de ratones hMD3q+ antes y después de la estimulación con CNO.....	53
Figura 18. El tratamiento con el antagonista del receptor de la intrelucina-1beta (IL1Ra) no evita la disminución de la amplitud de las ráfagas respiratorias del preBötC inducida por la estimulación optogenética de la microglía.	53
Figura 19. El tratamiento con el antagonista del receptor de la intrelucina-1beta (IL1Ra) no evita la disminución de la amplitud de las ráfagas respiratorias del preBötC inducida por la quimiogenética de la microglía.	54

Lista de abreviaturas

ADN ácido desoxirribonucleico fragmentado

ADP adenosín difosfato

AKT también conocida como PKB por proteína cinasa B

AMP ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

AMPA ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

AppCCI2p adenosin-5'-[β - γ -diclorometilen] trifosfato

ATP adenosín trifosfato

BDNF factor neurotrófico derivado de cerebro

CaMK cinasa dependiente calcio-calmodulina

CD complejo de diferenciación (aparecerán varios en el texto como el 1, el 200, el 45, el 47, el 11b, etc.)

ChR2 canalrhodopsina 2

CNO clozapina-N-óxido

CR3 receptor del complemento 3

CREB proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc

CREB proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc

CSF1 factor estimulante de colonias de tipo-1

CXCL citocinas con el motivo CXC (ligandos)

CXCR receptor de citocinas con el motivo CXC

DAM microglía asociada a patología

DAMP patrón molecular asociado a daño

DAP12 proteína activadora DNAX de 12 kDa

DAPI 4',6-diamidino-2-fenilindol

DREADDs receptores diseñados para reconocer ligandos diseñados

EDI enzima degradadora de insulina

ERK Cinasa regulada por señal extracelular

EROS sistema de detección en línea de reactor enzimático

GABA ácido gamma-aminobutírico

GluR receptor de glutamato

GPCRs receptores acoplados a proteínas G

GT gliotransmisor

Iba1 molécula adaptadora de unión a calcio ionizante 1

IL1R1 receptor 1 de la interleucina 1
IL1Ra antagonista del receptor de interleucina 1
IL-1 β interleucina-1beta
iNOS óxido nítrico sintasa inducible
IP3 inositol trifosfato
IRF factor regulador dependiente de interferón
JNK cinasa c-Jun N-terminal
LCRA líquido cefalorraquídeo artificial
LipClo clodronato liposomal
LKD1 leucadherina 1
LPS lipopolisacárido
MAPK proteína cinasas activada por mitógenos
MCP1 proteína quimioatrayente de monocitos 1
NFAT factor nuclear de células T activadas
NK1R receptor 1 de neurokinina
NLRP3 proteína que contienen dominios NACHT, LRR y PYD 3
NMDA N-metil-D-aspartato
NRF2L2 factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2
NT neurotransmisor
ON óxido nítrico
PFA paraformaldehído
PGE2 prostaglandina E2
PKC proteína cinasa C
PLC fosfolipasa C
preBötC complejo pre Bötzingen
REp retículo endoplasmático
ROS especies reactivas de oxígeno
RTT modelo genético del síndrome de Rett
SIDS síndrome de muerte súbita del lactante
SNC sistema nervioso central
SOCE entrada de calcio operada por las reservas
SST somatostatina
TLR receptor tipo *toll*

TNF- α factor de necrosis tumoral α

TREM2 receptor 2 de activación expresado en células mieloides

TRP potencial de receptor transitorio

YFP proteína amarilla fluorescente

Resumen

La microglía es la población de macrófagos residentes del sistema nervioso central (SNC) que, debido a su capacidad fagocítica y a su participación en los procesos neuroinflamatorios, se ha estudiado mayoritariamente en el contexto de sus funciones inmunológicas y de su participación en diversas neuropatologías. En años recientes, se ha acumulado evidencia de que la microglía, además, interactúa con neuronas y otras células gliales no sólo para mantener la homeostasis del sistema nervioso, sino también para modular la actividad producida por diferentes circuitos neuronales en condiciones fisiológicas. Estas evidencias se han recabado mayormente con el uso de herramientas farmacológicas, las cuales han resultado útiles, pero también limitadas por su inespecificidad, para definir el papel de la microglía como un elemento dinámico y necesario para el adecuado funcionamiento de los circuitos neuronales. Entre los circuitos neuronales que podrían ser modulados por la microglía se encuentra el complejo pre-Bötzinger (preBötC), que es una red de neuronas que comandan la actividad respiratoria. Para explorar esta posibilidad, en la presente tesis se utilizó una batería de fármacos que, si bien tienen blancos moleculares diversos, coinciden en su capacidad de producir la activación de la microglía, lo que permitió estudiar la influencia de estas células sobre la actividad del preBötC. Considerando que los fármacos utilizados en este trabajo podrían tener efectos inespecíficos sobre otros elementos dentro del SNC (neuronas, astrocitos, oligodendrocitos), se emplearon además estrategias genéticamente dirigidas (optogenética y quimiogenética) para estimular de manera específica a la microglía y revelar su papel modulador sobre la actividad del preBötC. En conjunto, los experimentos farmacológicos y los dirigidos genéticamente muestran que la activación microglial reduce la amplitud de las ráfagas inspiratorias, sin afectar la frecuencia del ritmo respiratorio. Además, se demostró que la activación optogenética y quimiogenética de la microglía modulan la actividad del preBötC de manera independiente de la liberación de interleucina-1beta, pues la acción del antagonista del receptor IL-R1 no bloqueó el efecto producido sobre la actividad del preBötC. Sin embargo, se observó que la interleucina-1beta aplicada exógenamente modula la actividad del preBötC, similar a lo observado con la activación microglial, se produjo una reducción de la amplitud de las ráfagas inspiratorias sin afectar la frecuencia del ritmo respiratorio, lo que sugiere que estas aproximaciones experimentales podrían actuar a través de mecanismos similares. Adicionalmente, se observó que tanto la estimulación optogenética como la quimiogenética de la microglía incrementan la liberación de peróxido de hidrogeno, lo que establece a esta molécula como un posible mediador de la modulación de la actividad del preBötC. En conclusión, en este trabajo se demostró que la estimulación específica de la microglía y la interleucina-1beta modulan de manera similar al ritmo respiratorio generado por el preBötC, lo que indica que este circuito neuronal puede ser modulado por células y mediadores clásicamente asociados a los procesos neuroinflamatorios, lo que resulta relevante para el entendimiento de la generación del ritmo respiratorio y en particular, para entender los mecanismos subyacentes de las alteraciones respiratorias que acompañan a diferentes patologías.

Abstract

Microglia are the central nervous system (CNS) resident macrophage population, due to its phagocytic capacity and its participation in neuroinflammatory processes, has been studied mainly in the context of its immunological functions and its participation in various neuropathologies. In recent years, evidence has accumulated that microglia also interact with neurons and other glial cells not only to maintain homeostasis of the nervous system, but also to modulate the activity produced by different neuronal circuits under physiological conditions. This evidence have been generated mostly using pharmacological tools, which have been useful, but also limited by their non-specificity, to define the role of microglia as a dynamic and necessary element for a proper neuronal circuits functioning. Among the neural circuits that could be modulated by microglia is the pre-Bötzinger complex (preBötC), which is a neuronal network that command respiratory activity. To explore this possibility, in this thesis a battery of drugs was used that, although they have different molecular targets, coincide in their ability to activate microglia, which allowed us to study the influence of these cells on preBötC activity. Considering that drugs used in this work could have nonspecific effects on other elements within the CNS (neurons, astrocytes, oligodendrocytes), genetically directed strategies (optogenetics and chemogenetics) were also used to specifically stimulate the microglia and reveal its modulating role on preBötC activity. Taken together, pharmacological and genetically directed experiments show that microglial activation reduces the amplitude of inspiratory bursts, without affecting respiratory rhythm frequency. Furthermore, it was shown that the optogenetic and chemogenetic activation of the microglia modulate the activity of preBötC independently of interleukin-1beta release, since the action of the IL-R1 receptor antagonist did not block the effect produced on preBötC activity. However, it was observed that exogenously applied interleukin-1beta modulates preBötC activity, similar to that observed with microglial activation, there was a reduction in the amplitude of inspiratory bursts without affecting respiratory rhythm frequency, which suggests that these experimental approaches could act through similar mechanisms. Additionally, it was observed that both optogenetic and chemogenetic microglial stimulation increase hydrogen peroxide release, which establishes this molecule as a possible mediator of the modulation of preBötC activity. In conclusion, in this work it was demonstrated that specific stimulation of the microglia and interleukin-1beta modulate in a similar way the respiratory rhythm generated by preBötC, which indicates that this neuronal circuit can be modulated by cells and mediators classically associated with the neuroinflammatory processes, which is relevant for understanding respiratory rhythm generation and in particular, to understand the mechanisms that underlie respiratory alterations associated with different pathologies.

Introducción

Por su capacidad de transmitir información a través de la generación de potenciales de acción y las interacciones sinápticas que establece, se ha considerado que la neurona es la unidad funcional del sistema nervioso central (SNC) (Halliday y Stevens, 2011). Esta noción llevó a que el estudio formal del SNC se enfocara, por décadas, principalmente a determinar los diferentes procesos físicos, químicos y biológicos que subyacen a la actividad neuronal (Purves et al., 2001). Como resultado de esta labor, hoy sabemos que las neuronas varían notablemente en su estructura, función y en la naturaleza de las interacciones que se establecen entre ellas, además de que se organizan en ensamblajes y en circuitos para así llevar a cabo las funciones del SNC (Purves et al., 2001). No obstante, el SNC también está constituido por células gliales, que son incluso más numerosas que las neuronas en algunos organismos, particularmente en el ser humano (Araque y Navarrete, 2010; Peña-Ortega, 2017). Las células gliales interactúan con todos los circuitos del SNC y su función está siendo reevaluada en las últimas décadas (Hutchins et al., 1990; Dalmau et al., 1998; Alliot et al., 1999; Nimmerjahn et al., 2005).

Durante mucho tiempo, la apreciación general sobre las células gliales fue que son elementos inertes y meramente estructurales del sistema nervioso (Kettenmann y Verkhratsky, 2008), que funcionaban como componentes de un sistema de andamiajes sobre el cual las neuronas se distribuían y se organizaban (Araque y Navarrete, 2010). Sin embargo, desde las primeras observaciones, se presentaron teorías que proponían que las células gliales, en conjunto con las neuronas, eran responsables activos del funcionamiento del SNC (Schleich, 1894). Esas ideas se han ido confirmando y ampliando con múltiples trabajos que se han realizados desde finales del siglo pasado y que hoy en día tienen un gran auge. Ahora, se percibe a las células gliales como elementos integrales activos dentro del SNC (y Verkhratsky, 2012).

La glía comprende a un grupo heterogéneo de células, diverso en su morfología, función y origen embrionario (Ginhoux et al., 2010; Peña-Ortega et al., 2016; Peña-Ortega, 2017). Las células gliales participan en distintos aspectos del sistema nervioso, como su arquitectura (Poalicelli et al., 2011), su metabolismo (Gourine y Kasparov, 2011) y hasta el funcionamiento de sus circuitos (Peña-Ortega, 2017). Por ejemplo, se ha demostrado en mamíferos que la modulación de las funciones de las células gliales altera la actividad neuronal generada en el hipocampo (Pascual et al., 2011) y en la corteza cerebral (Rodgers et al., 2009). Experimentos de este tipo, han evidenciado la contribución glial en el procesamiento, la transmisión y el almacenamiento de información dentro del sistema nervioso (Araque y Navarrete, 2010). Adicionalmente, las células gliales son responsivas a la actividad neuronal y regulan tanto la transmisión sináptica como su plasticidad en el corto y en el largo plazos (Araque y Navarrete, 2010; Peña-Ortega, 2017).

Evidencias como las descritas en el párrafo anterior han permitido proponer un enfoque nuevo para el estudio del SNC que es más cercano a la realidad biológica y que lo considera como un sistema conformado por diferentes tipos celulares (neuronas y glía) que interactúan entre sí (Peña-Ortega et al., 2016; Peña-Ortega, 2017). Desde este enfoque, se asume que las distintas funciones atribuidas al SNC, como el aprendizaje y la memoria, entre varias más, no son exclusivamente el resultado de la actividad neuronal al interior de cada circuito, sino que son producto de interacciones complejas neuro-gliales (Araque y Navarrete, 2010; Peña-Ortega et al., 2016). Un circuito neuronal que ejemplifica estas interacciones neuro-gliales es el complejo pre-Bötzinger (preBötC; Gourine et al., 2010; Lorea-Hernández, 2015; Camacho-Hernández et al., 2018). Este circuito es de gran importancia ya que, en mamíferos, genera y comanda la actividad respiratoria (Richter et al., 1999). En los últimos años, se ha acumulado evidencia que sugiere que los cambios en la actividad de las células gliales pueden favorecer o disminuir la actividad de este circuito (Hülsmann et al., 2000; Gourine et al., 2010; Peña-Ortega, 2012; Camacho-Hernández et al., 2018).

Incluir a las células gliales en el estudio del circuito que genera y comanda el ritmo respiratorio es muy importante, pues ha permitido determinar los componentes celulares, más allá de las neuronas, que participan en la generación de esta función vital (Peña-Ortega, 2012; 2017). Adicionalmente, estos estudios han contribuido a entender patologías diversas como la apnea obstructiva del sueño, el síndrome de muerte súbita del lactante (SIDS, por sus siglas en inglés), la deficiencia respiratoria

asociada al síndrome de Rett, la hipoventilación asociada al síndrome de inmunodeficiencia adquirida y otras, que cursan con alteraciones respiratorias severas que se han relacionado con un estado de inflamación al interior del SNC (Peña y García, 2006; Peña-Ortega, 2012; 2017). Esta neuroinflamación es un proceso mediado en gran medida por la activación de las células gliales y, en particular, por la activación de la microglía (Gourine et al., 2010; Ballanyi et al., 2010; Gourine y Kasparov, 2011; Schnell et al., 2011; Kasparov, 2011; Mulkey y Wenker, 2011; Mitterauer, 2011; Okada et al., 2012; Kasymov et al., 2013), por lo que la actividad de estas células podría ser un factor que afecte la generación de la respiración (Lorea-Hernandez, 2015; Camacho-Hernández et al., 2018). De hecho, en nuestro laboratorio hemos encontrado evidencia de que la microglía es capaz de modular la actividad y la plasticidad del complejo preBötC (Lorea-Hernandez, 2015; Camacho-Hernández et al., 2018). En estos trabajos previos hemos utilizado diferentes herramientas farmacológicas que permiten la activación, inhibición o depleción de la microglía dentro del tejido nervioso, con la finalidad de evidenciar su influencia en la generación de la actividad respiratoria en el preBötC (Lorea-Hernandez, 2015; Camacho-Hernández et al., 2018; Pardo-Peña et al., 2018). Entre estas herramientas farmacológicas se incluye a un activador clásico de la microglía llamado lipopolisacárido (LPS) (Bruno et al., 1997, 1998; Taylor et al., 2003). Los resultados que hemos obtenido señalan que la microglía modula la respuesta respiratoria a la hipoxia y la sobrevivencia de los ratones neonatos a la misma (Lorea-Hernández, 2015), así como fenómenos plásticos de la respiración (Camacho-Hernández et al., 2018). Sin embargo, todos estos fármacos carecen de especificidad para la modulación microglial (Peña-Ortega, 2017). Por ejemplo, el LPS podría tener efecto no solo en la microglía, sino sobre las neuronas, los astrocitos, los oligodendrocitos y otros elementos celulares dentro del SNC (Muecci et al., 2000; Husemann y Silverstein, 2001; Hatori et al., 2002; Lin et al., 2015; Shen et al., 2016). Lo anterior, indica que no basta utilizar herramientas farmacológicas para revelar específicamente la participación de la microglía en la función del SNC y que, por lo tanto, se requiere de estrategias más específicas para revelar estas funciones (Tanaka et al., 2012; Sawada et al., 2012; Grace et al., 2018).

Para eliminar los efectos inespecíficos de los fármacos utilizados para modular a la microglía, hemos utilizado también en esta tesis herramientas genéticas que nos permitieron manipular de manera más específica a la microglía (Pardo-Peña et al., 2008; Grace et al., et al., 2018). Con ello, determinamos que la estimulación optogenética y quimiogenética de la misma modula la actividad generada por el preBötC. Interesantemente, este efecto presentó similitudes con respecto al producido por la manipulación farmacológica de la microglía, lo que reafirma la posibilidad de que la activación de este tipo celular modula la actividad respiratoria. Determinar el mecanismo detrás de los efectos moduladores de la microglía sobre el preBötC no es una tarea sencilla, pues la microglía es un tipo celular capaz de sintetizar y liberar una gama muy amplia de moléculas efectoras (Lorier et al., 2008; Huxtable, 2010; Lauro et al., 2010; Pascual et al., 2011), incluidas las especies reactivas de oxígeno (Peña-Ortega, 2017; Pardo-Peña et al., 2018) y la interleucina-1beta (Peña-Ortega, 2017). Además, la modulación de la actividad de un circuito neuronal por la manipulación de la microglía podría involucrar un mecanismo complejo producto de la acción coordinada de estas moléculas (Lorier et al., 2008; Huxtable, 2010; Lauro et al., 2010; Pascual et al., 2011). Considerando lo anterior, en este proyecto se propuso determinar si la activación específica de la microglía produce una modulación de la actividad del preBötC, así como caracterizar la respuesta microglial a su estimulación específica para poder identificar posibles mecanismos que participen en este fenómeno, como son la liberación de factores microgliales y la posible participación de la interleucina-1beta (IL-1 β).

Marco teórico

La respiración

La respiración es una función vital que, en organismos pulmonados como los mamíferos, se lleva a cabo en un ciclo producido por la contracción y la relajación rítmicas del diafragma (Richter et al., 1999; Hilaire y Pásaro, 2003). Este ciclo respiratorio es

dominado por una fase inspiratoria activa, en donde el diafragma se contrae y produce el ingreso de aire hacia los pulmones para permitir la captación del O₂ que requiere el organismo (Hají et al., 2000; Hilaire y Pásaro, 2003). La fase inspiratoria se alterna con una fase espiratoria, generalmente pasiva, en la que el diafragma se relaja produciendo que el aire sea expulsado de los pulmones junto con el CO₂ colectado desde la sangre y proveniente del metabolismo del organismo (Hají et al., 2000; Hilaire y Pásaro, 2003).

El generador central de la actividad respiratoria

La fase inspiratoria del ciclo respiratorio es comandada por señales eferentes generadas en el complejo pre Bötzing (preBötC), que es un conjunto de aproximadamente 3000 neuronas (Feldman et al., 2006), ubicado dentro del tallo cerebral, necesario y suficiente para la generación y el mantenimiento de la actividad respiratoria (Smith et al., 1991). La eliminación de las células del preBötC produce la interrupción de la actividad respiratoria (Smith et al., 1991; Wenninger et al., 2004). De la misma manera, este efecto puede ser reproducido por la inhibición optogenética o farmacológica de las células del preBötC (Gray et al., 2001; Ramírez et al., 1998; Tan et al., 2008). Se ha demostrado que la generación del ritmo respiratorio es capaz de persistir en una rebanada de tallo cerebral que contiene a las células del preBötC (Smith et al., 1991). Incluso, la pequeña porción de la rebanada de tallo cerebral que contiene al preBötC puede ser aislada del resto del tejido, en una preparación llamada “isla” del preBötC, que mantiene su capacidad de generar actividad rítmica inspiratoria (Johnson et al., 2001; Tryba et al., 2008; Ramírez-Jarquín et al., 2012).

El preBötC tiene una representación bilateral dentro del tallo cerebral y ambos complejos se comunican a través de fibras comisurales que atraviesan por la línea media para sincronizar su actividad (Koshiya y Smith, 1999; McKay y Feldman, 2008; Zavala-Tecuapetla et al., 2014). Si uno de los dos es eliminado, el preBötC restante puede sostener la actividad respiratoria (Koshiya y Smith, 1999; McKay y Feldman, 2008). La actividad producida por el preBötC presenta un patrón característico con ráfagas poblacionales que se corresponden a las inspiraciones dentro del ciclo respiratorio (Smith et al., 1991). La generación de las ráfagas inspiratorias depende en gran medida de una interacción compleja entre las propiedades intrínsecas y sinápticas de neuronas funcionalmente definidas como respiratorias (Ramírez et al., 1998; 2005). Tomando como referencia la aparición de las ráfagas inspiratorias, las neuronas respiratorias se pueden dividir en: a) neuronas pre-inspiratorias, si su frecuencia de disparo aumenta justo antes de la aparición de la ráfaga poblacional (Smith et al., 1991); en b) neuronas inspiratorias, si su frecuencia de disparo aumenta durante la ráfaga poblacional (Smith et al., 1991); en c) neuronas post inspiratorias, si su frecuencia de disparo aumenta al finalizar la ráfaga inspiratoria y, por último, en d) neuronas espiratorias, que presentan una mayor frecuencia de disparo durante el periodo inter-ráfagas y se silencian durante la ráfaga inspiratoria (Smith et al., 2000).

Las neuronas que se encuentran en el preBötC presentan diferentes marcadores moleculares que las diferencian de las neuronas pertenecientes a circuitos vecinos (Liu et al., 2001; Stornetta et al., 2003; Picardo et al., 2013). Por ejemplo, el receptor a neurokinina 1 (NK1R+) se encuentra expresado en interneuronas del preBötC cuyas proyecciones contactan localmente con otras neuronas dentro del tallo cerebral (Gray et al., 2001). La somatostatina (SST+) también es expresada en neuronas del preBötC, incluida una subpoblación de neuronas que también expresan al NK1R+ (Stornetta et al., 2003). Las neuronas que presentan estos dos marcadores tienen actividad inspiratoria y no proyectan hacia la medula espinal (Stornetta et al., 2003). Los procesos de las neuronas NK1R+ se proyectan a través de la superficie dorsomedial de la medula oblonga y dentro del preBötC (Liu et al., 2001). Otro marcador de las células del preBötC es la proteína codificada por el gen Dbx1 (Dbx1+)(Picardo et al., 2013). En roedores, las neuronas que coexpresan los marcadores Dbx1+ y SST+ en el preBötC son críticas para la generación de la actividad inspiratoria, pues su eliminación interrumpe la respiración (Cui et al., 2016). También se ha observado, en ratones, que las neuronas que expresan la proteína Dbx1 pueden presentar un patrón de actividad pre-inspiratorio (Picardo et al., 2013). Una subpoblación de neuronas Dbx1+ son neuronas premotoras y proyectan hacia el núcleo

hipogloso, al que proveen de una entrada glutamatérgica que produce un disparo rítmico de estas motoneuronas, en fase con la actividad inspiratoria (Revill et al., 2015). Las neuronas Dbx1+ requieren de una menor entrada de corriente para generar potenciales de acción (en contraparte a las neuronas respiratorias que carecen de este marcador molecular), lo que las puede hacer más responsivas a la modulación proveniente de otras células que se encuentran en el preBötC (Picardo et al., 2013). Las neuronas Dbx1- cubren extensas superficies con sus dendritas, que son abundantes en espinas dendríticas (Picardo et al., 2013). Por otro lado, las neuronas Dbx1+ tienen proyecciones dendríticas cortas y locales que no presentan espinas dendríticas (Picardo et al., 2013). Estas características morfológicas definen y diferencian la capacidad de integración temporal y espacial de las entradas sinápticas que reciben estas neuronas y determinan su participación en la iniciación y en el mantenimiento, respectivamente, de la actividad sincrónica durante la fase inspiratoria (Picardo et al., 2013).

En el preBötC, la generación de las ráfagas inspiratorias es comandada por una población heterogénea de células marcapaso, que generan actividad rítmica de manera intrínseca y que favorecen la excitabilidad y el reclutamiento de las otras células dentro del circuito (Thoby-Brisson et al., 2001). En ausencia de las neuronas marcapaso, las interacciones sinápticas excitatorias en el preBötC son muy débiles para iniciar un estado de excitación que inicie una ráfaga inspiratoria y la generación de la respiración se interrumpe (Del Negro et al., 2005). Las neuronas marcapaso del preBötC pueden dividirse en dos subpoblaciones con base en la corriente que les confiere la propiedad de generar ráfagas de potenciales de acción de manera intrínseca (Peña et al., 2004; del Negro et al., 2005). Por un lado, hay una subpoblación que expresa una alta densidad de canales que generan una corriente persistente de sodio, mientras que hay otra subpoblación que expresa una alta densidad de canales que generan una corriente catiónica inespecífica activada por calcio (Peña et al., 2004; del Negro et al., 2005).

En el preBötC se generan distintos patrones de actividad respiratoria dependiendo de la disponibilidad de oxígeno y las dos subpoblaciones de neuronas marcapaso contribuyen de forma diferencial en este fenómeno (Lieske et al., 2000). En condiciones normales de oxigenación, se requiere el bloqueo de las dos subpoblaciones de neuronas marcapaso para producir la interrupción de la actividad respiratoria (Peña et al., 2004; Del Negro, 2005; Peña y Aguilera, 2007). Por otro lado, durante una condición de hipoxia prolongada el bloqueo de las neuronas marcapaso dependientes de la corriente persistente de sodio es suficiente para interrumpir la actividad respiratoria (Peña et al., 2004; Paton et al., 2016; Peña y Aguilera, 2007).

Las neuronas marcapaso del preBötC generan ráfagas de potenciales de acción en respuesta a un estímulo con mucha facilidad (Ramirez et al., 2005). Sin embargo, una ráfaga inspiratoria no puede ser generada por la actividad aislada de estas neuronas, pues una vez que un número mínimo de estas neuronas es activado dentro de una ventana de tiempo específica, se produce un estado de excitación que permite el reclutamiento sináptico de otras neuronas marcapaso y de las neuronas respiratorias seguidoras (no-marcapaso) (Del Negro et al., 2002; Thoby-Brisson et al., 2000; Peña et al., 2004). Previo al inicio de la inspiración en el preBötC, se produce una onda de actividad excitatoria que la precede y desencadena (Ramirez et al., 2005). Durante cada ciclo respiratorio diferentes neuronas marcapaso pueden determinar el comienzo de la onda de actividad excitatoria y, por lo tanto, una célula marcapaso puede participar en el estado de activación que inicia una inspiración durante un ciclo, pero podría convertirse en una neurona reclutada en el ciclo subsecuente (del Negro et al., 2002; Thoby-Brisson et al., 2000; Peña et al., 2004; Carroll et al., 2013). En el preBötC, diferentes mecanismos regulan la actividad de las neuronas marcapaso cuando no están sincronizadas y, de esta forma, se reduce la probabilidad de generar otra ráfaga justo después de una primera inspiración, lo que evita el inicio prematuro de una onda de excitación que pudiera dar origen a la siguiente inspiración (Del Negro et al., 2002; Thoby-Brisson et al., 2000; Peña et al., 2004). Esta regulación de la actividad de las neuronas marcapaso puede llevarse a cabo a través de un acoplamiento débil entre neuronas excitatorias, a través de depresión sináptica o a través de inhibición recíproca (Del Negro et al., 2002; Thoby-Brisson et al., 2000; Peña et al., 2004). Una vez que las neuronas marcapaso se han sincronizado se genera un estado de excitación que producirá la siguiente inspiración (Del Negro et al., 2002; Thoby-Brisson et al., 2000; Peña et al., 2004).

Aun cuando se ha demostrado que el preBötC puede seguir generando actividad inspiratoria en ausencia de inhibición sináptica (Cui, 2016), las interacciones inhibitorias dentro del preBötC favorecen la transición entre las distintas fases del ciclo

respiratorio (Cui et al., 2016). La inhibición post-sináptica tónica o fásica estabiliza el potencial de membrana de las neuronas en el preBötC y, de esta forma, reduce las fluctuaciones en la actividad rítmica producidas por entradas excitatorias esporádicas (Cui et al., 2016). Además, la inhibición mantiene la amplitud de las ráfagas inspiratorias por debajo del valor máximo y, de esta forma, incrementa el rango dinámico de la respuesta respiratoria a las distintas condiciones a las que se vea sometido el organismo (Cui, 2016). Por ejemplo, cuando la inhibición es bloqueada en el preBötC las ráfagas inspiratorias alcanzan su máxima amplitud y no pueden incrementarla más para compensar un incremento en la demanda ventilatoria, limitando de esta forma la respuesta dinámica de la salida motora (Cui, 2016). Se ha propuesto que mientras que el número y sincronización de las neuronas reclutadas define la amplitud de las ráfagas inspiratorias, el número y sincronización de las neuronas marcapaso activas determina la probabilidad de inicio de las ráfagas y define su frecuencia y regularidad (Cui et al., 2016). En términos generales, se puede sugerir que los neuromoduladores y las interacciones sinápticas que inciden sobre las neuronas marcapaso pueden modular la frecuencia y la regularidad de la actividad inspiratoria generada en el preBötC (Cui, 2016), mientras que la influencia de estos mismos factores sobre neuronas no-marcapaso modulan la amplitud y la duración de las ráfagas inspiratorias (Cui et al., 2016).

Modulación de la actividad respiratoria

La actividad generada en el preBötC es modulada por señales originadas dentro y fuera de este circuito (Peña-Ortega, 2012), lo que produce adaptaciones en la respiración que son requeridas para llevar a cabo funciones como la fonación y la deglución (Peña-Ortega, 2012) o para generar respuestas plásticas ante cambios en las condiciones medioambientales como, por ejemplo, cuando la demanda de oxígeno incrementa o la disponibilidad de este gas cambia por algún cambio fisiológico o patológico (Peña-Ortega, 2012). Para la adecuación voluntaria de la respiración durante conductas como el habla y la deglución, entre otras, el preBötC recibe información de la corteza somatosensorial primaria, el área motora suplementaria, el cerebelo, el tálamo, el núcleo caudado y el globo pálido, que son regiones asociadas a la planeación, coordinación y ejecución de los movimientos (McKay et al., 2003; Lovering et al., 2012).

Existen receptores de estiramiento que se encuentran en la tráquea y la faringe que transmiten información hacia el preBötC (Lovering et al., 2012). Lo anterior, modula adaptaciones respiratorias que permiten el paso de lo que es tragado sin afectar las vías aéreas superiores durante la deglución (McKay et al., 2003; Lovering et al., 2012). En los pulmones, también se encuentran receptores de estiramiento que aportan una modulación constante (tónica) requerida para regular la actividad respiratoria basal, por lo que una disminución de la actividad de estos receptores puede generar un estado de ventilación disminuida (Chou et al., 2008).

Otro sistema de modulación tónica de la actividad del preBötC está conformado por diferentes quimiorreceptores centrales y periféricos (Wong-Riley y Lui, 2005; Angelova et al., 2015). Estos quimiorreceptores pueden inducir una adaptación compensatoria de la actividad respiratoria en respuesta a cambios en la disponibilidad del oxígeno en el ambiente (Peña, 2009). Las señales que recibe el preBötC desde la periferia provienen de quimiorreceptores presentes en las arterias aorta y carótida que detectan cambios en la concentración de oxígeno y CO₂ en la sangre (Wong-Riley y Lui, 2005; Angelova et al., 2015). Adicionalmente, en el tallo cerebral hay dos sistemas sensibles a los cambios en oxígeno y/o CO₂ (Mulkey et al., 2015). Uno de los sistemas centrales de quimiorrecepción está constituido por las neuronas de la superficie de la medula oblonga ventral y el otro por los astrocitos de la misma región (Mulkey et al., 2015). Las neuronas de la medula oblonga ventral responden a los cambios de pH, derivados de alteraciones en los niveles de CO₂, exhibiendo una despolarización de su potencial de membrana (Mulkey et al., 2015). Cuando se genera acidosis hipercápnica, la frecuencia de disparo en estas neuronas incrementa (Kawai et al., 1996). Por otra parte, los astrocitos responden ante la acidosis hipercápnica exhibiendo un incremento en la concentración intracelular de calcio y la liberación de ATP que, por sí mismo, puede modular la actividad neuronal (Burnstock, 2008; Gourine et al., 2010). La liberación de ATP induce una liberación subsecuente de glutamato en los

astrocitos que resulta en el incremento de la frecuencia de la actividad respiratoria por la despolarización de las neuronas inspiratorias (Ballanyi et al., 1992; Gourine et al., 2010).

Dentro del preBötC, la generación de la actividad respiratoria depende basalmente de la acción de varios neurotransmisores (Peña-Ortega, 2012). El 70% de las neuronas del preBötC liberan glutamato y casi todas las neuronas marcapaso liberan este neurotransmisor para iniciar la ola de señales excitatorias que reclutan a las neuronas seguidoras para generar la ráfaga inspiratoria (Smith et al., 2007). Los astrocitos pueden influir en esta dinámica, ya que son capaces de liberar y recapturar glutamato, por lo que la actividad de estas células puede modular la actividad del preBötC (Hülsmann et al., 2000; Gourine et al., 2010). Estas células también pueden liberar d-serina y esta liberación produce el incremento de corrientes activadas por los receptores NMDA de glutamato lo que favorece la excitabilidad del circuito (Stevens et al., 2003). El 30% restante de las neuronas del preBötC producen neurotransmisores inhibitorios (Wong-Riley y Lui, 2005; Smith et al., 2007). En este grupo de neuronas, se pueden distinguir dos subgrupos con una proporción muy similar: uno de los grupos son neuronas que liberan ácido gamma aminobutírico (GABA, por sus siglas en inglés) mientras que el otro grupo son neuronas que liberan glicina (Wong-Riley y Lui, 2005; Smith et al., 2007). Como se mencionó anteriormente, las señales inhibitorias no son indispensables para la generación de la actividad del preBötC. Sin embargo, la neurotransmisión inhibitoria favorece la regularidad de la actividad inspiratoria y regula la transición entre las distintas fases del ciclo respiratorio (Wong-Riley y Lui, 2005; Smith et al., 2007).

Además de los neurotransmisores que se mencionaron anteriormente, existen neuromoduladores que pueden regular la generación de la actividad respiratoria (Peña-Ortega, 2012; Doi y Ramirez, 2018), muchos de los cuales se liberan de manera tónica en el preBötC (Peña-Ortega, 2012; Doi y Ramirez, 2018). Si el tono de estos moduladores cambia, se producen modificaciones en la actividad respiratoria (Peña-Ortega, 2012; Doi y Ramirez, 2018), que incluso han llegado al planteamiento de que algunos de estos tonos de modulación son necesarios para la generación de la actividad basal del preBötC (Peña-Ortega, 2012). Por ejemplo, se ha encontrado que la generación de la actividad basal del preBötC requiere de un tono modulador serotoninérgico (Peña y Ramirez, 2002), pues el bloqueo de la activación endógena y constante del receptor 5-HT_{2A} serotonina produce una reducción en la amplitud, la frecuencia y la regularidad de la actividad respiratoria en el preBötC (Peña y Ramirez, 2002). También, se ha reportado que el bloqueo de la actividad endógena del receptor α 2 noradrenérgico produce una reducción en la frecuencia de la actividad respiratoria (Viemari, 2008). Con el conocimiento de que existen neuronas histaminérgicas dentro de los circuitos respiratorios del tallo cerebral (Dutschmann et al., 2003), se ha demostrado que el bloqueo de la activación tónica y endógena del receptor H₁ disminuye la frecuencia de la actividad respiratoria registrada en el nervio frénico (Dutschmann et al., 2003).

Otra sustancia que también modula tónicamente la actividad del preBötC es la acetilcolina (Coddou et al., 2009; Shao y Feldman, 2009). Esto se ha demostrado al observar que el bloqueo de los receptores muscarínicos reduce la amplitud y la frecuencia de la actividad inspiratoria (Coddou et al., 2009), mientras la inhibición de la degradación de la acetilcolina incrementa la frecuencia de la actividad rítmica en el preBötC (Shao y Feldman, 2009). La sustancia P, que es un neuromodulador de naturaleza peptídica y agonista del receptor NK₁ (Gray et al., 2001), produce una despolarización lenta en las neuronas del preBötC (Peña y Ramirez, 2004; Ptak et al., 2009). Interesantemente, el bloqueo de los receptores NK₁ produce la aparición de apneas, que son periodos en donde no se lleva a cabo la respiración (Yeh et al., 2017), lo que permite señalar que este modulador es importante para la generación de la actividad respiratoria (Gray et al., 2001). La adenosina es un mediador que se liberan tónicamente y que contribuye a la modulación de la actividad basal del preBötC (Schmidt et al., 1995; Herlenius y Lagercrantz, 1999; Wilken et al., 2000; Huxtable et al., 2009). La adenosina es un neuromodulador que puede ser liberado directamente o puede sintetizarse a partir de la degradación del ATP extracelular (Wilken et al., 2000). Debido a que la adenosina tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad del preBötC (Schmidt et al., 1995; Herlenius y Lagercrantz, 1999; Wilken et al., 2000; Huxtable et al., 2009; Zeicker et al., 2011), el bloqueo de la actividad endógena de los receptores A₁ incrementa la frecuencia de las inspiraciones y puede llevar al circuito respiratorio a un estado de

hiperexcitabilidad (Wilken et al., 2000). En el sistema nervioso muchos tipos celulares pueden liberar los mediadores anteriormente mencionados (Wilken et al., 2000) pero, como se mencionará más adelante, el origen de dichos factores determina el impacto que tienen sobre la actividad de los circuitos neuronales (Parkhurst et al., 2013). Una fuente de muchos de estos factores capaces de modular la actividad neuronal son las células gliales (Wilken et al., 2000; Witts et al., 2012).

En el caso del preBötC, la microglía podría contribuir a la modulación tónica de la actividad basal de este circuito (Lorea-Hernández, 2015; Peña-Ortega, 2017). De hecho, ya hay evidencia de que la interacción adecuada entre la microglía y las neuronas es determinante para el control central de la actividad respiratoria (Horiuchi et al., 2017). Un buen ejemplo de lo anterior, y del que profundizaremos más adelante, es lo observado en un modelo transgénico del síndrome de Rett (RTT) (Horiuchi et al., 2017). Este modelo cursa con una depresión respiratoria que es revertida cuando las células microgliales nativas del mutante son remplazadas por células linfoides provenientes de un organismo de fenotipo silvestre (Horiuchi et al., 2017). En este caso, se determinó que la señalización dependiente del receptor Cx3CR1, un receptor expresado principalmente por la microglía dentro del sistema nervioso es determinante para la aparición de las alteraciones respiratorias en el modelo, ya que el bloqueo de la actividad de este receptor revierte la depresión respiratoria asociada al RTT (Horiuchi et al., 2017). También, se ha demostrado que la inhibición de la actividad microglial disminuye la amplitud de las ráfagas inspiratorias en rebanadas de tallo cerebral que contienen al preBötC (Lorea-Hernández, 2015; Lu et al., 2012), lo que refuerza la noción de que la microglía podría contribuir a la generación de la actividad respiratoria en el preBötC. A continuación, se describirán algunas generalidades de este tipo celular.

La microglía, el macrófago residente del SNC

La microglía es un grupo de células de origen mesodérmico que en estadios muy tempranos del desarrollo embrionario ingresan al SNC y lo colonizan para establecerse como la población de macrófagos residentes (Hutchins et al., 1990; Ashwell et al., 1991; Alliot et al., 1999). Los precursores de los macrófagos residentes del SNC ingresan desde saco vitelino hacia los tejidos embrionarios a partir del establecimiento de un sistema circulatorio funcional en el feto, aproximadamente en el día gestacional 9 de los ratones (Ginhoux et al., 2010). Lo anterior, también ocurre en otras especies en estadios de desarrollo similares (Ginhoux et al., 2010). Los precursores de los macrófagos residentes del SNC que se alojan en el SNC dan origen a la microglía siguiendo una vía de diferenciación dependiente de la señalización del receptor del factor estimulante de colonias de tipo-1(CSF1r, por sus siglas en inglés) (Alliot et al., 1999; Ginhoux et al., 2010).

En el SNC maduro, la microglía se encuentra ampliamente distribuida dentro de todo el parénquima (Dalmau et al., 1998), aunque con mayor densidad en la materia gris (Dalmau et al., 1998). Estas células se caracterizan por su morfología ramificada de soma reducido y que presenta procesos celulares numerosos (Hutchins et al., 1990; Ashwell et al., 1991; Esiri et al., 1991; Geny et al., 1995; Rezaie y Male, 1999; Ji et al., 2013). La microglía representa entre 10 y el 15 % de las células gliales presentes en el tejido nervioso dependiendo de la región en la que se observe (Lawson et al., 1990).

Debido a su origen macrofágico, las funciones de la microglía se relacionan clásicamente con la inmunidad innata (Hutchins et al., 1990; Ashwell et al., 1991; Esiri et al., 1991; Geny et al., 1995; Rezaie y Male, 1999). Sin embargo, la microglía también es muy importante para el adecuado desarrollo del sistema nervioso (Paolicelli et al, 2011; Miyamoto et al., 2013; Zhan et al., 2014; Gomez-Nicola y Perry, 2014) y el mantenimiento de su homeostasis (Tremblay et al., 2010; Paolicelli et al, 2011; Miyamoto et al., 2013; Zhan et al., 2014; Gomez-Nicola y Perry, 2014).

Dependiendo de las condiciones que predominen en su entorno, la microglía presenta diferentes “estados” (Dalmau et al., 1998) que se describen brevemente a continuación. En condiciones fisiológicas, la microglía se encuentra en un estado vigilante que se caracteriza por una morfología ramificada de soma reducido, con procesos celulares numerosos (Lorier et al., 2007). En este estado, la microglía “monitorea” el ambiente que le rodea (Nimmerjahn et al., 2005; Hanisch y Kettenmann,

2007; Kettenmann y Verkhratsky, 2008) extendiendo y retrayendo sus procesos constantemente y estableciendo contactos con elementos sinápticos que pueden durar minutos y cuya frecuencia es dependiente de la actividad neuronal (Wake et al., 2009). La microglía vigilante remodela constantemente las conexiones sinápticas, removiendo aquellas sinapsis que no son funcionales, a través de fagocitosis (Nimmerjahn, 2005; Hanisch y Kettenmann, 2007; Kettenmann y Verkhratsky, 2008) y fortaleciendo otras conexiones ya existentes o induciendo el crecimiento de nuevas sinapsis al liberar factores tróficos (Miyamoto et al., 2016; Weinhard et al., 2018). En su estado vigilante, la actividad de la microglía también favorece la supervivencia y la proliferación de neuroblastos (Wirenfeldt, 2005).

Un hecho interesante de la microglía es que expresa receptores para virtualmente todos los neurotransmisores (NT) del sistema nervioso (Pocock y Kettenmann, 2007). Cuando un NT estimula a su receptor en la membrana de la microglía, se pueden inducir incrementos transitorios en la concentración intracelular de calcio en respuesta a la actividad neuronal (Araque et al., 1999), lo que a su vez induce la liberación de sustancias llamadas gliotransmisores (GT) (Fellin et al., 2006). Cuando estos GT son liberados pueden estimular receptores en las neuronas modulando así su actividad eléctrica y sináptica, así como la plasticidad sináptica en el corto y en el largo plazos (Araque et al., 1998; Araque et al., 1999; Araque y Navarrete, 2010; Peña-Ortega, 2017). Todo lo anterior, constituye un sistema de comunicación bidireccional entre las neuronas y la microglía que se encuentra activo tanto en condiciones fisiológicas (Hülsmann et al., 2000; Fellin et al., 2006; Huxtable et al., 2010) y patológicas (Hülsmann et al., 2000; Huxtable et al., 2010; Pascual et al., 2011; Rivera-Angulo y Peña-Ortega, 2014).

La microglía es altamente responsiva, y manifiesta su estado activado, ante cualquier alteración en la homeostasis del sistema nervioso, como la que se presenta ante una infección (Kreutzberg, 1996), un trauma (Raivich et al., 1999; Ladeby et al., 2005), algún tipo de isquemia (Morioka et al., 1991), alguna enfermedad degenerativa (Rupalla et al., 1998) o ante actividad neuronal aberrante (Ponomarev et al., 2006). Estas alteraciones inducen a que la microglía experimente cambios morfológicos y funcionales mediante un proceso denominado “activación microglial” (Morioka y Streit., 1991; Kreutzberg, 1996; Rupalla et al., 1998; Raivich et al., 1999; Ladeby et al., 2005; Ponomarev et al., 2006; Kettenmann et al., 2011). La microglía activada es altamente móvil y su morfología se torna ameboidea, además de que incrementa su actividad fagocítica e incrementa su liberación de citocinas proinflamatorias (Hanisch y Kettenmann, 2007; Kettenmann y Verkhratsky, 2008). La microglía activada puede también reclutar a otras células efectoras de la neuroinflamación como los astrocitos, para participar conjuntamente en la respuesta para eliminar la alteración de la homeostasis (Pascual et al., 2011).

Dependiendo de qué estímulo activa a la microglía, estas células presentan diferentes estados de activación con características particulares (Mosser y Edwards, 2008). Por ejemplo, la microglía activada con LPS, un componente de la pared celular de bacterias Gram-negativas, adquiere un perfil proinflamatorio (Rietschel et al., 1994). Esta activación está mediada por los receptores tipo *toll* (TLRs, por sus siglas en inglés) que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos y que también reconocen moléculas generadas endógenamente a consecuencia de daño tisular o algún otro proceso patológico (Saijo et al., 2012). Por el contrario, la activación de la microglía con fractalquina, a través de su receptor CX3Cr1, induce un estado de activación que protege a las neuronas de los efectos excitotóxicos del glutamato (Lauro et al., 2010).

Varias de las sustancias que libera la microglía en sus diferentes estados de activación son mediadores de la respuesta inmune (Esiri et al., 1991) que, además, presentan funciones fisiológicas particulares dentro del sistema nervioso (Greaber et al., 2011). Por ejemplo, la DAP-12 es una molécula señalizadora dentro de la respuesta inflamatoria producida por la microglía que participa además en la plasticidad sináptica y modula la neurotransmisión glutamatérgica (Northrup y Yamamoto, 2011). El TNF- α es una citocina proinflamatoria, cuya liberación incrementa cuando se presenta un daño en el SNC (Stellwagen y Malenka, 2006). Sin embargo, este factor también se libera de manera tónica bajo condiciones fisiológicas, aunque en cantidades muy pequeñas (Stellwagen y Malenka, 2006). Se ha señalado que el fenómeno de reescalamiento sináptico en las sinapsis glutamatérgicas del hipocampo requiere de un “tono” de liberación de TNF- α (Stellwagen y Malenka, 2006).

La microglía ejerce una importante influencia sobre los circuitos neuronales tanto en condiciones fisiológicas como durante una alteración de la homeostasis (Esiri et al., 1991; Stellwagen y Malenka, 2006; Northrup y Yamamoto, 2011; Greaber et al., 2011). Lo anterior, se lleva cabo a través de mecanismos muy diversos y complejos que incluso podrían ser específicos de cada región del SNC (Grabert et al., 2016). Aunque algunos de estos mecanismos no se comprenden del todo o son desconocidos, hay interacciones de la microglía con otros elementos celulares que ya se han descrito y que representan piezas fundamentales en el entendimiento del papel que desempeña la microglía al interior del SNC.

Regulación de la actividad microglial dependiente de calcio

El monitoreo del microambiente, el mantenimiento de las sinapsis, así como el soporte trófico son funciones constitutivas de la microglía que se asocian a cambios en la concentración intracelular de calcio en estas células (Wong et al., 2015). Tanto el aspecto trófico como el inmunológico de la función microglial pueden ser modulados por cambios en la concentración intracelular de calcio que dependen de diferentes receptores metabotrópicos e ionotrópicos (Liu et al., 2016). Varios sistemas de señalización de la microglía actúan a través de receptores de ambos tipos (Liu et al., 2016). La microglía expresa receptores para GABA de tipo A y B (Liu et al., 2016). Cuando se activan los receptores para GABA de tipo A se induce un fenotipo neuroprotector en la microglía, mientras que cuando se activan los receptores para GABA de tipo B se favorece la producción de factores inflamatorios (Liu et al., 2016). Una situación similar ocurre con la señalización dependiente de glutamato (Murugan et al., 2011; Liu et al., 2016). La activación de receptores ionotrópicos de glutamato de tipo AMPA, los metabotrópicos de tipo GluR del 1 al 4, los de tipo Kainato y los de tipo NMDA, induce la liberación de factores inflamatorios como el TNF α , la IL1 β y el óxido nítrico (NO) (Liu et al., 2016). Adicionalmente, se ha demostrado, en cultivos primarios de microglía, que la aplicación de MK801, un antagonista de los receptores de glutamato de tipo NMDA, reduce la expresión de TNF α , IL1 β , iNOS y NO a través de interferir con la translocación del Nf- κ B hacia el núcleo (Murugan et al., 2011). Por el contrario, la estimulación de los receptores a glutamato tipo NMDA induce un incremento en la concentración intracelular de calcio en la microglía y la liberación de citocinas (Murugan et al., 2011). La microglía también expresa miembros de las tres familias de receptores metabotrópicos para glutamato, por ejemplo, el mGlu5a que es miembro del grupo I, el mGlu2 y 3, miembros del grupo II y los mGlu4, 6 y 8, pero no el 7, miembros del grupo III (Liu et al., 2016). Los receptores metabotrópicos a glutamato del tipo III inducen una disminución en la reactividad de la microglía ante la estimulación con LPS, favoreciendo el establecimiento de un estado de activación menos citotóxico, al contrario de los otros dos grupos de receptores a glutamato que inducen la liberación de factores inflamatorios y citotoxicidad (Liu et al., 2016).

En la microglía, la actividad de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs por sus siglas en inglés) regula varias de sus funciones de manera constitutiva (Haque et al., 2018). Los GPCRs son la familia de receptores membranales más grande (Gainetdinov et al., 2004). Dentro del SNC varios de los receptores que reconocen a los neurotransmisores y neuromoduladores como la dopamina, la serotonina y la noradrenalina son GPCRs y (Gainetdinov et al., 2004). Como se mencionó previamente, la microglía expresa muchos de estos receptores (Pocock y Kettenmann, 2007). En la microglía la activación de los receptores adrenérgicos y canabinérgicos asociados a proteínas G induce la liberación de citocinas inflamatorias como la IL6 y el TNF α (Liu et al., 2016).

La transmisión colinérgica también modula la actividad de la microglía a través de vías ionotrópicas y metabotrópicas. La microglía expresa receptores nicotínicos de acetilcolina (Han et al., 2014), que son ionotrópicos y cuya actividad produce la entrada de calcio y la reducción en la fosforilación de la subunidad p65 del NF- κ B, lo que promueve una polarización antiinflamatoria en la microglía (Han et al., 2014). En modelos murinos se ha reportado que una subpoblación de microglía (entre el 11 y el 16 % de la microglía total aislada de tejido fresco) expresa receptores muscarínicos de acetilcolina desde un periodo posnatal temprano y hasta la adultez (Pannell et al., 2016), lo que sugiere que el sistema colinérgico-muscarínico es importante para la modulación de la actividad microglial. En cultivos primarios, la aplicación de carbacol, un agonista

colinérgico, produce un incremento en la concentración intracelular de calcio en la microglía, además de inducir quimiotaxis y una reducción de la fagocitosis en estas células (Pannell et al., 2016). En la microglía responsiva a carbacol, la expresión del receptor M3 incrementa después de exponer las células a interferón γ (Pannell et al., 2016), lo que podría implicar que, la modulación microglial dependiente del receptor colinérgico M3 podría tener un gran impacto en la modulación colinérgica en el SNC, durante el establecimiento de la respuesta inflamatoria que ocurre en diversas patologías.

La modificación genética del receptor M3 resultó en el desarrollo de los DREADDS Gq, una herramienta que permite, de manera célula específica (Zhang et al., 1998; Grace et al., 2018), regular positivamente la actividad de la fosfolipasa C y de esta manera reclutar vías de señalización dependientes de IP3 y de un incremento en la concentración intracelular de calcio (Eglen et al., 1994). Esto es interesante ya que en el presente trabajo se utilizó esta herramienta para activar a la microglía. Como ya se mencionó la actividad endógena del receptor colinérgico M3 regula las funciones microgliales y podría ocurrir que la estimulación quimiogénica de la microglía induzca un estado de activación similar al que produce la activación del M3 endógeno.

Además de la actividad de los GPCRs, existen canales como los TRPM y TRPV que permiten el ingreso de calcio a la célula favoreciendo también la actividad de la PLC y la señalización dependiente de IP3 (Gong et al., 2018). El TRPM2 es un canal catiónico permeable a calcio y sensible al estrés oxidativo, cuya actividad se ha asociado al estado de activación microglial que favorece el establecimiento de la neuroinflamación (Malko et al., 2019). EL TRPV1 es un canal catiónico no selectivo que está altamente expresado en la microglía y que permite que sea activada por la señal producida por diferentes factores endógenos como la acidificación del medio extracelular, la presencia de ATP, de diferentes aminas y amidas que, en general, son factores asociados a estrés o daño en el tejido nervioso (Xu y Beech, 2001; Marrone et al., 2017). Algunos efectos de la activación del receptor TRPV1 en la microglía son, la producción de ROS, la migración, la producción de citocinas e incluso la inducción de la apoptosis (Xu y Beech, 2001; Marrone et al., 2017). Los TRPV2 son canales que se encuentran principalmente en las membranas internas y, en menor cantidad, en la membrana celular (Echeverry et al., 2016). La activación microglial lleva a la translocación del TRPV2 hacia la membrana microglial, así como un incremento en su expresión, lo que también se asocia con la liberación de citocinas (Echeverry et al., 2016).

Como se mencionó previamente, los mediadores purinérgicos como el ATP y la adenosina modulan la actividad respiratoria (Schmidt et al., 1995; Herlenius y Lagercrantz, 1999; Wilken et al., 2000; Huxtable et al., 2009), además de que la principal fuente de estos mediadores en el SNC son las células gliales (Wilken et al., 2000; Witts et al., 2012). Interesantemente, la reducción del ATP en el medio extracelular reduce la liberación de citocinas en la microglía estimulada con LPS (Monif et al., 2009), lo que indica que la señalización purinérgica también puede modular la actividad de estas células. Además de producir y liberar mediadores purinérgicos, la microglía posee receptores ionotrópicos y metabotrópicos que reconocen al ATP y sus derivados (Monif et al., 2009). Los receptores P2XR7 constituyen una familia de receptores purinérgicos ionotrópicos que reconocen al ATP y que, una vez activados, permiten el ingreso no selectivo de cationes como el calcio y el sodio a la microglía (Gong et al., 2018; Monif et al., 2009). En modelos murinos y en tejido humano, se ha encontrado que los receptores P2XR7 se expresan en la microglía y que su activación resulta en la liberación de citocinas (He et al., 2017). Sin embargo, la señalización dependiente del receptor P2XR7 también puede inducir apoptosis en la microglía (He et al., 2017). Se ha demostrado que existe una correlación entre la cantidad liberada de factores microgliales como la IL6, IL8 y MCP1 y los niveles de expresión de los receptores P2X7 (Nie et al., 2016). En ausencia de un insulto inmunológico, la sola sobreexpresión de estos receptores produce la activación y la proliferación de la microglía en cultivos primarios (Monif et al., 2009). También, se ha demostrado que la eliminación del poro en versiones mutantes de estos receptores produce una marcada reducción en la activación dependiente de ATP en la microglía (Monif et al., 2009).

La activación de la microglía, dependiente de NLRP3, requiere de la acción del IP3 y otros de un sistema llamado SOCE (por las siglas en inglés de “Entrada de Calcio Operada por las Reservas”) (Murakami et al., 2012). Sin embargo, la activación de ambos sistemas no es suficiente para producir un cambio de estado en la microglía (Murakami et al., 2012). Se propone que es

necesaria la acción conjunta de la activación autócrina de la familia de receptores P2RX7 (Monif et al., 2009) y la activación del NLRP3 para lograr un cambio de estado en la microglía (Murakami et al., 2012).

La liberación de calcio desde las reservas intracelulares es un evento necesario para la activación microglial dependiente de la señalización de TLR4 (Sun et al., 2014). Después del vaciado de las reservas intracelulares de calcio, el SOCE permite el ingreso de este catión a través de la membrana celular (Sun et al., 2014). Los canales Orai1 son canales iónicos selectivos a calcio que permiten su ingreso desde el exterior celular una vez que se ha producido la depleción de las reservas intracelulares de calcio (Feske et al., 2006; Putney, 2009). Se ha demostrado que la entrada de calcio dependiente de SOCE activa distintas vías de señalización en la microglía (Sun et al., 2014). Por ejemplo, la eliminación o el bloqueo del sistema SOCE reduce la actividad de NfκB, al disminuir la fosforilación y la acetilación de su subunidad p65 (Sun et al., 2014). Adicionalmente, este sistema dependiente de calcio reduce la fosforilación de ERK1 y JNK (Sun et al., 2014). La actividad de la PKC, que también depende de calcio, produce un incremento en la liberación de citocinas y constituye otra vía de señalización dependiente del incremento de calcio intracelular que es afectada por la eliminación del SOCE (Sun et al., 2014). Es posible que la entrada de calcio que produce la actividad de la ChR2 estimule también algunas de estas vías de señalización. También se ha reportado que la liberación de ROS puede ser modulada por la entrada de calcio mediada por la acción del intercambiador de sodio/calcio en la microglía (Lively y Schilichter, 2018). Interesantemente, en este trabajo se demostró que dos estímulos inflamatorios, uno estéril y el otro no-estéril, producen una morfología distinta en la microglía activada, además de que el estímulo estéril produce menos ROS en comparación con el estímulo no-estéril (Lively y Schilichter, 2018). Como se mostrará en la sección de resultados de este proyecto, lo anterior guarda importantes similitudes con la estimulación quimiogénica y optogénica de la microglía.

Modulación de la actividad neuronal por la microglía

Desde etapas muy tempranas del desarrollo, la microglía define la actividad de los circuitos neuronales al participar en el modelamiento de sus características estructurales y sus conexiones sinápticas (Miyamoto et al., 2016). La microglía favorece el establecimiento y la maduración funcional de la pre- y la post-sinapsis y, en general, de toda la conectividad los circuitos neuronales a través del fortalecimiento de las conexiones más activas y la eliminación de las conexiones menos eficientes (Schafer et al., 2012; Miyamoto et al., 2013; Wake et al., 2013). Mediante esta poda sináptica, la microglía favorece la maduración adecuada de los circuitos neuronales en desarrollo (Paolicelli et al., 2011; Ji et al., 2013). Además, en el sistema nervioso adulto, la microglía extiende sus procesos constantemente para “censar” la actividad de las uniones sinápticas (Ji et al., 2013; Kettenmann et al., 2013). Como ya se mencionó, cuando un botón sináptico deja de ser funcional es fagocitado por la microglía como un mecanismo que permite mantener la eficiencia de los circuitos (Ji et al., 2013; Kettenmann et al., 2013). También se ha observado que la microglía puede modular la actividad de sinapsis axosomáticas inhibitoras (liberadoras de GABA) a través de la interrupción directa de la conexión sináptica (Chen et al., 2014). En este caso, los procesos microgliales actúan como interruptores al interponerse físicamente entre los elementos presinápticos y la postsinápticos, modulando de esta forma la excitabilidad neuronal (Chen et al., 2014). Además de lo anteriormente mencionado, la microglía modula la actividad neuronal a través de la liberación de GT (Fellin et al., 2006). La microglía no es capaz de generar potenciales de acción, por lo que la mayor parte de las interacciones que establece con otras células del SNC (neuronas y astrogía) se llevan a cabo a través de la liberación de diferentes sustancias que sirven para comunicar todas estas células (Fellin et al., 2006; Haydon y Carmignoto, 2006; He y Sun, 2007; Huxtable, 2010). Sustancias como el glutamato, el ATP y la d-serina permiten que la microglía module la actividad de las redes neuronales (Haydon y Carmignoto, 2006; He y Sun, 2007; Huxtable, 2010). Además, la microglía libera varias citocinas, como la IL-1β que pueden aumentar o disminuir la excitabilidad de las neuronas (Bessis et al., 2007; Hanisch y Kettenmann, 2007), así como modular la transmisión sináptica (Pocock y Kettenmann, 2007; Pascual et al., 2011). Por ejemplo, a través de la liberación de ATP, la microglía puede modular de forma indirecta la actividad neuronal

(Pascual et al., 2011). La liberación de ATP desde la microglía produce el reclutamiento de los astrocitos a través de la estimulación del receptor P2Y1R en la astroglia, lo que induce que los astrocitos liberen glutamato que, a su vez, estimula receptores metabotrópicos en las neuronas y, así, aumenta la frecuencia de las corrientes postsinápticas excitatorias (Pascual et al., 2011).

Un mecanismo de modulación directa en la microglía sobre las neuronas involucra la liberación del glutamato microglial sobre las neuronas (Domercq et al., 2007). Además, la microglía contribuye a modular la cantidad disponible de glutamato en el medio extracelular, pues poseen un sistema de recaptación que permanece activo en la microglía vigilante (Domercq et al., 2007). Adicionalmente al sistema de recaptura microglial, el glutamato liberado por la microglía puede ser removido rápida y eficientemente por los sistemas transportadores de glutamato en los astrocitos e incluso en los oligodendrocitos (Domercq et al., 1999). Todos estos sistemas de recaptura de glutamato son interferidos por la activación proinflamatoria de la microglía (Lorier et al., 2007; Kettenmann, 2011; Saijo, 2013). En condiciones proinflamatorias, la microglía libera una gran cantidad de sustancias que interfieren con este proceso como son las especies reactivas de oxígeno (ROS), el TNF α y la IL-1 β (Bessis et al., 2007; Domercq et al., 2007).

Considerando lo anterior, se puede concluir que la microglía ejerce una influencia importante dentro de los circuitos neuronales, en parte, a través de una vía de comunicación glutamatérgica (Maezawa y Jin, 2010). Además, esta vía representa un eje de comunicación bidireccional, ya que la liberación de glutamato desde las neuronas y otras células gliales puede inducir diferentes respuestas por parte de la microglía (Domercq et al., 2007). Por ejemplo, la estimulación de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo II (mGlu2) en la microglía, induce la activación de la microglía en un fenotipo neurotóxico (Taylor, 2005), que libera gran cantidad de TNF α (Taylor, 2005). A su vez, la unión del TNF α a su receptor (el TNFR1, por sus siglas en inglés) promueve la activación de la caspasa 3, lo que induce la apoptosis neuronal (Taylor, 2005). En contraste, si los receptores glutamatérgicos microgliales estimulados son los mGlu del grupo III (mGlu3), la microglía se activa con un fenotipo neuroprotector (Taylor, 2005), que bloquea la producción de toxinas que normalmente son liberadas cuando la microglía es activada por el LPS o por la proteína β amiloide (Bruno et al., 1997, 1998; Taylor et al., 2003). Este sistema de comunicación se exagera en condiciones patológicas, pues cuando ocurre algún daño al tejido nervioso se libera una gran cantidad de glutamato que actúa como un agente excitotóxico (D'Antoni et al., 2008, Taylor et al., 2003; Taylor et al., 2005; Conn y Pin, 1997; Besong et al., 2002).

Además de la comunicación bidireccional microglía-neuronas que permite el glutamato, las neuronas liberan constantemente una mezcla compleja de sustancias capaces de influir sobre las funciones microgliales y determinar el fenotipo que ésta presenta (Polazzi et al., 2002; Biberet al., 2007; Luo et al., 2012). Algunos ejemplos de estos sistemas bidireccionales de comunicación son el CD200-CD200R (Polazzi et al., 2002; Hoek, et al. 2000), el Csf1-IL-34-Csf1R (Polazzi et al., 2002, Lin. 2009), el CD22-CD45 (Polazzi et al., 2002), el CD47-SHPS-1 (Polazzi et al., 2002), el CCL21-CX3CR3 (Polazzi et al., 2002; Rappert, et al., 2002), el TREM2-DAP12 (Polazzi et al., 2002; Neumann et al., 2007), el CXCL10-CX3CR3 (Polazzi et al., 2002; Rappert, et al., 2002) o el sistema CX3CL1-CX3CR1 (Suzuki et al., 2007; Sun et al., 2015). Estos sistemas vinculan la actividad de las neuronas con la actividad de la microglía (Biber et al., 2007), bajo condiciones fisiológicas y patológicas (Polazzi et al., 2002). De esta forma, en cada circuito del SNC se establecen patrones de actividad bi- o multidireccional que resultan de la interacción de la microglía con las neuronas y otras células gliales (Araque y Navarrete, 2010; Peña-Ortega et al., 2017).

Posible influencia de la microglía sobre la generación central de la respiración

Como se mencionó previamente, el preBötC es el circuito neuronal que comanda la actividad respiratoria en los mamíferos (Richter et al., 1999) y se ha señalado que la actividad de las células gliales presentes en el preBötC es necesaria para la generación y modulación de la actividad respiratoria (Gourine et al., 2010; Ballanyi et al., 2010; Gourine y Kasparov, 2011;

Schnell et al., 2011; Kasparov, 2011; Mulkey y Wenker, 2011; Mitterauer, 2011; Okada et al., 2012; Kasymov et al., 2013). Como se mencionó anteriormente, el modelo genético del síndrome de Rett (RTT) es un gran ejemplo de la importancia que tiene la actividad microglial en la generación de la actividad respiratoria. En este modelo se induce la deficiencia del gen MeCP2 en ratones, lo que reproduce los principales signos del síndrome en humanos, como la exhibición de conductas asociadas al autismo como las estereotipias (movimientos repetitivos; Hagberg et al., 1983) y alteraciones respiratorias severas (Viemari et al., 2005). Aunque la expresión del gen MeCP2 es común a todas las células del organismo, su deficiencia produce afectaciones que se presentan principalmente en el sistema nervioso (Lioy et al., 2014). Inicialmente, se propuso que estas alteraciones se debían a la pérdida del MeCP2 en las neuronas (Chen et al., 2001). Sin embargo, la pérdida del MeCP2 en la microglía es determinante para la severidad y/o la progresión de las alteraciones neuronales asociadas a este síndrome (Lioy et al., 2014). Además, se ha determinado en el modelo RTT que la deficiencia respiratoria severa característica del síndrome podría derivar de alteraciones en la función de la microglía (Hülsmann et al., 2000, Viemari et al., 2005; Maezawa y Jin, 2010; Derecki et al., 2012; Lioy et al., 2014; Schnell et al., 2016; Horiuchi et al., 2017). En ratones RTT la microglía libera cinco veces más glutamato que la microglía de animales de genotipo silvestre (Maezawa y Jin, 2010). Adicionalmente, la deficiencia del MeCP2 reduce la expresión del transportador de glutamato VGLUT1, dificultando la eliminación del glutamato del espacio extracelular, lo que favorece una condición de excitotoxicidad y el desarrollo de anomalías estructurales de las sinapsis (Maezawa y Jin, 2010). Interesantemente, varias de estas alteraciones se corrigen al modular la actividad microglial, pues el bloqueo del receptor CX3CR1 (receptor mayoritariamente microglial) o el remplazo de las células microgliales del mutante por células linfoides de genotipo silvestre (mismas que eventualmente se diferencian a microglía) revierten las alteraciones respiratorias e incrementan la expectativa de vida de los ratones RTT (Derecki et al., 2012; Horiuchi et al., 2017). En nuestro laboratorio se han encontrado evidencias de que la microglía modula la actividad preBötC en condiciones más fisiológicas y que, incluso, estas células podrían ser indispensables tanto para la generación de la actividad respiratoria (Lorea-Hernández, 2015), como para la presentación de fenómenos plásticos de la respiración (Camacho-Hernández et al., 2018).

Un trabajo más que apoya la noción de que la actividad de las células gliales es importante para la generación de la actividad respiratoria es el de Stokes y colaboradores (2017). Este grupo demostró que las adaptaciones respiratorias que se producen en respuesta a la hipoxia crónica no se presentan si se bloquea la actividad de la microglía administrando minociclina, un antibiótico que tiene actividad antiinflamatoria e inhibitoria de la microglía (Stokes et al., 2017). La aplicación de minociclina evita la aparición de signos morfológicos de activación en la microglía y esto es acompañado por el bloqueo de los cambios en la actividad respiratoria asociados a la exposición a la hipoxia crónica (Stokes et al., 2017). Relacionado al hallazgo anterior, se ha observado que la exposición a la hipoxia produce la activación de la microglía del tallo cerebral (MacFarlane et al., 2016). Esta activación de la microglía se ha asociado con una depresión de la respuesta ventilatoria a la hipoxia, misma que podría involucrar la liberación de citocinas, como la IL-1 β (MacFarlane et al., 2016).

Son muchos los mediadores microgliales que podrían modular la generación de la actividad respiratoria (Pyatin y Miroshnichenko, 2001; Dutschmann et al. 2003; Bouvier et al., 2008; Garcia et al., 2011; Peña-Ortega, 2012; Koch et al., 2014). Además de algunos neuromoduladores mencionados en la sección, algunos de los cuales son liberados por la microglía (Peña-Ortega, 2012; Doi y Ramirez, 2018), otros mediadores microgliales que pueden regular la respiración incluyen a los radicales libres (específicamente el H₂O₂ y el NO) y la prostaglandina E₂ (PGE₂ por sus siglas en inglés) (Pyatin y Miroshnichenko, 2001; Dutschmann et al. 2003; Bouvier et al., 2008; Garcia et al., 2011; Peña-Ortega, 2012; Koch et al., 2014). Si bien, muchas de estas sustancias pueden ser producidas por varios tipos celulares del SNC, la liberación microglial de estos factores podría ser determinante para la modulación de la actividad del preBötC, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (von Bernhardt y Ramirez, 2001). Como se mencionó previamente, la microglía presenta diferentes estados y, dependiendo el estado en el que se encuentre, su influencia sobre el preBötC podría cambiar (Mosser y Edwards, 2008; Greaber et al., 2011). Por ejemplo, la microglía libera diferentes citocinas proinflamatorias que pueden modular la generación de la actividad respiratoria (Stoltenberg et al., 1994; Frøen et al., 2000; Olsson et al., 2003; Hofstetter y Herlenius, 2005, Herlenius, 2011). Una citocina liberada en grandes cantidades por la microglía activada es la IL-1 β , que es un depresor de la

actividad respiratoria (Olsson et al., 2003; Hofstetter y Herlenius, 2005; Gresham et al., 2011) a la cual se le dará un apartado la final de la Introducción de esta tesis.

Para estudiar las interacciones neurona-microglía se han desarrollado diferentes fármacos que permiten manipular la actividad microglial (Peña-Ortega, 2017). Aunque estas herramientas tienen una utilidad muy valiosa, a menudo sus efectos no son específicos y podrían producir alteraciones en las funciones de otros elementos celulares al interior de SNC (Muecci et al., 2000; Husemann y Silverstein, 2001; Hatori et al., 2002; Lin et al., 2015; Shen et al., 2016). En esta tesis se utilizó una batería de fármacos que permitieron evaluar el efecto de la activación de la microglía sobre la actividad del preBötC, pero, considerando sus limitaciones producto de la inespecificidad celular, también se utilizaron herramientas mucho más específicas para investigar el efecto que tiene la actividad microglial sobre la generación de la actividad respiratoria. En los siguientes apartados se resumirán las principales características de las diferentes estrategias de estimulación microglial y se expondrán los posibles limitantes que presentan.

Activación farmacológica de la microglía

El lipopolisacárido (LPS)

Un activador “clásico” de la microglía es el LPS, que es el componente principal de la pared celular de las bacterias gram-negativas y que posee un gran potencial inmunogénico ya que induce la liberación de citocinas y también induce el reclutamiento celular como parte de la respuesta inflamatoria mediada por la microglía (Wang et al., 2005; Yoon et al., 2012). El receptor tipo toll 4 (TLR4) es un receptor de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos y es al que se une con mayor afinidad el LPS (Chen et al., 2012; Zeng et al., 2012; Hines et al., 2013). La activación de la microglía con LPS induce la activación de las MAP cinasas (Machado et al., 2011) y del factor de transcripción NF- κ B (Machado et al., 2011), lo que lleva a la síntesis y liberación de factores proinflamatorios por la microglía (Nakajima et al., 2001). Sin embargo, la microglía activada con LPS también produce factores neurotróficos que regulan la respuesta inflamatoria inicial, para eventualmente revertirla (Lauro et al., 2010). Si bien, el LPS es considerado como un activador microglial (Nakajima et al., 2001; Wang et al., 2005; Machado et al., 2011; Yoon et al., 2012), lo cierto es que podría tener efectos sobre otras células del SNC (Lin et al., 2015; Shen et al., 2016). Por ejemplo, se ha reportado que las neuronas también expresan a los receptores TLR4 (Lin et al., 2015). En el núcleo trigeminal es abundante la expresión del TLR4 en una gran parte de las neuronas (Lin et al., 2015). En los ganglios espinales de la asta dorsal, las neuronas sensoriales también expresan TLR en gran cantidad (Lin et al., 2015). En estos casos la estimulación del TLR4 con LPS afecta la excitabilidad de los circuitos neuronales (Lin et al., 2015). Adicionalmente, también se ha reportado que los astrocitos expresan el TLR4 y que su estimulación con LPS induce la liberación de gliotransmisores que incrementan la excitabilidad dentro de los circuitos neuronales (Shen et al., 2016).

El ácido desoxirribonucleico fragmentado (ADNf)

El ADNf es una preparación de ADN de composición diversa que también ha sido utilizada para activar a la microglía (Li et al., 2004). Se ha observado que las células microgliales en cultivo se activan en presencia de ADNf, lo que induce la liberación de IL-1 β (Li et al., 2004). Se ha determinado que la activación microglial inducida por el ADNf es mediada por la señalización de los receptores “scavenger” del tipo A y B (Li et al., 2004). Estos receptores “scavenger” permiten que la microglía se active cuando entra en contacto con el ADNf pues es una señal de daño tisular que se presenta en diversas patologías (Sheng et al., 2001). El ADNf actúa como un patrón molecular asociado a daño (DAMP, por sus siglas en inglés), que es reconocido por los receptores “scavenger” (Duran-Flores y Heil, 2018), lo que induce la activación del inflammasoma NLRP3 que resulta en una

respuesta típicamente proinflamatoria que involucra la señalización dependiente del factor regulador dependiente de interferón (IRF, por sus siglas en inglés, Duran-Flores y Heil, 2018). La respuesta proinflamatoria de la microglía inducida por el ADNf se ha observado tanto *in vitro* como *in vivo* (Collings et al., 2004). En el SNC los astrocitos también pueden expresar receptores “scavenger” de clase B en ratones y en humanos (Husemann y Silverstein, 2001), lo que los haría sensibles a este inmunógeno (Pascual et al., 2011). Por ello, la estimulación con ADNf dentro del tejido nervioso podría afectar la actividad neuronal a través de la estimulación de los astrocitos que, una vez activados, liberan sustancias que modulan la actividad neuronal como el glutamato y el ATP (Husemann y Silverstein, 2001, Pascual et al., 2011).

La fractalquina

La fractalquina (CX3CL1, por el gen que la codifica) es una quimiocina producida principalmente por las neuronas en el SNC (Pabon et al., 2011), esta proteína puede encontrarse anclada a la membrana celular o ser liberada en forma soluble después de su proteólisis por las metaloproteasas ADAM 10 y 17 (Pabon et al., 2011). La forma anclada a la membrana de la fractalquina se ha asociado con funciones de adhesión, mientras que la forma soluble de la fractalquina tiene efectos quimioatrayentes (Pabon et al., 2011). El receptor de la fractalquina, el CX3CR1, se encuentra expresado principalmente por la microglía y es un receptor acoplado a proteínas G (Pabon et al., 2011). Se ha observado que la estimulación del CX3CR1 en la microglía induce una respuesta bifásica, con una fase proinflamatoria temprana, dependiente del factor de transcripción NF- κ B y una fase antiinflamatoria dependiente de la activación del NRF2 (abreviatura para Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2) inducida por el propio NF- κ B, lo que se ha estimado que ocurre 120 minutos después de la activación del CX3CR1 (Galán-Ganga et al., 2019). Un desbalance en la relación fractalquina/CX3CR1 induce una activación preferencial de la microglía hacia su estado neurotóxico y proinflamatorio, impidiendo la transición de la fase proinflamatoria a la antiinflamatoria dentro la respuesta evocada por la fractalquina (Pabon et al., 2011). Se ha encontrado que en ratones y en el humano, el receptor CX3CR1 también se expresa en algunas neuronas además de en la microglía, pero no en los astrocitos (Hatori et al., 2002). Aunque la señalización autocrina del CX3CR1 en neuronas no se comprende por completo y la presencia del receptor es muy poco frecuente en las neuronas bajo condiciones fisiológicas (Hatori et al., 2002), se ha reportado que la estimulación del receptor CX3CR1 induce la activación de las vías de señalización dependientes de AKT y de PKC y que esto puede modular la sobrevivencia celular y la producción de la forma soluble de la fractalquina en las neuronas del hipocampo de ratas (Muecci et al., 2000; Hatori et al., 2002). La presencia del CX3CR1 en las neuronas permite su modulación directa con la utilización de fractalquina (Hatori et al., 2002), por lo que es complicado separar la aportación neuronal de la microglial en los efectos que se observan cuando se modula la actividad de los circuitos neuronales con la fractalquina (Hatori et al., 2002).

La leucadherina 1 (LKD1)

Otro fármaco que se ha utilizado para modular la actividad de la microglía es la LKD1, que actúa como un agonista del receptor del complemento 3 (CR3, por sus siglas en inglés) uniéndose a su subunidad CD11b (Czirr et al., 2017). La estimulación con LKD1 de la microglía induce un estado de activación antagónico de aquel inducido por la estimulación con LPS (Yao et al., 2018), pues, en este estado se produce la endocitosis del TLR4, lo que impide el reconocimiento del LPS por parte de la microglía (Yao et al., 2018). Se ha determinado que el estado inducido por la LKD1 en la microglía se caracteriza por la liberación de enzimas como la neprilisina y la enzima degradadora de insulina (EDI), lo que se ha probado, en modelos murinos de la enfermedad de Alzheimer, favorece la eliminación del péptido β amiloide ($A\beta$, por sus siglas en inglés) a través de su degradación y no de fagocitosis, como se creía anteriormente (Czirr et al., 2017). Considerando lo anterior, el estado de activación que produce la LKD1 en la microglía difiere considerablemente del que inducen el resto de los fármacos descritos, pues no incrementa ni la fagocitosis ni la liberación de citocinas una vez que se ha activado la microglía (Czirr et al., 2017).

Otras células dentro del SNC, como los astrocitos y las neuronas expresan diferentes factores del complemento que pudieran ser agonizados por la LKD1 (Gasque et al., 1997). Sin embargo, el CR3 parece ser un receptor cuya expresión está restringida a la microglía (Zhang et al., 2014).

Activación dirigida genéticamente a la microglía

Como se mencionó previamente, el uso de herramientas farmacológicas ha sido muy útil para estudiar la función de la microglía dentro de los circuitos neuronales (Camacho-Hernández et al., 2018; Pardo-Peña et al., 2018). Sin embargo, la inespecificidad en la expresión de los receptores a los que se unen los diferentes fármacos activadores de la microglía, así como la heterogeneidad en los efectos que estos producen, obstaculizan la interpretación de las observaciones que pudieran hacerse usando estas herramientas (Muecci et al., 2000; Husemann y Silverstein, 2001; Hatori et al., 2002; Lin et al., 2015; Shen et al., 2016). Por ello, se ha propuesto como alternativa, la expresión dirigida de canales y receptores transgénicos en la microglía como una estrategia para la estimulación precisa y específica de estas células (Tanaka et al., 2012; Sawada et al., 2012; Grace et al., 2018; Pardo-Peña et al., 2018).

Una de las herramientas de estimulación microglial específica es la expresión de la canalrhodopsina 2 (ChR2 por sus siglas en inglés), que es un canal iónico cuya apertura es inducida por la exposición a luz azul (con una longitud de onda de 470 nm, aproximadamente) y que produce el paso de cationes a través de la membrana (Nagel et al., 2002; Sasaki et al., 2012). A este procedimiento de control de la actividad celular por la expresión de proteínas sensibles a la luz se le ha denominado optogenética (Sasaki et al., 2012). Se ha demostrado que la inducción de corrientes catiónicas por la ChR2 en la microglía produce su activación y la liberación de citocinas proinflamatorias (Sawada, 2012). Esta estrategia ha permitido activar específicamente a la microglía en un estado que libera principalmente factores proinflamatorios (Tanaka et al., 2012; Sawada et al., 2012).

Otra herramienta que ha permitido la estimulación específica de la microglía es el uso de receptores diseñados para reconocer ligandos diseñados (DREADDs, por sus siglas en inglés) (Armbruster et al., 2007), que son proteínas modificadas a partir de los genes de la familia de receptores muscarínicos humanos (Armbruster et al., 2007). Este tipo de receptores están acoplados a proteínas G y han sido modificados para que ya no reconozcan a su ligando natural (la acetilcolina) (Armbruster et al., 2007), sino a la clozapina-N-óxido (CNO) que es una molécula inerte y que es el único ligando reconocido por los DREADDs (Armbruster et al., 2007; Grace et al., 2018). A este procedimiento de control de la actividad celular por la expresión de DREADDs se le ha denominado quimiogenética (Armbruster et al., 2007). Se ha utilizado el DREADD hMD3q para inducir la activación proinflamatoria de la microglía (Grace et al., 2018). El hMD3q está acoplado a una proteína Gq y su estimulación produce un incremento de la concentración intracelular de calcio causado por su movilización desde el retículo endoplasmático (Armbruster et al., 2007). Una vez que la CNO se une al receptor hMD3q se induce la activación de la fosfolipasa C (PLC, por sus siglas en inglés) que escinde al fosfatidilinositol 4,5 difosfato para producir IP3 y diacilglicerol (Tatcher, 2016). El retículo endoplasmático, una pieza clave en la señalización intracelular mediada por calcio, constituye un reservorio de calcio que expresa abundantemente a los receptores para IP3 que, cuando son activados, inducen la liberación de calcio hacia el citoplasma (Berridge, 1998)

En el presente proyecto se utilizaron estas dos estrategias de estimulación específica de la microglía (Tanaka et al., 2012; Sawada et al., 2012; Grace et al., 2018). Para ello, se dirigió la expresión de la ChR2 y del hMD3q en la microglía, por medio de un sistema dependiente de la recombinasa-Cre que se expresa en animales transgénicos en los que el gen de la recombinasa-Cre ha reemplazado al gen del receptor CX3CR1 (Lauro et al., 2010; Parkhurst et al., 2013). La estimulación específica de la microglía con las estrategias opto- y quimiogenéticas coinciden en que ambas estimulaciones incrementan la concentración intracelular de calcio y podrían inducir la activación microglial a través de diversos mecanismos (Lilienbaum e Israel, 2003; Nagamoto y Combs, 2010; Xu et al., 2016). Entre estos mecanismos de activación microglial, dependientes de

calcio, podemos encontrar la activación de la calcineurina (una fosfatasa activada por el complejo calcio/calmodulina) (Nagamoto y Combs, 2010) que, a su vez, activa al factor nuclear de células T activadas (NFAT por sus siglas en inglés) (Nagamoto y Combs, 2010). Se ha demostrado que la microglía expresa el NFAT c1 y c2 y que la activación de estos dos factores produce la activación proinflamatoria de estas células (Nagamoto y Combs, 2010). La estimulación con la ChR2 o el hMD3q puede activar también al NF- κ B, de manera dependiente de calcio, pues existen PKCs dependientes de calcio que activan a RAS (Lilienbaum e Israel, 2003), misma que activa una vía que recluta a Braf (Davies et al., 2002), MEK (Dérjard et al., 1995) y ERK1/2 (extracelular signal regulated kinase), lo que favorece la degradación de IKBs y permite la activación de NF- κ B (Lilienbaum e Israel, 2003). El incremento intracelular de calcio también puede inducir la activación de CREB (cAMP response element binding) por la acción de la CaMKII o de la CaMKIV (Lilienbaum e Israel, 2003). Esta activación produce un incremento en la liberación de IL-17 e IL-2, que son factores inflamatorios asociados a la activación tanto de macrófagos como de la microglía (Lilienbaum e Israel, 2003). La acción de las CaMK también podría inducir la activación de la microglía al estimular las vías de señalización dependientes de MAPK y JNK, que pueden activar al inflamosoma NLRP3 (Xu et al., 2016; Suetomi et al., 2018). Considerando lo anterior, es importante destacar que estas dos tecnologías de estimulación específica de la microglía inducen un estado proinflamatorio en estas células (Tanaka et al., 2012; Sawada et al., 2012; Grace et al., 2018), lo cual nos ha permitido en el presente trabajo investigar, cómo la activación proinflamatoria de la microglía modula la actividad del preBötC.

Eliminación de la microglía con clodronato liposomal

Una estrategia con la que se ha corroborado si la microglía participa en la modulación de la actividad del preBötC es la eliminación de estas células (Lorea-Hernández, 2015; Camacho-Hernández et al., 2018). En nuestro grupo de investigación se ha utilizado con anterioridad las microgliotoxinas leucina-metil-ester y al clodronato liposomal (LipClo) (Lorea-Hernández, 2015; Camacho-Hernández et al., 2018). El LipClo consiste micelas compuestas por numerosas capas concéntricas de fosfolípidos separadas por compartimentos acuosos que contienen el fármaco clodronato (Van Rooijen y Sanders, 1994). El clodronato es un bifosfonato comúnmente utilizado en el tratamiento de enfermedades osteolíticas (Fleisch, 1988). En sí mismo, el clodronato no es un compuesto tóxico cuando no se encuentra encapsulado (Van Rooijen y Sanders, 1994), pues es muy difícil que atraviese las membranas celulares y su vida media es extremadamente corta en los fluidos de un organismo (Van Rooijen y Sanders, 1994). Por su parte, los liposomas tampoco son tóxicos por sí mismos (Van Rooijen y Sanders, 1994), pero la eliminación de la microglía utilizando LipClo es resultado de la incorporación del fármaco al interior de la célula a través de la fagocitosis de los liposomas (Van Rooijen y Sanders, 1994). Después de ser fagocitados, los liposomas son degradados por enzimas lisosomales en el interior de fagolisosomas, lo que permite que el clodronato sea liberado (Van Rooijen y Sanders, 1994). Así, la degradación de los fagolisosomas deriva en la acumulación de clodronato en el interior de la microglía (Van Rooijen y Sanders, 1994). En el citoplasma, el clodronato es transformado por la acción de diversas aminoacil-ARNt sintetas de la clase II en adenosin-5'-[β - γ -diclorometil] trifosfato (AppCCI2p) que es un análogo no hidrolizable del ATP (Frith et al., 1997). El AppCCI2p bloquea el consumo mitocondrial de oxígeno a través de la inhibición de la ADP/ATP transferasa (Lehenkari et al., 2002), lo que produce el colapso del potencial de la membrana interna de la mitocondria, desencadenando vías de señalización que conducen a la muerte por apoptosis de la microglía (Frith et al., 1997; Lehenkari et al., 2002). El clodronato liposomal tiene un efecto específico sobre la microglía debido a la capacidad fagocítica, casi exclusiva, de este tipo celular (Van Rooijen y Sanders, 1994). Con base en lo anterior, hemos considerado esta estrategia como una herramienta muy útil para los propósitos y objetivos de este proyecto.

Posible influencia de la interleucina-1beta sobre la generación central de la respiración

Varios mediadores proinflamatorios modulan directamente la generación y control de la respiración (Johnson et al., 2018; Peña-Ortega, 2019). Entre los cuales la IL-1 β parece ser uno de los moduladores de la respiración más potentes (Johnson et al., 2018; Peña-Ortega, 2019). De hecho, se ha sugerido que la IL-1 β participa determinantemente en las alteraciones respiratorias que se observan durante un proceso infeccioso, las apneas de sueño y la muerte súbita del lactante (Lindgren y Grögaard, 1996; Vege et al., 1998; Guntheroth, 1989; Stoltenberg et al., 1994; Raza y Blackwell, 1999). Es altamente probable que la IL-1 β module la generación del ritmo respiratorio en el preBötC debido a que los receptores a IL-1 β I y II se expresan en varios circuitos del tallo cerebral que posiblemente incluyen al preBötC (Brady et al., 1994; Ericsson et al., 1995; Yabuuchi et al., 1994). Sin embargo, es importante tener en consideración que estos receptores a IL-1 β también se expresan en diferentes estructuras periféricas relacionadas con la respiración como el nervio vago (Ek et al., 1998; Goehler et al., 2005) y cuerpos carotídeos (Wang et al., 2002). La presencia de los receptores de IL-1 β en los circuitos relacionados con la respiración en el SNC se corresponde con evidencia funcional de células sensibles a la IL-1 β en estos mismos circuitos (Brady et al., 1994; Ericsson et al., 1995). Además, existen varios reportes sobre el efecto de la aplicación sistémica o local de la IL-1 β sobre la respiración. Se ha reportado en modelos murinos que la IL-1 β aumenta la frecuencia respiratoria (Graff y Gozal, 1999), así como la amplitud de la respiración (Hocker y Huxtable, 2018), mientras que, por otro lado, se han realizado estudios que reportan que la IL-1 β reduce la amplitud de la respiración y la ventilación global también en murinos (Olsson et al., 2003; Hofstetter y Herlenius, 2005; Hofstetter et al., 2007). El efecto inhibitorio de la IL-1 β sobre la respiración es más potente que el inducido por el LPS (Olsson et al., 2003; Frøen et al., 2000, 2002). En consecuencia, la IL-1 β prolonga las apneas producidas por estimulación laríngea (Stoltenberg et al., 1994; Frøen et al., 2000) y reduce los boqueos, así como la autoresuscitación y la supervivencia ante un desafío hipóxico (Olsson et al., 2003; Frøen et al., 2000, 2002). Además de los efectos inducidos por la aplicación periférica de IL-1 β , su la aplicación intracerebroventricular (ICV) aumenta la ventilación y la amplitud de la respiración, mientras que inhibe la respuesta respiratoria a la hipercapnia y a la hipoxia (Aleksandrova y Danilova, 2010; Aleksandrova et al., 2015; Aleksandrova et al., 2017). Finalmente, es relevante mencionar que existen diferentes trabajos que reportan el efecto de la aplicación *in vitro* de la IL-1 β sobre una preparación que contiene al tallo cerebral y a la médula espinal. Algunos de estos reportes indican que la aplicación de la IL-1 β no cambia la actividad rítmica registrada en esta preparación (Olsson et al., 2003), mientras que otros indican que la aplicación de la IL-1 β disminuye el ritmo respiratorio (Gresham et al., 2011). Dada la relevancia potencial de esta interleucina en la regulación de la generación y el control de la respiración, en esta tesis decidimos explorar su participación en los efectos producidos sobre la actividad del preBötC por de la modulación opto- y quimiogénica de la microglía, así como evaluar sus efectos directos a través de su aplicación exógena en rebanadas de tallo cerebral que contienen al preBötC.

Antecedentes y justificación

En décadas anteriores, numerosos trabajos exploraron la relación entre las alteraciones respiratorias que acompañan a diferentes patologías y la inflamación (Fanaroff et al., 1998; Prandota, 2004; Hofstetter y Herlenius, 2005; Hofstetter et al., 2007; Herlenius, 2011; Huxtable et al., 2011). Se descubrió que los mediadores inflamatorios liberados durante un proceso inflamatorio son capaces modular la generación de la actividad respiratoria (Olsson et al., 2003; Hofstetter y Herlenius, 2005; Gresham et al., 2011). Además, se demostró que los procesos inflamatorios sistémicos invariablemente resultan en un proceso activo de neuroinflamación a nivel del SNC que involucra la activación de la microglía (Henry et al., 2009; Liu et al., 2012; Elmore et al., 2014). Con base en lo anterior, nuestro grupo de investigación ha trabajado en caracterizar el efecto producido por el LPS sobre la generación de la actividad del preBötC y su respuesta a la hipoxia (Lorea-Hernández, 2015), así como la inducción de plasticidad en este circuito (Camacho-Hernández et al., 2018). Los resultados de estos trabajos previos nos han permitido proponer que la estimulación farmacológica de la microglía, en este caso con LPS, modula la actividad del preBötC

(Lorea-Hernández, 2015), el generador central de la actividad respiratoria (Horiuchi et al., 2017), así como de la plasticidad en este circuito (Camacho-Hernández et al., 2018). Sin embargo, como se mencionó previamente, aunque las herramientas farmacológicas han sido el principal abordaje experimental que permitió evidenciar la importancia que tiene la microglía dentro del SNC, estas herramientas a menudo presentan efectos inespecíficos que limitan las conclusiones derivadas de las observaciones realizadas en trabajos que las utilizan (Muecci et al., 2000; Husemann y Silverstein, 2001; Hatori et al., 2002; Lin et al., 2015; Shen et al., 2016).

Para eliminar la controversia generada por efectos inespecíficos de los fármacos moduladores de la microglía y para corroborar nuestras observaciones realizadas con herramientas farmacológicas, en el presente trabajo ampliamos el espectro de herramientas farmacológicas y utilizamos, adicionalmente, herramientas de estimulación microglial genéticamente dirigidas (Tanaka et al., 2012; Sawada et al., 2012; Grace et al., 2018; Pardo-Peña et al., 2018). También, iniciamos la exploración de los mediadores proinflamatorios involucrados en la regulación del preBötC por la microglía. Por ejemplo, evaluamos si la participación de la IL-1 β e iniciamos la caracterización de la liberación de otro mediador posible, el peróxido de hidrogeno. Lo anterior representa un avance en la comprensión de la participación de la microglía en las funciones normales del SNC, así como sus alteraciones en patologías que cursan con activación microglial, entre las que se incluyen alteraciones respiratorias asociadas al síndrome de muerte súbita del lactante (MacFarlane et al., 2016), la apnea obstructiva del sueño (Yang et al., 2013) y las deficiencias respiratorias asociadas a infecciones crónicas (Cenker et al., 2017). Adicionalmente, el presente trabajo profundiza en el uso de herramientas específicas para manipular a la microglía, teniendo así una perspectiva más concreta de la influencia de la microglía en el funcionamiento del SNC.

Hipótesis

Si la activación microglial produce un incremento en la liberación de factores que interfieren con la actividad respiratoria, entonces la estimulación farmacológica, la optogenética y la quimiogenética de la microglía, así como la adición de IL-1 β exógena reducirá la frecuencia o la amplitud de las ráfagas inspiratorias en el complejo pre Böttinger (preBötC).

Objetivos

Objetivo general

Ebaluar si la activación farmacológica, optogenética y quimiogenética de la microglía, así como la IL-1 β exógena, modulan la actividad del preBötC.

Objetivos particulares

- Evaluar si la activación farmacológica, optogenética y quimiogenética de la microglía, así como la adición de IL-1 β exógena reduce la frecuencia o la amplitud de la actividad del preBötC.
- Evaluar si la activación farmacológica, optogenética y quimiogenética de la microglía cambia su morfología, a través de la visualización de estas células con microscopia de fluorescencia.
- Identificar cuáles factores microgliales incrementan su liberación después de la estimulación específica de la microglía.

- Evaluar si la interleucina-1beta participa en los efectos de la activación optogenética y quimiogenética de la microglía en la frecuencia y/o la amplitud de la actividad del preBötC.
- Evaluar si la interleucina-1beta exógena modula la frecuencia y/o la amplitud de la actividad del preBötC.

Materiales y métodos

Animales

Los experimentos de activación farmacológica de la microglía se realizaron con ratones neonatos CD1 en edades dentro del rango de P5-P10. Para los experimentos de estimulación específica de la microglía se utilizaron animales con fondo genético C57BL/6 en edades dentro del rango de P5-P10. Para estos experimentos se generaron grupos de animales, por cruza específicas, de acuerdo con las características genéticas que se describen a continuación:

- Estimulación optogenética: ratones ChR2^{+/-}/YFP^{+/-}/CX3CR1^{+/-} (denominados ChR2+).
- Controles estimulación optogenética: ratones ChR2^{-/-}/YFP⁻/CX3CR1^{+/-} (denominados ChR2-).
- Estimulación quimiogenética: ratones hMD3q^{+/-}/CX3CR1^{+/-} (denominados hMD3q+).
- Controles estimulación quimiogenética: ratones hMD3q^{-/-}/CX3CR1^{+/-} (denominados hMD3q-).

Todos los procedimientos experimentales fueron realizados de acuerdo con los lineamientos aprobados por el comité de bioética 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 de tallo cerebral y registro de actividad de campo del preBötC

Para obtener las rebanadas de tallo cerebral que contienen al preBötC, los animales fueron decapitados y el cerebro fue removido del cráneo. El tallo cerebral fue disecado y colocado en líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) que contiene (en mM): 119 NaCl; 3 KCl; 1.5 CaCl₂; 1 MgSO₄; 25 NaHCO₃; 30 D-Glucosa. Previamente, el pH del LCRA fue ajustado a 7.4 y mantenido constante durante todo el procedimiento, por gaseo con carbógeno (mezcla de O₂ 95% y CO₂ 5%). Se utilizó un vibratomo Leica VT1000S para realizar cortes de grosor variable del tallo cerebral en sentido rostro-caudal hasta observar la apertura del 4° ventrículo. Tomando lo anterior como referencia, se realizó un corte con un grosor base de 470 μm (a los que se les sumaron 10 μm por cada día de edad postnatal del animal). Finalmente, se obtuvo una rebanada de 700 μm de grosor que incluía el preBötC (Figura 1).

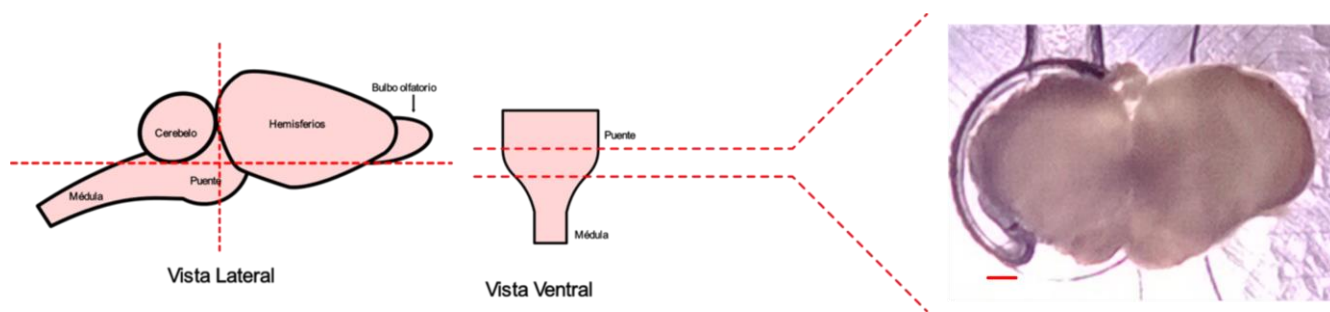


Figura 1. Esquema del procedimiento de obtención de la rebanada de tallo cerebral que contiene al preBötC. En el panel de la derecha se muestra una representación del encéfalo completo de un ratón neonato en una vista lateral. Con líneas punteadas rojas se muestran los cortes que se realizan para aislar el tallo cerebral del resto del encéfalo. En medio, se muestra una representación del tallo cerebral, desde una vista ventral y se indica la posición aproximada de la rebanada de 700 µm que contiene al preBötC. En el panel de la izquierda se muestra una fotografía representativa de una rebanada obtenida con este procedimiento. Se representan 0.5 mm con la barra de escala roja.

Posteriormente, la rebanada fue colocada en una cámara de registro (de 2-4 ml) y se mantuvo en perfusión constante con un volumen total de 30-40 ml de LCRA que se gaseó constantemente durante el registro y se mantuvo a una temperatura de 30-32 °C (Peña et al., 2004; Zavala-Tecuapetla et al., 2008). Para mantener estable la generación del ritmo respiratorio, antes de cualquier otra manipulación experimental, la concentración extracelular de KCl en el baño de registro se elevó paulatinamente de 3 a 8 mM (Tryba et al., 2003). Para registrar la actividad generada por el preBötC, se colocó un electrodo de succión sobre una de las porciones ventrolaterales en la superficie de la rebanada (Figura 2), donde se localizaba uno de los preBötC y se registró la actividad rítmica espontánea característica de este circuito (Johnson et al., 2001).

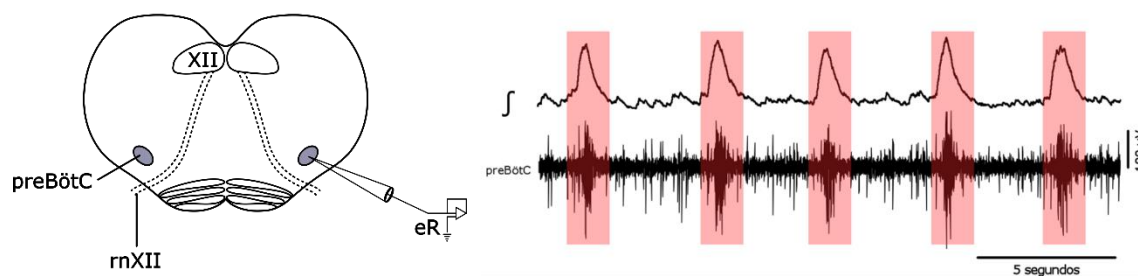


Figura 2. Posicionamiento del electrodo de registro y trazo de la actividad generada por el complejo pre-Bötzinger (preBötC). En el panel de la izquierda se muestra una representación de la posición de los preBötC dentro de la rebanada de tallo cerebral; su ubicación es resaltada con óvalos grises a cada lado de la porción ventral de la rebanada. Sobre uno de los preBötCs se coloca un electrodo de registro (eR). En el esquema se muestran, además, otras regiones dentro de la rebanada donde es posible también registrar actividad rítmica acoplada a la actividad generada por el preBötC, como el núcleo del nervio hipogloso (XII) y la raíz del nervio hipogloso (rnXII). Del lado derecho se muestran trazos representativos de la actividad rítmica generada por el preBötC, el trazo superior corresponde a la señal rectificadas e integrada y el trazo inferior corresponde a la actividad cruda registrada en el preBötC. Se resaltan con rojo 5 periodos en los que se generaron ráfagas de actividad respiratoria en el registro.

La señal fue amplificada (x 10000 veces) y filtrada (pasa bajas 0.25 KHz, pasa altas 5 Hz) utilizando un amplificador de banda ancha de AC (Grass Instruments, Quincy, MA). La señal también fue rectificadas e integrada (con una constante de tiempo de 30-50 ms) usando un filtro electrónico diseñado por JFI electronics de la Universidad de Chicago (Peña y Ramírez, 2004; Rivera-Angulo y Peña-Ortega, 2014). La señal fue almacenada en una computadora personal para su posterior procesamiento y análisis.

Activación farmacológica de la microglía

Después de 60 minutos de registrar la actividad del preBötC bajo condiciones basales, los diferentes activadores microgliales fueron aplicados directamente en el baño de registro. Las concentraciones finales para cada activador fueron las siguientes: lipopolisacárido (LPS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 200 ng/ml, ácido desoxirribonucleico fragmentado (ADNf; donación Dr. Alfredo Varela; INB-UNAM) 20 ng/ml, fractalquina (CX3CL1, Biolegend, San Diego, CA) 1 µg/ml, leukadherina 1 (LK1, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 10 µM. Una vez agregado alguno de los activadores microgliales se registró la actividad del preBötC durante 120 minutos en presencia constante del fármaco. El minuto final de este periodo de 2 horas en presencia del fármaco se utilizó para referenciar el efecto estable producido sobre las ráfagas inspiratorias.

Efecto de la interleucina-1beta exógena sobre la actividad del preBötC

Después de establecida la condición basal en registros de rebanadas de tallo cerebral de ratones CD1, se agregaron diferentes concentraciones de IL-1β (American Research Products, Waltham, MA), 1, 10 y 20 ng/mL. El efecto de cada concentración de IL-1β se registró durante 30 minutos, el último minuto de registro, en cada concentración, y en la basal, se utilizó para referenciar una condición estable y seleccionar las ráfagas inspiratorias que se incluyeron en la cuantificación de amplitud y frecuencia. En una serie independiente de experimentos, después de que se estableciera el registro de la condición basal, se agregó IL1Ra en una concentración de 200 ng/mL (Prospec, East Brunswick, NJ). El efecto del fármaco se registró durante una hora y, como se describió antes, las ráfagas utilizadas en las cuantificaciones se seleccionaron utilizando como referencia el último minuto de registro en cada condición (basal e IL1Ra). Por último, se realizaron experimentos en donde después de establecida la condición basal, se agregó IL1Ra (200 ng/mL) y se permitió el establecimiento del efecto del fármaco. Posteriormente, sin interrumpir la presencia del IL1Ra, se agregaron las distintas concentraciones de IL-1β, (1, 10 y 20 ng/mL). Para cada concentración de la IL-1β el efecto se registró durante 30 minutos.

Activación optogenética de la microglía

Se indujo la expresión específica en la microglía de la canalrhodopsina 2 (ChR2) a través de la cruce de dos cepas de ratones transgénicos (Akins et al., 2017; Baertsch et al., 2019). Por un lado, una cepa homocigota portadora de la recombinasa CRE expresada constitutivamente bajo el control del promotor del gen CX3CR1 (CX3CR1/CRE) (Yona et al., 2013). Como ya se mencionó, el gen que codifica para el receptor de la quimiocina fractalquina, el CX3CR1, se encuentra expresado de forma específica en la microglía dentro del SNC (Parkhurst et al., 2013). El animal descrito se cruzó con otra cepa portadora de un constructo formado por la secuencia de la ChR2 y la secuencia de la proteína amarilla fluorescente (YFP, por sus siglas en inglés), como proteína reportera de la expresión genética (Yona et al., 2013). Este constructo se encuentra flanqueado por secuencias loxP, susceptibles de recombinación (Yona et al., 2013). Como resultado de la cruce ambas cepas, se obtuvieron ratones con una expresión constitutiva de la ChR2 y de la YFP restringida a las células microgliales dentro del SNC (Parkhurst et al., 2013). De estos ratones se obtuvieron rebanadas de tallo cerebral y se registró la actividad del preBötC llevando a cabo los procedimientos descritos previamente. Después de registrar durante 60 minutos la actividad generada por el preBötC bajo condiciones basales, la rebanada se expuso de manera continua durante 20 minutos a la luz de un led ultrabrillante de color azul (longitud de onda de 470 nm, aproximadamente), para inducir la estimulación optogenética de la microglía. Después de la estimulación, se permitió durante 60 minutos la estabilización de la actividad. La señal registrada durante el último minuto de esta hora se utilizó para referenciar el efecto estable producido por la activación optogenética de la microglía sobre la actividad del preBötC.

Activación quimiogénica de la microglía

Se obtuvieron ratones con una expresión constitutiva del DREADD activador (hMD3q) restringida a las células microgliales usando la misma estrategia de entrecruzamiento de cepas transgénicas que se usó para los ratones utilizados en la activación optogénica (Akins et al., 2017; Baertsch et al., 2019). En esta ocasión los ratones CX3CR1/CRE (Yona et al., 2013), se cruzaron con ratones portadores de la secuencia del gen hMD3q flanqueada por secuencias loxP, susceptibles de recombinación (Yona et al., 2013). La obtención de las rebanadas y el registro de actividad de campo se realizaron siguiendo los procedimientos descritos previamente. Para la estimulación quimiogénica de la microglía en las rebanadas de tallo cerebral, después de registrar 60 minutos de actividad basal, se agregó clozapina N óxido (CNO, 5 μ M) al baño de registro. El efecto producido por la estimulación quimiogénica de la microglía se registró durante 60 minutos y el efecto estable se referenció con la actividad registrada durante el último minuto de estas dos horas.

Inmunodetección de la microglía en rebanadas de tallo cerebral

La morfología de la microglía fue evaluada por la técnica de inmunodetección de Iba1 (Lorea-Hernandez, 2015). Para el procesamiento del tejido, las rebanadas de tallo cerebral fueron incluidas en paraformaldehído (PFA) al 4% con un pH de 7.4 durante un periodo de 24-48 horas. Posteriormente, el PFA se reemplazó durante 3 días consecutivos con solución de sacarosa/PBS con una concentración ascendente (10, 20 y 30%). Durante este proceso el tejido se almacenó a 4°C para su preservación. Al término de este periodo se obtuvieron cortes de 30 μ m de grosor utilizando un criostato Leica CM1850 (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany). Para el procesamiento inmunohistoquímico de los cortes, se redujo el reconocimiento inespecífico de antígenos en el tejido utilizando suero de burro diluido en una solución de Triton X-100 a una concentración de 0.3%, durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las rebanadas fueron incubadas a 4°C durante toda la noche con un anticuerpo primario generado en conejo contra Iba1 (del inglés: ionizing calcium binding adapter molecule 1; Wako Chemicals, Richmond, VA), con una dilución 1:2000. Después de la incubación con el anticuerpo primario, las rebanadas fueron lavadas 3 veces con PBS durante 15 minutos en cada ocasión. Después de los lavados, las rebanadas fueron incubadas por un período de 2 a 3 horas con un anticuerpo secundario (conjugado con Alexa568; Wako Chemicals, Richmond, VA) a temperatura ambiente. Después de este periodo de incubación, el tejido se lavó nuevamente en 3 ocasiones con PBS durante 15 minutos. Posteriormente, los cortes fueron montados sobre portaobjetos de cristal y embebidos en Vectashield (Vector Laboratories). Finalmente, se colocaron cubreobjetos de cristal sobre los cortes embebidos para la preservación de la fluorescencia. Las microfotografías de fluorescencia fueron obtenidas utilizando un microscopio Axio Imager 2 (ZEISS) al que se acopló una cámara AxioCam 305 (ZEISS). Las tomas y el preprocesamiento de las micrografías se realizaron con el programa ZEN 2.3 (blue edition, ZEISS).

Caracterización morfológica de la activación microglial

Para el procesamiento de las imágenes se utilizó el programa "Fiji", una variante del programa ImageJ 1.52i. En este programa, las micrografías obtenidas con microscopía de fluorescencia se convirtieron a imágenes con un formato de 8 bits en escala de grises (Figura 3A). Utilizando estas imágenes, se generaron máscaras binarias con el umbral de selección maxEntropy de Fiji para aislar y resaltar las células microgliales. Se calibraron las mediciones utilizando la barra de escala que incorpora a las micrografías el programa ZEN 2.3 al momento de la captura. Después de seleccionar a las células microgliales, se realizaron las mediciones morfológicas utilizando la función "measure" en la sección "Analyze" de Fiji, seleccionando como resultado de salida lo siguiente: área (μm^2), perímetro (μ), circularidad ($4\pi \cdot \text{área} / \text{perímetro}^2$), relación dimensional (eje mayor/eje menor), redondez ($4\pi \cdot (\text{área} / \pi \cdot \text{eje mayor}^2)$) y densidad ($\text{área} / \text{área convexa}$). Todo lo anterior, son mediciones que

se pueden obtener fácilmente con el programa Fiji además de ser muy relevantes para determinar diferencias morfológicas entre distintos estados de la microglía (Fernandez-Arjona et al., 2018).

Las células microgliales incluidas fueron seleccionadas con los siguientes criterios (Figura 3):

- Células individuales fácilmente identificables. Si en la binarización un par o más de células se funden en una sola marca continua, todas estas células se excluyeron para las mediciones.
- Células completas dentro de la micrografía, las células mostradas incompletas en la toma de la micrografía fueron excluidas.

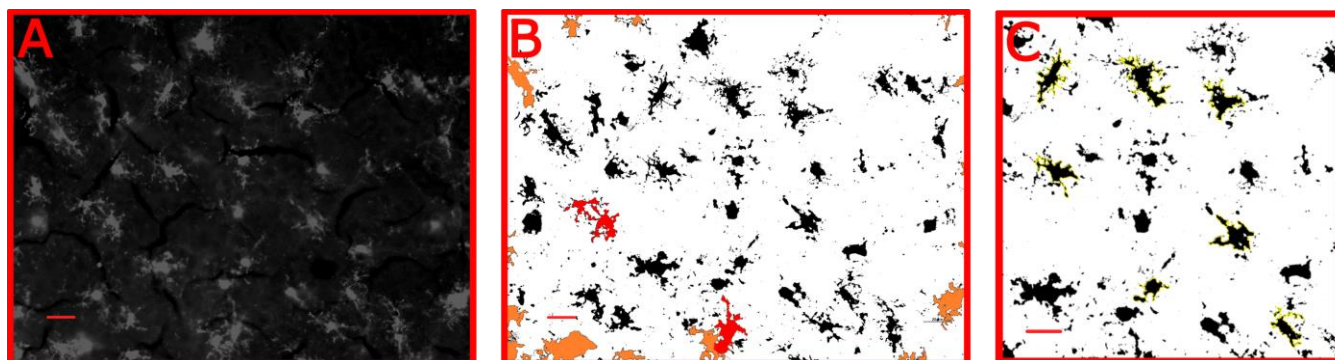


Figura 3. Procesamiento de las imágenes para realizar la caracterización morfológica de la microglial. En A se muestra una micrografía representativa de la microglía visualizada con microscopía de fluorescencia y marcada con inmunofluorescencia detectando Iba1. Las imágenes fueron convertidas a escala de grises para generar imágenes binarias (únicamente blanco y negro). En B se muestra la imagen binaria generada a partir de A. Se señalan ejemplos de células excluidas para la cuantificación de área (células anaranjadas y rojas). Las formas naranjas identifican células incompletas en la micrografía. Las formas rojas identifican células cuya marca se fusiona por la binarización. En C se muestra una imagen representativa de la selección de células microgliales para las mediciones morfométricas. La escala corresponde a 20 μ m en cada panel.

Es de resaltarse que en las mediciones se considera la totalidad de la marca correspondiente a cada célula microglial y que no se hará distinción entre sus diferentes partes (soma, procesos, filopodios: figura 14 y 15).

Cuantificación de las células microgliales

Se utilizaron dos canales distintos durante la adquisición de las micrografías utilizadas para la cuantificación celular: un canal para visualizar el Alexa568 empleado en la inmunodetección de Iba1 (Figura 4A) y otro canal para detectar la señal de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol; Figura 4B), un marcador fluorescente que permite visualizar los núcleos presentes en el tejido (Kapuscinski, 1995). Durante el procesamiento de las imágenes no se modificó ni el color ni el formato de las micrografías obtenidas, solo se les realizó el ajuste automático de contraste y brillo con el programa Fiji. La imagen resultante del empalme de los dos canales (Figura 4C) se utilizó para identificar los núcleos de las células microgliales presentes en el área correspondiente a cada toma en las micrografías (775 x 454 μ m, objetivo 10X; Figura 4D). Una vez identificados los núcleos de la microglía presente en cada micrografía se utilizó la herramienta "Multi-point" de Fiji para realizar el conteo manual de las regiones de interés. Las células que no aparecieron completas dentro de la toma fueron excluidas para la cuantificación (Figura 4D).

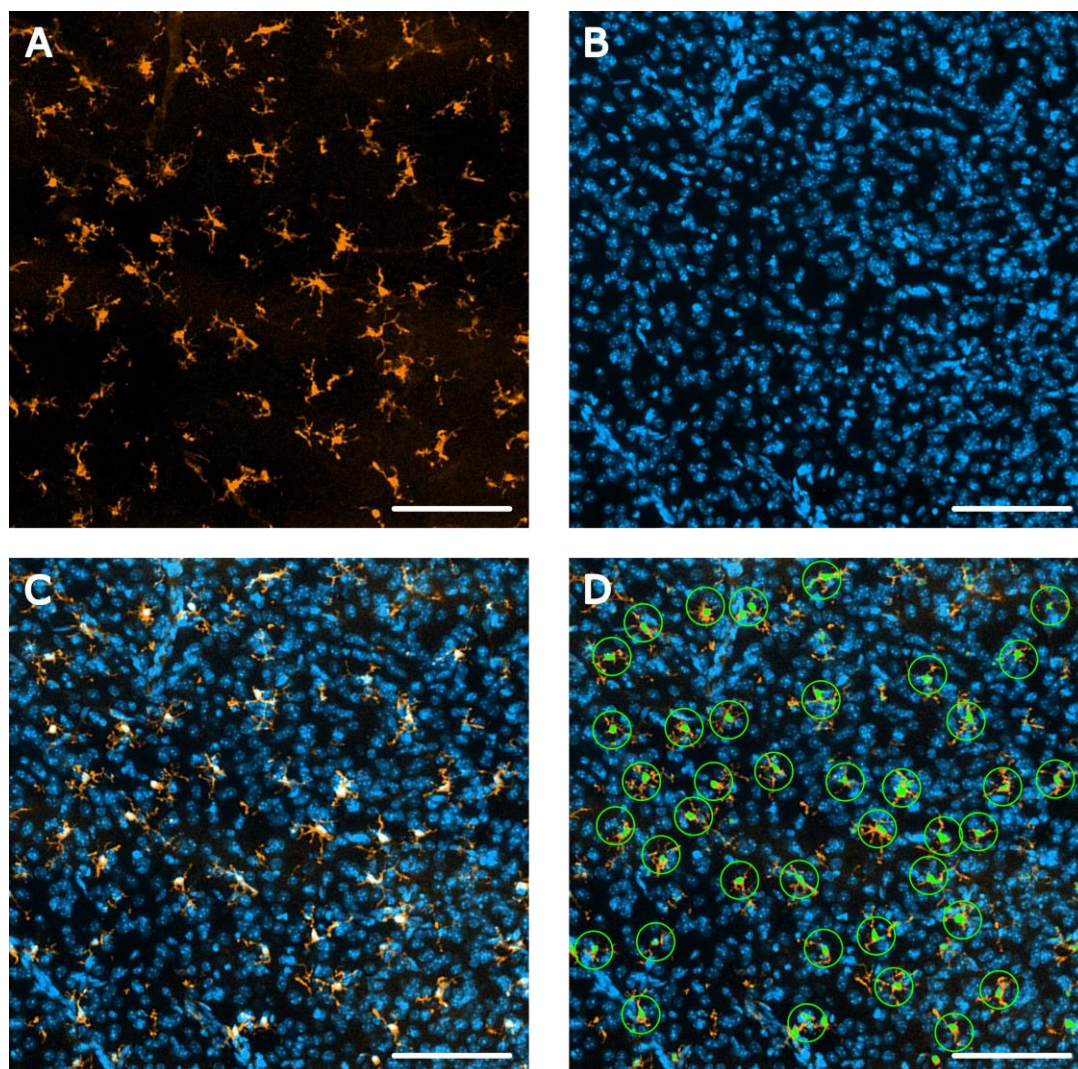


Figura 4. Identificación y cuantificación de las células microgliales. A-B, se muestran las imágenes representativas de las micrografías de un corte de tallo cerebral (porción ventral lateral) en el que se realizó la inmunodetección de la proteína Iba1 con un anticuerpo acoplado al fluoróforo Alexa568 (naranja; A) y el marcaje de los núcleos celulares con DAPI (Azul; B). C, se muestra el empalme de las micrografías A y B. El color blanco resulta de las regiones donde la fluorescencia de ambas señales coincide, lo que facilita la identificación de células microgliales individuales por la ubicación de su núcleo. D, se muestra con círculos verdes la selección de las células incluidas para el análisis (39 células para esta micrografía). Las regiones blancas mostradas en C se resaltaron también en verde para facilitar la identificación de los núcleos en esta representación, de esta forma se pueden distinguir también células presentes en la imagen que no serían consideradas para el conteo (sin círculo verde). Lo anterior es solo ilustrativo, pues el conteo se realizó con imágenes como la mostrada en C. La barra de escala mostrada en cada panel corresponde a 100 μ m.

Depleción de la microglía con clodronato liposomal (LipClo)

Para la elaboración de los liposomas (Van Rooijen y Sanders, 1994), se preparó una solución de fosfatidilcolina disuelta en cloroformo a una concentración de 100 mg/mL. Adicionalmente, se preparó una segunda solución de 8 mg de colesterol disuelto en 10 mL de cloroformo. Se tomaron 0.86 mL de la primera solución y este volumen se agregó en el total del volumen de la segunda solución. La mezcla fue vertida en un envase de fondo redondo y se utilizó un rotoevaporador r-100 (Büchi) acoplado a una bomba de vacío v-100 (Büchi) para separar el cloroformo de los lípidos. Para la separación se utilizaron 200 mbar de presión y una velocidad de 150 rpm en la configuración del rotoevaporador. Estas condiciones se mantuvieron hasta la completa desecación de la fase lipídica de la mezcla. Se agregaron 10 mL de una solución acuosa de clodronato (sal disódica de ácido dichlorometilenedifosfónico, SIGMA) con una concentración de 0.07 M en el recipiente que contenía la fase

lipídica que fue separada del cloroformo. La solución de clodronato y la fase lipídica se mezclaron bajo condiciones de temperatura y presión ambientales, en el rotoevaporador, utilizando una velocidad de rotación de 80 rpm hasta conseguir una solución lechosa homogénea. Esta solución fue gaseada con nitrógeno durante 2 horas para reducir la concentración de oxígeno en el medio y evitar así la degradación de los lípidos en la solución por oxidación. Para eliminar el clodronato que no fue encapsulado en los liposomas, la solución se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos. Se retiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en PBS estéril. Esta solución se centrifugó a 15000 rpm por 30 minutos. Terminado el periodo de centrifugación, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en PBS estéril. Este procedimiento de lavado se repitió 3 veces. Para eliminar a la microglía en las rebanadas usadas en los registros de actividad de campo, se agregaron 500 μL del stock de LipClo al baño de registro (concentración final aproximada de 750 nM) durante 60 minutos. La presencia del LipClo se mantuvo durante el resto del registro. La eliminación de la microglía se corroboró, posteriormente, por inmunohistoquímica y microscopía de fluorescencia.

Microscopía electrónica y tinción negativa

La formación de los liposomas se confirmó con microscopía electrónica y tinción negativa con ácido fosfotúngstico (Alarcón et al., 1984). Esta técnica requiere un procesamiento mínimo de la muestra y permite un análisis ultraestructural rápido (Alarcón et al., 1984). Para ello, se incluyó la muestra en ácido fosfotúngstico al 2%. Posteriormente, la muestra se fijó sobre una gradilla cubierta para formar una membrana plástica y se permitió su desecación. Para la observación de la muestra se utilizó microscopía electrónica de transmisión y se pudieron apreciar detalles ultraestructurales de la muestra sobre un fondo negro (Figura 5). Las microfotografías se tomaron con un microscopio electrónico de marca EOL modelo JEM-1010 operado a un voltaje de 80 kv y acoplado a una cámara ORIUS con una resolución de 0.25 nm.

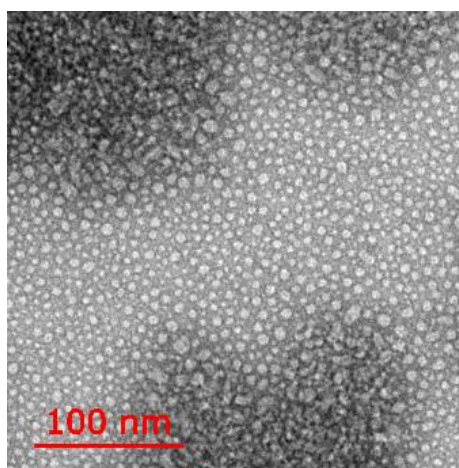


Figura 5. Micrografía representativa de liposomas tomada con microscopía electrónica de transmisión. En la imagen se aprecian numerosas partículas redondas de color claro. Estas partículas corresponden a los liposomas. También se aprecia que los liposomas pueden presentar varios tamaños, pero que son muy homogéneos en su forma esférica.

Cuantificación de la liberación de especies reactivas de oxígeno con el sistema EROS

Para cuantificar la liberación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), mismo que puede ser liberado por la microglía (Bessis et al., 2007), se utilizó el sistema EROS (siglas en inglés para enzymatic reactor online sensing) que fue desarrollado por Pardo-Peña

y colaboradores en el 2018. Este sistema de detección en línea, con resolución temporal de 1 segundo, utiliza un reactor enzimático compuesto por peroxidasa de rábano (0.2U/ml, Sigma-Aldrich) y el reactivo Amplex ultraRed (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine, 5mM, Thermo Fisher Scientific). Este reactor es aplicado al sistema de detección con la ayuda de una bomba automática (Fusion 200, Chemyx). En este sistema el reactor se mezcla con medio extracelular colectado en la proximidad (50 μ m de distancia) de uno de los preBötC en la rebanada de tallo cerebral. La recolección del medio extracelular se llevó a cabo con una micro-cánula conectada a otra bomba automática (Fusion 200, Chemyx). A través del sistema descrito, el H₂O₂ contenido en el medio extracelular colectado reacciona con la peroxidasa (Pardo-Peña et al., 2018). Esta reacción permite la oxidación del Amplex ultraRed, produciendo un compuesto fluorescente llamado resorufina (Pardo-Peña et al., 2018). La mezcla que contiene a la resorufina se hace pasar por un capilar en el que incide un láser con potencia de 5 mW y longitud de onda de 590 nm para excitar al fluoróforo. La fluorescencia es captada por un fotomultiplicador y cuantificada como unidades arbitrarias de fluorescencia en el software de registro diseñado específicamente para este sistema (Pardo-Peña et al., 2018). Para cada set de estos experimentos se registró una curva de calibración con 5 concentraciones conocidas de H₂O₂. Posteriormente, se realizó una regresión lineal para establecer la relación entre las unidades arbitrarias de fluorescencia con la concentración de H₂O₂ (Pardo-Peña et al., 2018).

Análisis de resultados

Para el procesamiento y análisis de los registros se utilizó el programa Clampfit versión 9.2.0.09 de Axon instruments. Se utilizó la herramienta de detección de eventos para seleccionar 100 ráfagas inspiratorias dentro de cada condición experimental estable (a partir del último minuto del registro para cada condición experimental). De estas ráfagas, se cuantificó la amplitud y la frecuencia. Los valores resultantes se vaciaron en una hoja de cálculo de Excel para su procesamiento. Para cada experimento, la amplitud y la frecuencia se normalizaron con respecto a la condición basal, misma que se consideró como 100 %. Las gráficas mostradas en los resultados representan el promedio de los valores normalizados de amplitud y frecuencia, para cada grupo experimental. Las pruebas estadísticas se realizaron con el programa GraphPad Prism5. Se determinó la existencia de diferencias significativas entre los grupos con la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de U de Mann-Whitney para comparar grupos independientes y la prueba de Wilcoxon para comparar cualquier señal contra su propia condición basal. Se consideró como diferencia estadísticamente significativa aquella comparación que resultara con un valor de $p < 0.05$.

Resultados

Para determinar si la activación de la microglía modula la actividad del preBötC, la primera aproximación experimental utilizada en el proyecto fue la estimulación farmacológica de estas células utilizando diferentes activadores microgliales (Peña-Ortega, 2017). Para ello, se registró la actividad rítmica generada por el preBötC en rebanadas de tallo cerebral de ratones neonatos de la cepa CD1. En estos experimentos, después de registrar las ráfagas inspiratorias durante 60 minutos bajo condiciones basales se agregó uno de los siguientes activadores microgliales (Peña-Ortega, 2017): el LPS, la CX3CL1, el ADNf y la LK1. Una vez agregado alguno de los activadores, se registró la actividad del preBötC en presencia del fármaco durante 120 minutos. Después de este periodo todas estas sustancias redujeron de forma significativa la amplitud de las ráfagas inspiratorias con respecto a la amplitud observada bajo condiciones basales (LPS a 80.33 ± 3.69 % del basal, CX3CL1 a 74.64 ± 19.03 % del basal, ADNf a 75.29 ± 6.1 % del basal, LK1 a 42.55 ± 10.97 % del basal, $p < 0.05$ en la prueba de Wilcoxon). Por el contrario, casi todos los activadores microgliales, con excepción de la LK1, no produjeron un efecto significativo ($p > 0.05$ en la prueba de Wilcoxon) sobre la frecuencia de las ráfagas inspiratorias (figura 6). El único activador microglial que incrementó la frecuencia del ritmo respiratorio, la LK1, lo hizo a 215.40 ± 49.98 % del basal ($p < 0.05$).

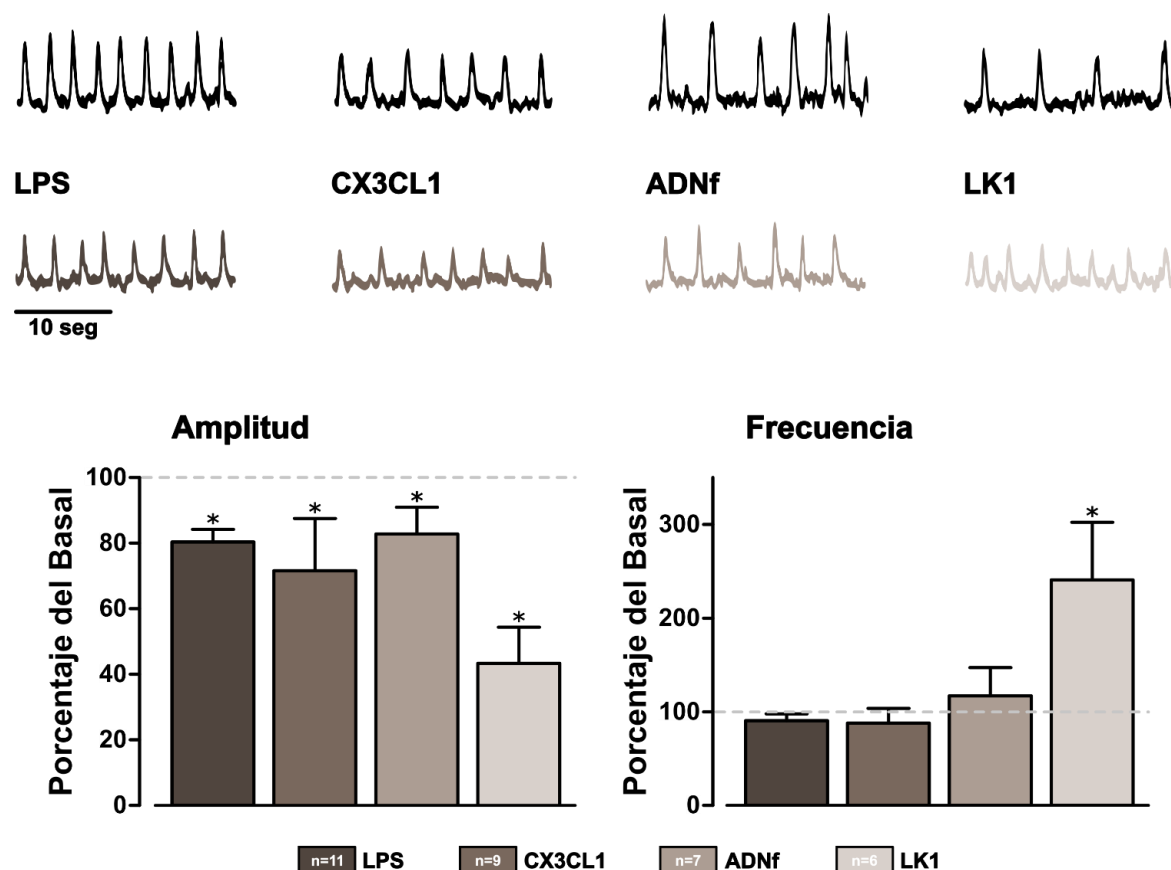


Figura 6. Efecto de diferentes activadores microgliales sobre la amplitud y la frecuencia de las ráfagas inspiratorias generadas por el preBötC. Para cada grupo, se muestran en la parte superior los trazos representativos de la actividad rítmica registrada en el preBötC: en negro se muestra la actividad bajo condiciones control. En escala de grises, se muestra la actividad del preBötC 120 minutos después de la presencia continua de los diferentes activadores microgliales. En la parte inferior se muestra la cuantificación de la amplitud y la frecuencia normalizadas (como % del basal). Las gráficas representan la media y el error estándar para cada grupo y mantienen el mismo código de grises que los registros. El asterisco denota una diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto a su propia condición basal (línea punteada).

Uno de los factores proinflamatorios que se libera con mayor abundancia después de la activación microglial es la IL-1 β (Olsson et al., 2003; Hofstetter y Herlenius, 2005; Gresham et al., 2011) que, además, es un potente regulador de la actividad respiratoria (Olsson et al., 2003; Hofstetter y Herlenius, 2005; Gresham et al., 2011). Por ello, en un grupo de experimentos se determinó si esta citocina podría modular la generación del ritmo respiratorio agregando IL-1 β exógena en rebanadas de tallo cerebral de animales CD1 en las que se registró la actividad del preBötC (Figura 7).

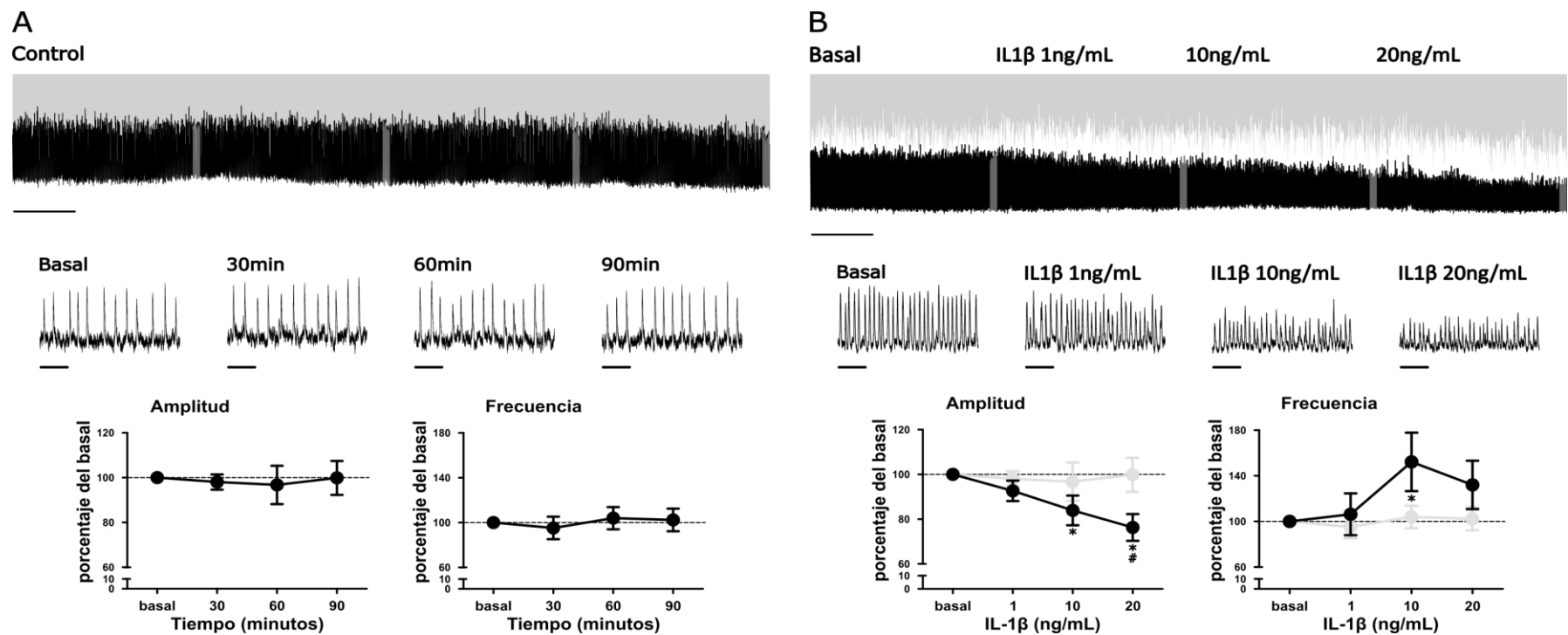


Figura 7. Efecto de la aplicación exógena de diferentes concentraciones de interleucina-1beta (IL1β) sobre la actividad generada por el preBötC. En A, se muestra un trazo representativo de la actividad generada por el preBötC en condiciones control por 2 Hrs. En gris claro se muestra una imagen complementaria del borde superior del trazo; esta imagen será sobrepuesta en los trazos representativos de otros grupos experimentales, a manera de referencia. En la parte central del panel se muestra la amplificación de los segmentos señalados en gris oscuro sobre el trazo condensado, que corresponden a las ráfagas registradas en el preBötC una vez alcanzada una condición basal estable, así como ráfagas correspondientes a periodos de 30, 60 y 90 minutos después del primer segmento. En la parte inferior se muestran, como porcentaje del basal, las cuantificaciones de la amplitud y la frecuencia de las ráfagas observadas en cada uno de los periodos mencionados. Note que la amplitud y la frecuencia de las ráfagas generadas por el preBötC permanecen sin cambios durante todo el tiempo de registro control. En B, se muestra, en la parte superior, un trazo representativo de la actividad generada por el preBötC antes (basal) y durante la presencia de IL1β en concentraciones de 1, 10 y 20 ng/mL. En gris claro se incluye la imagen complementaria del trazo presentado en A. Note que la amplitud de las ráfagas inspiratorias disminuyó de manera dependiente de la concentración de IL1β. En la parte media del panel se muestra la amplificación de los segmentos señalados en gris sobre el trazo condensado, correspondientes a la condición basal y a la actividad registrada 30 minutos después de agregada cada concentración de IL1β. En la parte inferior se muestran las cuantificaciones de la amplitud y la frecuencia normalizadas de las ráfagas respiratorias en cada uno de los periodos mencionados. El asterisco denota una diferencia significativa con respecto a la condición basal ($p < 0.05$, Wilcoxon) mientras que el numeral denota una diferencia significativa con respecto al grupo control ($p < 0.05$, U de Mann-Whitney). La escala presentada en los trazos condensados corresponde a 10 minutos, mientras que en las amplificaciones la escala corresponde a 10 segundos.

Una vez que se demostró que las rebanadas control, que no recibieron tratamiento alguno, mantienen estables la amplitud y la frecuencia de las ráfagas inspiratorias generadas por el preBötC durante 180 min (99.89 ± 7.57 % del basal y 102.40 ± 10.12 % del basal, respectivamente; $p > 0.05$, Wilcoxon; $n = 10$; Figura 7A), se procedió a aplicar IL-1β exógena en concentraciones ascendentes ($n = 8$, Figura 7B). En estas condiciones, se observó que la amplitud de las ráfagas inspiratorias del preBötC se reduce de manera dependiente de la concentración del fármaco. Aunque con la concentración de 1 ng/mL de IL-1β no se observaron cambios con respecto a la amplitud basal (92.66 ± 4.58 % del basal; $p > 0.05$, Wilcoxon), con la concentración de 10 ng/mL de IL-1β se redujo la amplitud a 83.91 ± 6.61 % del basal ($p = 0.039$, Wilcoxon) mientras que, con 20 ng/mL se redujo la amplitud a 76.31 ± 5.99 % del basal. A diferencia de la reducción de la amplitud de las ráfagas inspiratorias producida por la IL-1β, la frecuencia del ritmo respiratorio fue afectada marginalmente a la concentración de 10 ng/mL de IL-1β, con la que la frecuencia del ritmo respiratorio alcanzó un valor de 152.3 ± 25.6 % del basal ($p = 0.039$, Wilcoxon). Sin embargo, en presencia de IL-1β a las concentraciones de 1 ng/mL y 20 ng/mL la frecuencia del ritmo respiratorio no cambió significativamente (106.30 ± 18.32 y 132.1 ± 21.2 % del basal, respectivamente, $p = 0.125$, Wilcoxon).

Para evaluar la especificidad del efecto de la IL-1 β sobre la amplitud del ritmo respiratorio, así como para evaluar la existencia de un tono basal de modulación del preBötC por la interleucina, se utilizó al antagonista endógeno de los receptores de IL-1 β , el IL1Ra (Hannum et al., 1990; Miller et al., 1991; Evans et al., 1995; Patel et al., 2019). De esta manera, se diseñaron dos series independientes de experimentos en los que se probó 1) si la aplicación de IL1Ra exógeno era capaz de regular la actividad basal del preBötC y 2) si el tratamiento con IL1Ra exógeno antes de la adición de la IL-1 β evita la reducción en la amplitud de las ráfagas inspiratorias generadas por el preBötC (Figura 8).

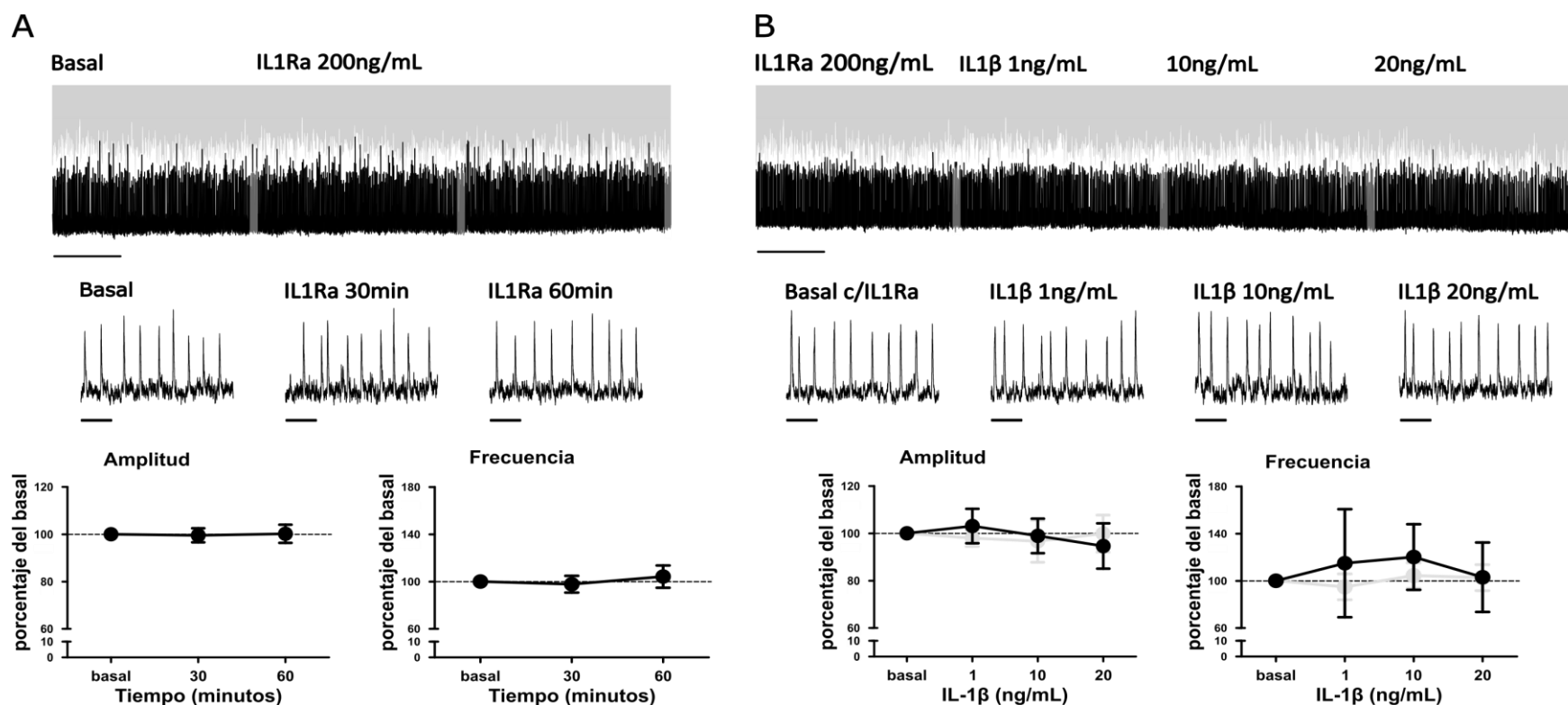


Figura 8. La aplicación del antagonista endógeno de los receptores de interleucina-1beta (IL1Ra) no afecta la actividad generada por el preBötC per se, pero evita los efectos de la interleucina-1beta (IL-1 β). A, se muestran en la parte superior el trazo condensado de un registro representativo en el que, después de presentarse una condición basal estable, se aplicó IL1Ra en una concentración de 200 ng/mL. Se muestra, además en gris claro, un segmento correspondiente a la imagen complementaria del trazo control mostrado en la figura 6. Al centro del panel se muestra la amplificación de los segmentos resaltados en gris en el trazo condensado, los cuales corresponden a la condición basal y al efecto producido por el IL1Ra 30 y 60 minutos después de su adición al baño de registro. En la parte inferior se muestran las cuantificaciones normalizadas de la amplitud y la frecuencia de las ráfagas del preBötC en cada condición del experimento. Note que el IL1Ra no produce efecto alguno sobre la amplitud o la frecuencia de las ráfagas inspiratorias. B, en la parte superior se muestra el trazo condensado de un registro representativo en el que se agregó la IL1 β en diferentes concentraciones y en presencia de IL1Ra. Se muestra, además, la imagen complementaria del control mostrada en la figura 7A. Al centro, se muestran las amplificaciones de los segmentos resaltados en gris en el trazo condensado, los cuales corresponden a la condición basal (en presencia de IL1Ra) y las diferentes concentraciones de IL1 β (1, 10 y 20 ng/mL). En la parte inferior se presentan las cuantificaciones normalizadas de la amplitud y la frecuencia de las ráfagas inspiratorias para cada condición de los experimentos y, a manera de comparación, se muestra en gris claro la cuantificación del grupo control, para ambas variables. En presencia del IL1Ra, la IL1 β no produjo cambios significativos ($p > 0.05$) sobre la amplitud o la frecuencia de las ráfagas inspiratorias. La escala presentada en los trazos condensados corresponde a 10 minutos, mientras que en las amplificaciones la escala corresponde a 10 segundos.

Por sí misma, la aplicación del IL1Ra exógeno (200 ng/mL) no produjo efecto alguno sobre la actividad del preBötC ($n = 7$; Figura 8A). Después de una hora de haber agregado el fármaco al baño de registro ni la amplitud (100.2 ± 3.848 % del basal) ni la frecuencia (104.2 ± 9.46 % del basal) presentaron algún cambio significativo ($p > 0.05$, Wilcoxon; Figura 8A), lo que sugiere que, en condiciones basales, la acción del IL1Ra sobre los IL1Rs no modula la actividad del preBötC. Por otra parte,

ante el pretratamiento con el IL1Ra antes de la aplicación de concentraciones ascendentes de IL-1 β , no se observó cambio alguno en la amplitud y en la frecuencia de las ráfagas inspiratorias (Figura 8B). En presencia del IL1Ra la IL-1 β no reprodujo la disminución de la amplitud de las ráfagas inspiratoria cuando se aplicó a las concentraciones de 10 ng/mL (98.93 ± 7.31 % del basal, $p = 0.437$, Wilcoxon) y de 20 ng/mL (94.65 ± 9.56 , $p = 0.09$, Wilcoxon). En presencia del IL1Ra la IL-1 β tampoco reprodujo el incremento en la frecuencia que ocurría con 10 ng/mL (120.2 ± 27.8 , $p = 0.5$, Wilcoxon). Lo anterior, indica que el efecto sobre las ráfagas inspiratorias observado con la aplicación de IL-1 β es mediado por el IL1R1 a través de un mecanismo sensible a la concentración de la IL-1 β y sensible al IL1Ra, lo que permite suponer que la activación microglial podría modular la actividad del preBötC a través de la liberación de IL-1 β (se explorará más adelante).

Tomando en cuenta la magnitud en la reducción de la amplitud de las ráfagas inspiratorias producida por la IL-1 β 20 ng/mL (a 76.31 ± 5.99 % del basal) y, la efectividad del IL1Ra para evitar la presentación de este efecto, fue relevante determinar si dicha reducción en la amplitud era reversible. Para ello, en una serie independiente de experimentos ($n = 6$), se registró la actividad del preBötC en presencia de IL-1 β (20 ng/mL) durante 90 minutos y, posteriormente, se procedió a sustituir el LCRA que incluía el fármaco por LCRA nuevo (lavado), previamente oxigenado y con la temperatura ajustada para evitar alteraciones en las condiciones de registro. En estos experimentos, después del periodo de exposición al fármaco el efecto producido por la IL-1 β resultó equiparable ($p > 0.05$ Mann-Whitney) al observado con la misma concentración en el protocolo ascendente de concentraciones y evaluado después de 30 minutos de exposición. En este nuevo protocolo de aplicación de IL-1 β 20mg/mL por un tiempo mayor se observó una reducción significativa de la amplitud a 75.90 ± 7.09 % del basal, mientras que no se observó ningún cambio significativo en la frecuencia del ritmo respiratorio (139.00 ± 39.36 % del basal). Después del periodo de lavado del fármaco, el efecto producido por la IL-1 β 20 mg/mL sobre la amplitud del ritmo respiratorio continuó sin alteraciones (73.51 ± 6.45 % del basal; Figura 9). En resumen, los resultados de esta sección muestran que la reducción en la amplitud de las ráfagas inspiratorias producida por la IL1 β es inducida por la activación del IL1R1 y que este efecto es irreversible.

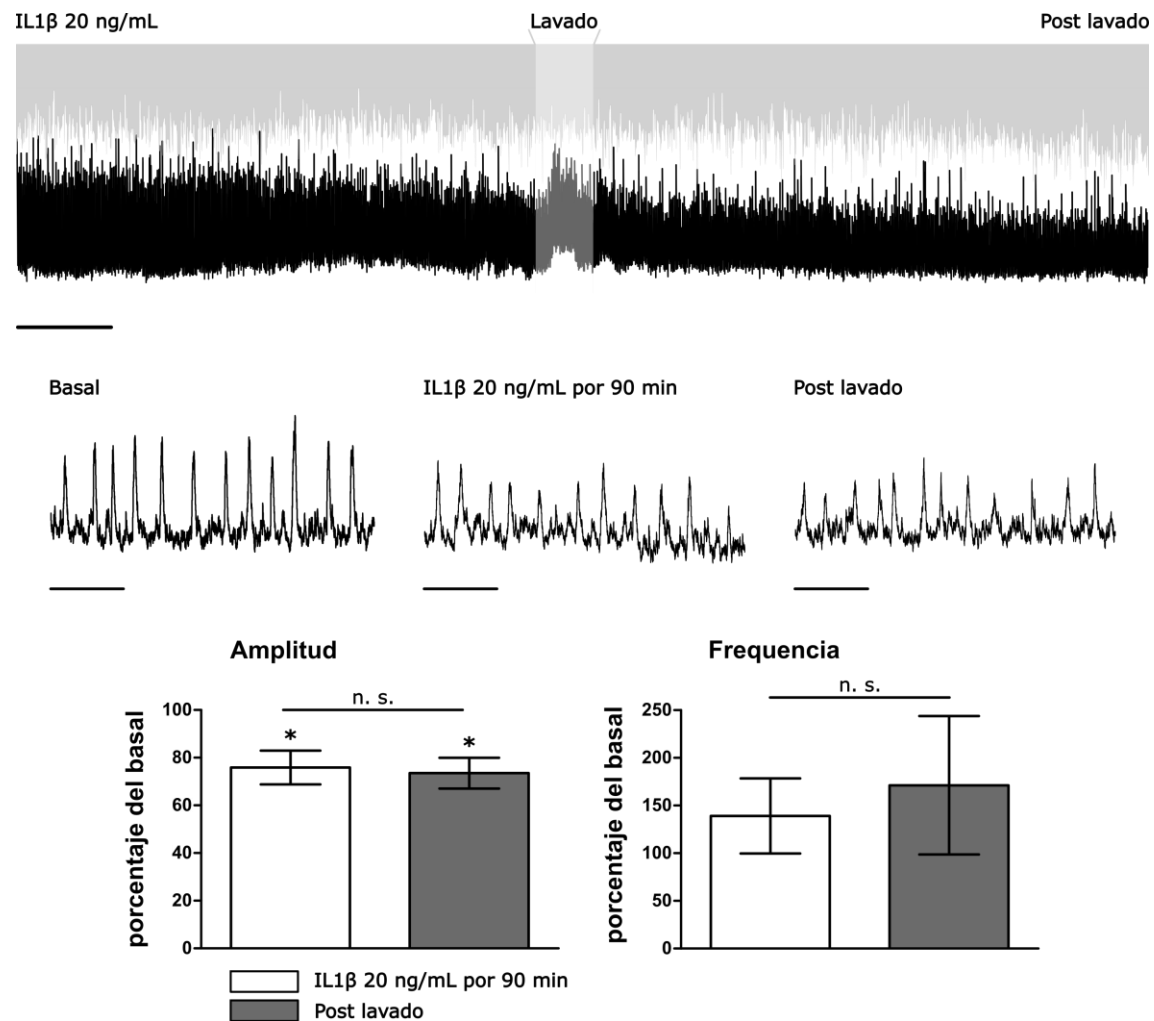


Figura 9. El efecto producido por la interleucina-1beta (IL1β) sobre la amplitud de las ráfagas inspiratorias es irreversible. En la parte superior se muestra un trazo representativo de los experimentos de “lavado”. Se muestran los últimos 60 minutos del periodo de exposición de la rebanada de tallo cerebral a la IL1β 20 mg/mL. Resaltado en gris, se muestra el periodo de inicio y término de la sustitución del LCRa con IL1β, por LCRa sin IL1β. También se muestran los 60 minutos restantes en los que se permitió estabilizar la actividad después de la eliminación de la IL1β. Al centro se muestran segmentos amplificados correspondientes a la condición basal, a los 90 minutos después de la exposición a la IL1β y al final del periodo de lavado. En el trazo condensado la escala corresponde a 10 minutos mientras que, en el caso de los segmentos amplificados corresponde a 10 segundos. En la parte inferior se muestran las cuantificaciones de la amplitud y de la frecuencia 90 minutos después de la aplicación de la IL1β (blanco) y 60 minutos después del lavado (gris). Los asteriscos denotan una diferencia significativa ($p < 0.05$, Wilcoxon) con respecto a la condición basal (sin IL1β). La comparación entre las dos condiciones no mostró diferencias significativas en la amplitud o la frecuencia durante y después de la aplicación de IL1β ($p > 0.05$, Mann-Whitney: n. s.).

Los resultados presentados hasta el momento muestran que la aplicación fármacos moduladores de la microglía y la IL-1β modulan la amplitud de las ráfagas inspiratorias generadas por el preBötC. En conjunto, esta evidencia sugirió que la activación microglial, probablemente a través de la liberación de IL-1β, podría modular la actividad generada en el preBötC, reduciendo la amplitud de las ráfagas inspiratorias. Para comprobar lo anterior se utilizaron estrategias de estimulación de la microglía genéticamente dirigidas: la opto y la quimiogenética (Tanaka et al., 2012; Sawada et al., 2012; Grace et al., 2018; Pardo-Peña et al., 2018). La utilización de estos tipos de estimulación elimina la controversia de un posible efecto inespecífico de los fármacos pues, como se mencionó previamente, si bien los activadores farmacológicos de la microglía son herramientas muy útiles, pueden llegar a tener efectos inespecíficos (Muecci et al., 2000; Husemann y Silverstein, 2001; Hatori et al., 2002; Lin et al., 2015; Shen et al., 2016).

Con base en los resultados farmacológicos, se procedió a realizar experimentos de opto y la quimiogenética. Para ello, se llevaron a cabo registros de actividad de campo en rebanadas de tallo cerebral de ratones que expresan la ChR2+ o el hMD3q+ en la microglía (Tanaka et al., 2012; Sawada et al., 2012; Grace et al., 2018; Pardo-Peña et al., 2018). En estas rebanadas, las ráfagas respiratorias generadas por el preBötC se registraron durante 60 minutos bajo condiciones basales. Posteriormente, se realizó la estimulación con luz azul en el caso de las rebanadas obtenidas de animales ChR2+ y con CNO en el caso de las rebanadas obtenidas de animales hMD3q+. Al término del periodo de estabilización del efecto, se encontró que la estimulación específica de la microglía modula la actividad generada en el preBötC (Figuras 10 y 11), como se describirá a continuación.

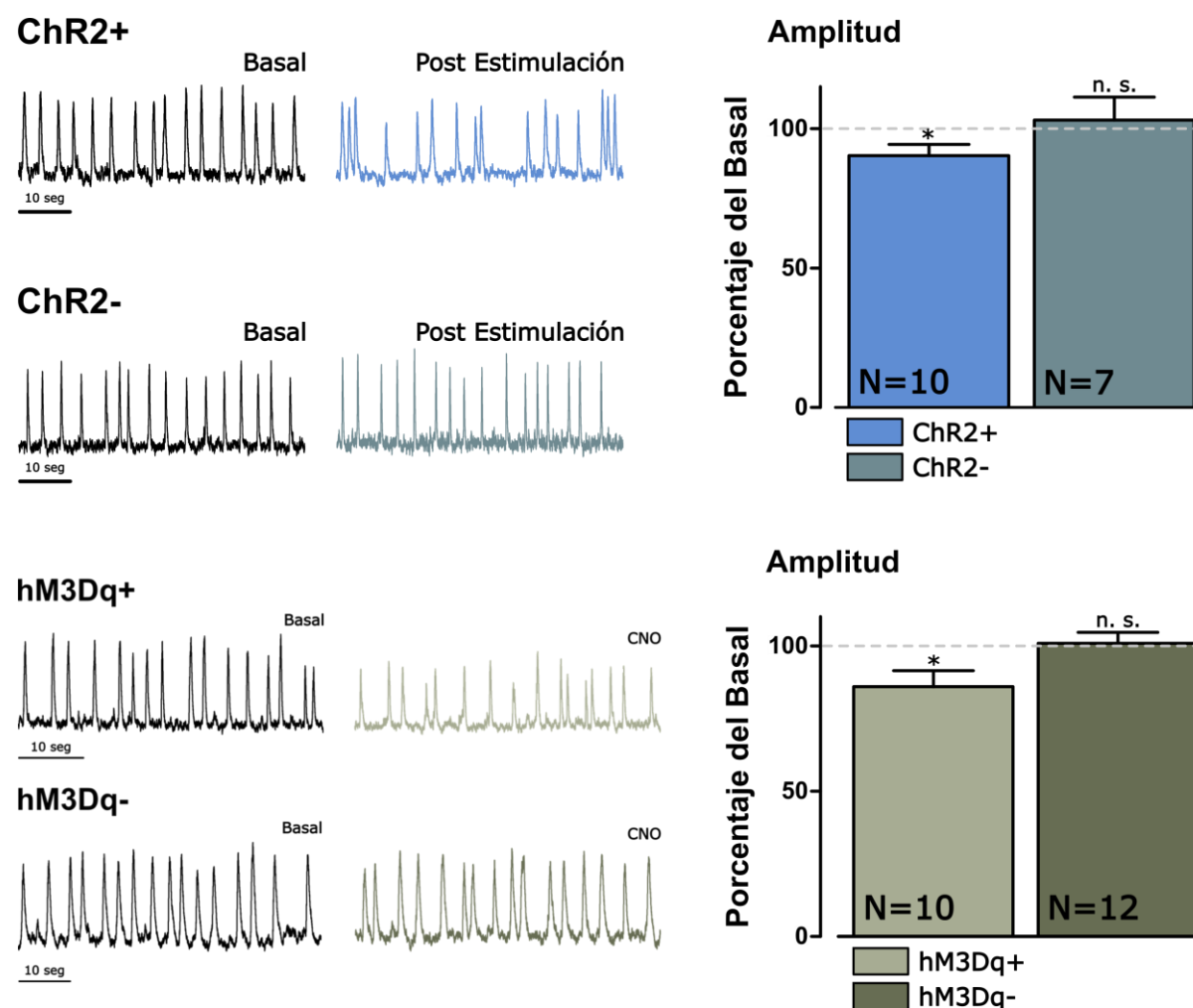


Figura 10. La estimulación optogenética y quimiogenética de la microglía reduce la amplitud de las ráfagas generadas en el preBötC. Se muestran los trazos representativos de la actividad rítmica registrada en el preBötC para cada uno de los grupos experimentales, tanto en la condición basal (izquierda) como la actividad registrada al término del periodo de recuperación post estimulación (derecha). También, se muestra la cuantificación de la amplitud de las ráfagas generadas en el preBötC al término del periodo de recuperación post estimulación óptica o con CNO, cada grupo experimental se muestra acompañado de su control correspondiente. Las gráficas representan la media y el error estándar para cada grupo. El asterisco denota una diferencia significativa de la amplitud registrada post estimulación ($p < 0.05$) con respecto a su propia condición basal (línea punteada que representa el 100%). n. s. denota la ausencia de una diferencia significativa ($p > 0.05$) con respecto a su propia condición basal (línea punteada que representa el 100%).

Los resultados muestran que 60 minutos después de la estimulación optogenética (luz azul por 20 minutos), en animales ChR2^{+/-}/YFP^{+/-}/CX3CR1^{+/-} que expresan canalrhodopsina 2 en la microglía (ChR2+), se observa una disminución significativa de la amplitud de las ráfagas inspiratorias (a 90.35 ± 4.003 % del basal; $p < 0.05$; figura 10) sin cambio en la frecuencia del

ritmo respiratorio (88.68 ± 8.375 % del basal; $p > 0.05$; figura 11). Por el contrario, el estímulo con luz azul no produjo cambio alguno ni en la amplitud de las ráfagas inspiratorias (103.1 ± 8.184 % del basal; $p > 0.05$; figura 10) ni en la frecuencia del ritmo respiratorio (99.33 ± 17.16 % del basal; $p > 0.05$; figura 11) en animales $ChR2^{-/-}/YFP^{-/-}/CX3CR1^{+/-}$ que no expresan canalrhodopsina 2 en la microglía ($ChR2^{-}$). En el caso de la estimulación quimiogénica (CNO por 60 minutos), en animales $hMD3q^{+/-}/CX3CR1^{+/-}$ que expresan el DREADD excitador en la microglía ($hMD3q^{+}$), se observa también una disminución significativa de la amplitud de las ráfagas inspiratorias (a 86.07 ± 5.431 % del basal; $p < 0.05$; figura 10) sin cambio en la frecuencia del ritmo respiratorio (99.54 ± 6.479 % del basal; $p > 0.05$; figura 11). Por el contrario, 60 minutos después de la estimulación quimiogénica, en animales $hMD3q^{-/-}/CX3CR1^{+/-}$ que no expresan DREADD excitador en la microglía ($hMD3q^{-}$), no se observa cambio alguno ni en la amplitud de las ráfagas inspiratorias (100.9 ± 3.691 % del basal; $p > 0.05$; figura 10) ni en la frecuencia del ritmo respiratorio (100.8 ± 6.749 % del basal; $p > 0.05$; figura 11).

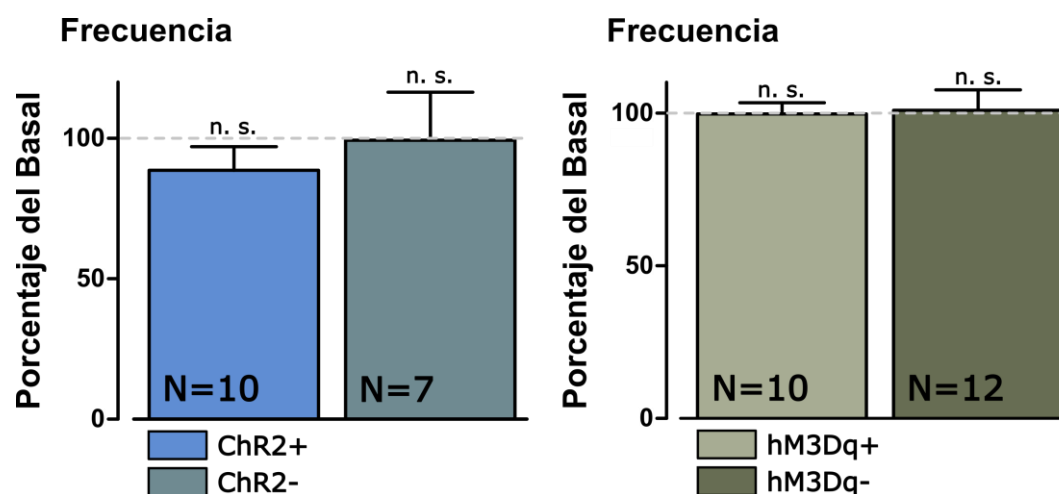


Figura 11. La estimulación optogénica y la quimiogénica de la microglía no afectan a la frecuencia de las ráfagas generadas en el preBötC.

Se muestra la cuantificación de la frecuencia de las ráfagas generadas en el preBötC al término del periodo de recuperación post estimulación óptica o con CNO, cada grupo experimental se muestra acompañado de su control correspondiente. La estimulación específica de la microglía no produjo algún efecto ($p > 0.05$) sobre la frecuencia con respecto a su propia condición basal (línea punteada que representa el 100%) o con respecto a su grupo control correspondiente. Las gráficas representan la media y el error estándar para cada grupo. n. s. denota la ausencia de una diferencia significativa ($p > 0.05$) con respecto a su propia condición basal (línea punteada que representa el 100%).

Para corroborar la especificidad celular de la reducción de la amplitud de las ráfagas respiratorias producida por la estimulación opto y quimiogénica de la microglía, se llevaron a cabo una serie independiente de experimentos en los que las rebanadas fueron tratadas con clodronato liposomal (LipClo), una toxina específica para la microglía (Van Rooijen y Sanders, 1994). Los resultados muestran que 60 minutos después de la estimulación optogénica, en animales $ChR2^{+/-}/YFP^{+/-}/CX3CR1^{+/-}$ que expresan canalrhodopsina 2 en la microglía ($ChR2^{+}$) y que además fueron tratados con LipClo, todavía se observa una disminución significativa de la amplitud de las ráfagas inspiratorias (a 90.67 ± 3.619 % del basal; $p < 0.05$; figura 12). Por el contrario, en el caso de la estimulación quimiogénica (CNO por 60 minutos), en animales $hMD3q^{+/-}/CX3CR1^{+/-}$ que expresan el DREADD excitador en la microglía ($hMD3q^{+}$) y que además fueron tratados con LipClo, no se observaron cambios en la amplitud de las ráfagas inspiratorias (97.08 ± 9.436 % del basal; $p > 0.05$; figura 12), lo que indica que el pretratamiento con LipClo evita la disminución de la amplitud de las ráfagas inspiratorias producida por la activación quimiogénica de la microglía.

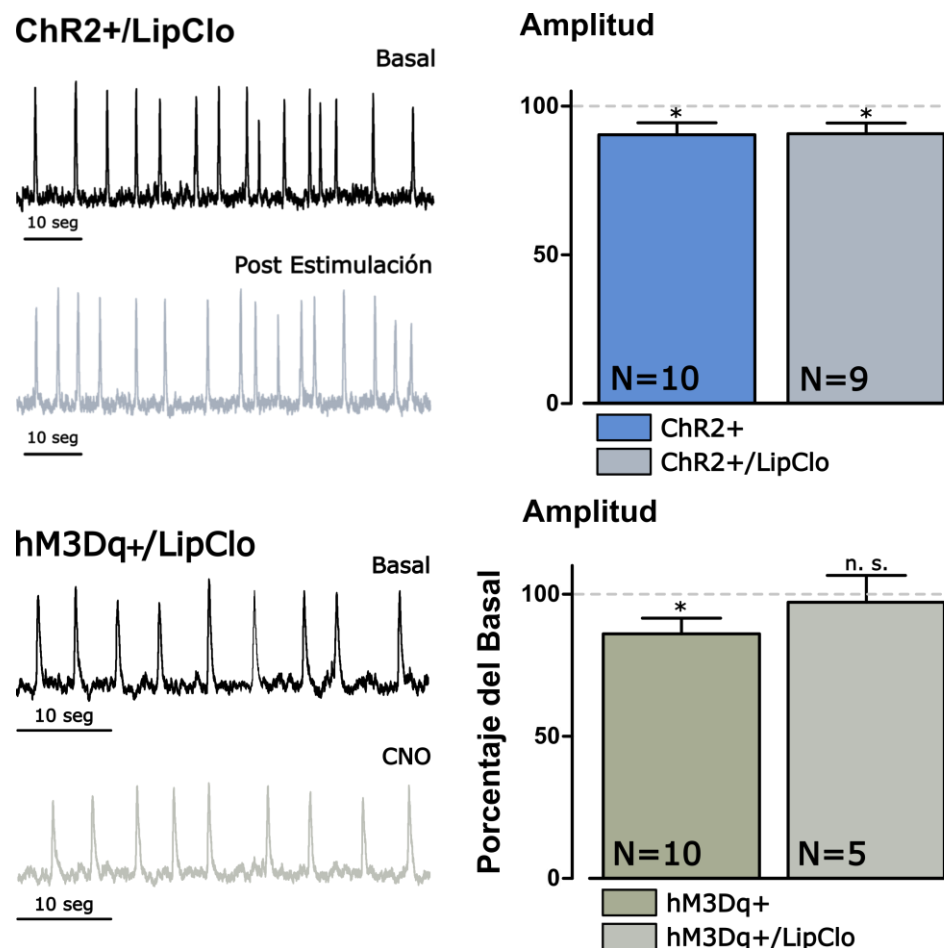


Figura 12. El pretratamiento con clodronato liposomal (LipClo) evita la reducción de la amplitud de las ráfagas respiratorias del preBötC producida por la estimulación quimiogénica de la microglía. Del lado izquierdo se muestran trazos representativos de ratones que expresan ChR2 o hM3Dq en la microglía, después de 2 horas de pretratamiento con LipClo (trazos superiores) y después de su activación con luz azul o CNO, respectivamente (trazos inferiores). Las gráficas muestran la cuantificación de las ráfagas inspiratorias (media y el error estándar) para cada grupo y condición experimental. Note que después del tratamiento con LipClo, la estimulación quimiogénica de la microglía no produjo efecto alguno, mientras que la estimulación optogénica de la microglía continuó produciendo una reducción significativa de la amplitud de las ráfagas inspiratorias. El asterisco denota una diferencia significativa de la amplitud registrada post estimulación ($p < 0.05$) con respecto a su propia condición basal (línea punteada que representa el 100%). n. s. denota la ausencia de una diferencia significativa ($p > 0.05$) con respecto a su propia condición basal (línea punteada que representa el 100%).

Los resultados descritos en el párrafo anterior muestran que el efecto producido sobre la actividad del preBötC por la estimulación optogénica no es sensible al pretratamiento con LipClo, mientras que el efecto sobre la actividad del preBötC producido por la estimulación quimiogénica si es sensible al pretratamiento con LipClo. Si bien se ha mostrado que el LipClo es un “depletador de la microglía” (Peña-Ortega, 2017), cuando se aplica por periodos de horas a días (Winkler et al., 2010), dadas las disimilitudes del efecto que produjo el LipClo entre las estimulaciones opto y quimiogénica, decidimos reevaluar la efectividad del LipClo para eliminar a la microglía en nuestras condiciones experimentales (Lorea-Hernández et al., 2016). Para ello, llevamos a cabo la inmunodetección de la proteína Iba1, un marcador específico de la microglía dentro del SNC en rebanadas tratadas con LipClo y rebanadas control (Figura 13).

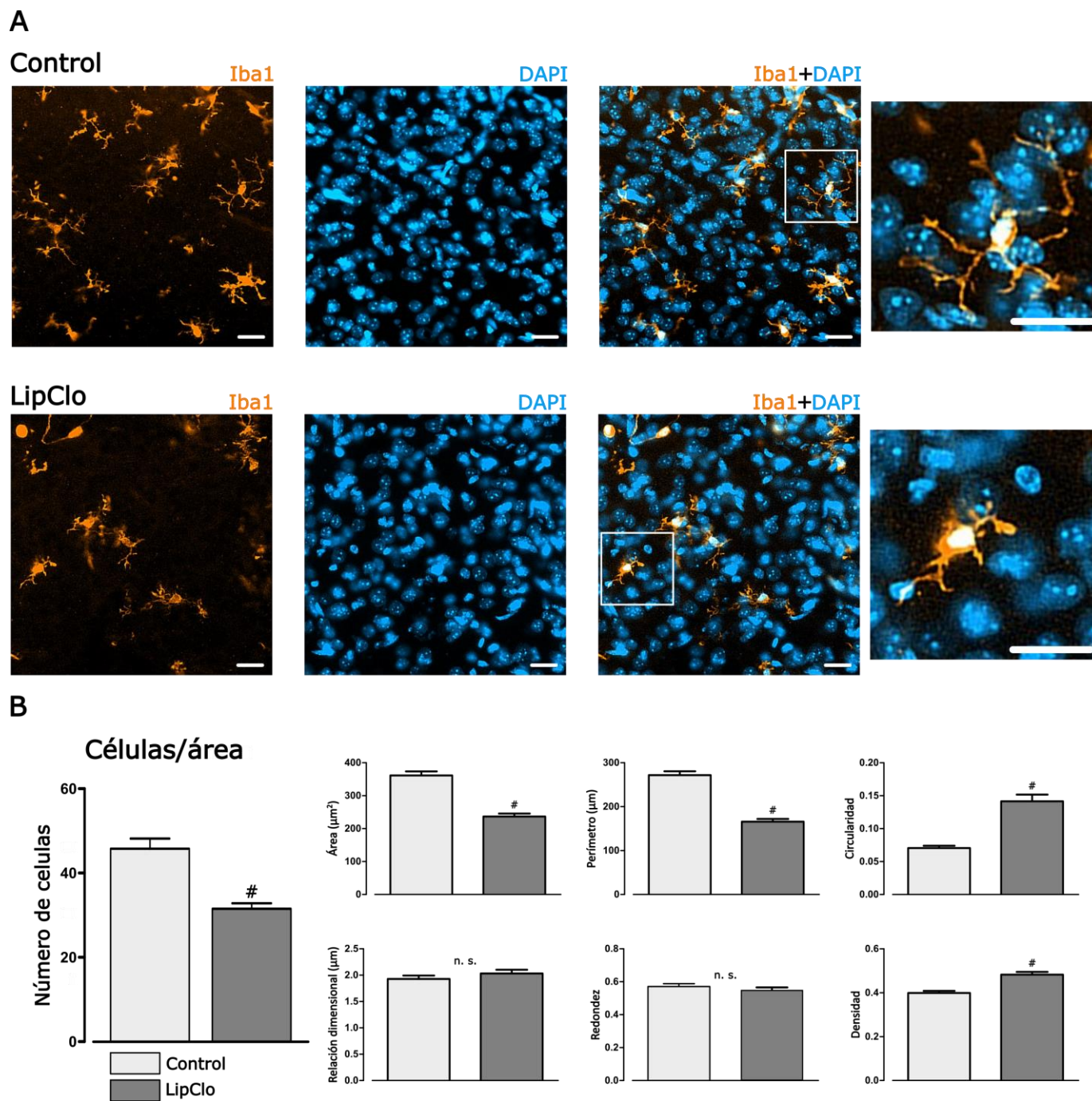


Figura 13. El tratamiento con LipClo reduce la cantidad de microglía y modifica la morfología de la microglía remanente. A, se muestran micrografías representativas de cortes de tallo cerebral de ratones C57BL/6 en los que se realizó la inmunodetección de la proteína Iba1 para visualizar a la microglía. Se presenta de izquierda a derecha, la marca fluorescente utilizada para Iba1 (microglía), DAPI (núcleos), el empalme de los dos anteriores, así como el acercamiento de las células señaladas en los recuadros blancos. En cada imagen la escala mostrada corresponde a 20 µm. En la condición control se pueden observar células microgliales con una morfología típicamente asociada a su estado vigilante, con numerosos procesos y un soma pequeño. La microglía observada en el tejido tratado con LipClo durante dos horas presentó una menor cantidad de procesos, menos ramificados y más cortos, que son signos de activación de la microglía o indicadores de daño en las células. En la esquina superior izquierda de la micrografía correspondiente a LipClo se puede observar un par de células que son prácticamente esféricas. B, se muestra la cuantificación del número de células por área (775 x 454 µm; objetivo 10X; 12 tomas grupo control, 16 tomas grupo LipClo), así como la medición de los parámetros morfométricos área, perímetro, circularidad, relación dimensional, redondez y densidad, realizada en células microgliales presentes en el tejido de cada grupo experimental (99 células control, 110 células LipClo). Las gráficas corresponden a la media ± error estándar. El numeral (#) denota una diferencia significativa con respecto al grupo control ($p < 0.05$), "n. s." denota la ausencia de diferencia entre los grupos.

El tratamiento por 2 horas con LipClo redujo de manera significativa la cantidad de microglía presente en el tallo cerebral de ratones neonatos ($p < 0.05$, prueba de t; -31.56% con respecto del control). El tratamiento con LipClo indujo cambios morfológicos en las células microgliales que indican un estado distinto al observado bajo condiciones control (Figura 13A). En el grupo LipClo la microglía presentó una menor área cubierta por las células ($236.9 \pm 8.929 \mu\text{m}^2$) que el observado en el grupo control ($361.4 \pm 12.39 \mu\text{m}^2$; $p < 0.05$, Mann-Whitney; figura 13B). Del mismo modo, se observó un menor perímetro celular en la microglía tratada con LipClo ($165.8 \pm 6.407 \mu\text{m}$) comparado al observado en el grupo control ($271.9 \pm 8.781 \mu\text{m}$; $p < 0.05$). El tratamiento con LipClo resultó en una mayor circularidad (0.1416 ± 0.01016) que la observada en la condición control (0.07057 ± 0.003568 ; $p < 0.05$; figura 13B). En cuanto a la relación dimensional y la redondez, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre el grupo tratado con LipClo (2.031 ± 0.07109 y 0.5495 ± 0.01611 respectivamente) y el grupo control (1.928 ± 0.06459 y 0.5713 ± 0.01701 , respectivamente; figura 13B). Por último, se observó una mayor densidad en la microglía del tejido tratado con LipClo (0.4821 ± 0.01248) con respecto a lo observado en la condición control (0.3988 ± 0.009453 ; $p < 0.05$; figura 13B).

Se ha establecido que la naturaleza del estímulo que activa a la microglía determina las características del estado que adquiere cuando ya está activada (Mosser y Edwards, 2008). Por ello, tomando en cuenta los cambios morfológicos que produce el LipClo y que el número de células se reduce en un 31.56% , es posible que el tratamiento por 2 horas con nuestro LipClo induce en la microglía restante un estado de activación que se contrapone al efecto de la estimulación quimiogénica, pero no al efecto de la estimulación optogénica. Para probar lo anterior, se evaluó con morfometría los cambios producidos por las dos estrategias de activación específica de la microglía, para así compararlos a lo observado en el tejido tratado con LipClo.

Se ha demostrado que la estimulación optogénica de la microglía induce la liberación de factores proinflamatorios (Tanaka et al., 2012; Pardo-Peña et al., 2018) y, también, produce cambios morfológicos (Sawada et al., 2012). Ambos fenómenos son signos asociados a la activación microglial (Morioka y Streit., 1991; Kreutzberg, 1996; Rupalla et al., 1998; Raivich et al., 1999; Ladeby et al., 2005; Ponomarev et al., 2006; Kettenmann et al., 2011). Para determinar si estos eventos se producen en las rebanadas de tallo cerebral de animales ChR2+ después de la estimulación optogénica de la microglía, se realizaron los siguientes experimentos. En primer lugar, se determinó si la estimulación optogénica produce cambios morfológicos en la microglía. Con este propósito se realizó la inmunodetección del marcador microglial Iba1 y se visualizó a las células con microscopía de fluorescencia. Se observaron cortes de tallo cerebral extraído de animales ChR2+ o ChR2-, cuyo tejido que fue incubado y expuesto a luz azul antes de su fijación y posterior procesamiento. En las rebanadas ChR2+, la microglía presentó una menor área cubierta por las células ($249.20 \pm 10.80 \mu\text{m}^2$) al observado en las rebanadas control ($372.1 \pm 23.78 \mu\text{m}^2$; $p < 0.05$; figura 14). En las rebanadas en las que se estimuló optogénicamente a la microglía, el perímetro celular ($303.6 \pm 14.21 \mu\text{m}$) fue menor al observado en las rebanadas control ($431.90 \pm 20.11 \mu\text{m}$; $p < 0.05$; figura 14). Adicionalmente, en las rebanadas ChR2+ la microglía presentó un incremento de la circularidad (0.043 ± 0.003) con respecto a las rebanadas control (0.029 ± 0.002 ; $p < 0.05$; figura 14) después del estímulo óptico. En las rebanadas ChR2+ estimuladas optogénicamente la microglía presentó un incremento de la relación dimensional (2.13 ± 0.09), con respecto a las rebanadas control (1.79 ± 0.09 ; $p < 0.05$; figura 14). Por otra parte, en las rebanadas ChR2+, después del estímulo óptico la microglía presentó una menor redondez (0.535 ± 0.019), con respecto al observado en las rebanadas control (0.60 ± 0.02 ; $p < 0.05$; figura 14). Finalmente, la microglía presentó una mayor densidad en las rebanadas ChR2+ (0.40 ± 0.01) con respecto a lo observado en las rebanadas control (0.345 ± 0.019 ; $p < 0.05$; figura 14).

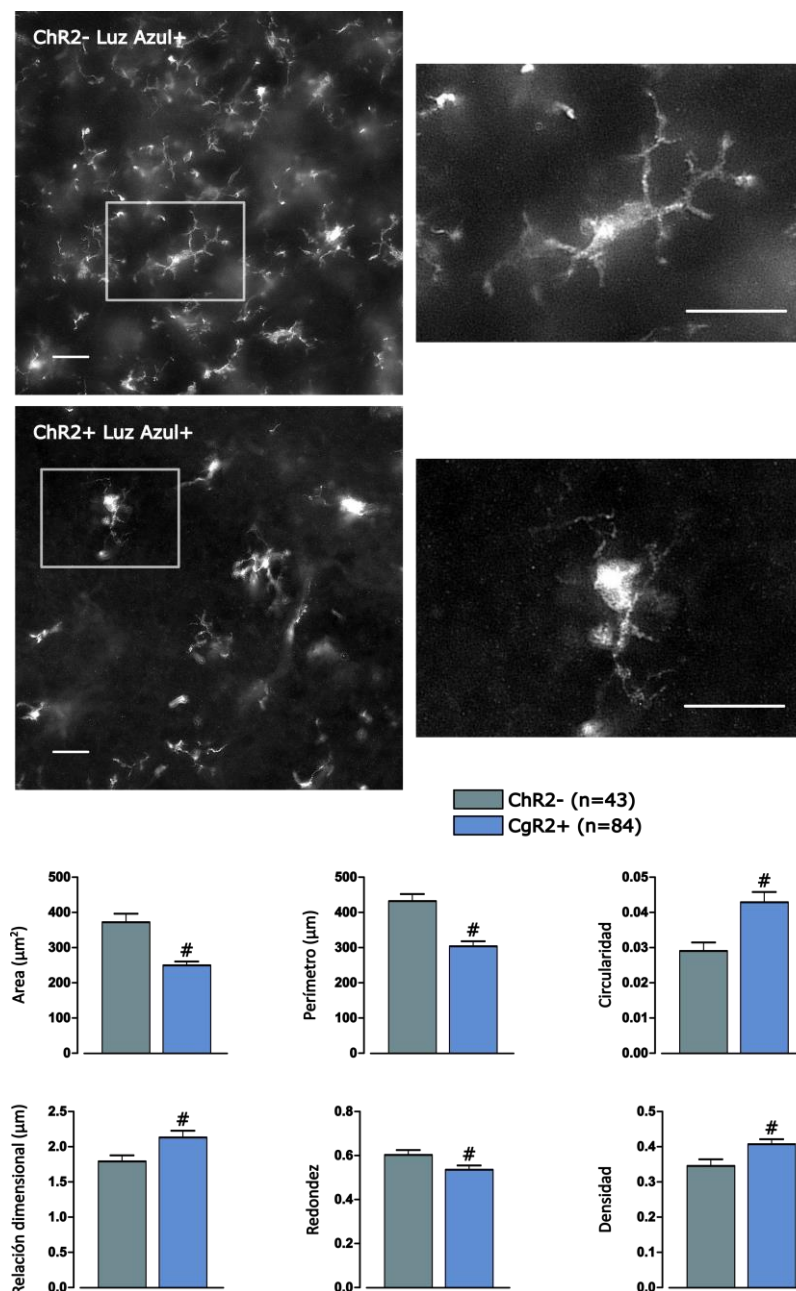


Figura 14. La estimulación optogenética en rebanadas de animales ChR2+/YFP+ produce cambios en la morfología de las células microgliales.

En los paneles superiores se muestran micrografías representativas de la microglía marcada con un fluoróforo acoplado a anticuerpos que detectan a la proteína Iba1 en rebanadas de animales ChR2- (control) y ChR2+ fijadas 2 horas después de haber sido estimuladas con luz azul. Del lado derecho se muestran micrografías en las que se identifica en un recuadro a la célula que será ampliada a la derecha. En las rebanadas control se observó una morfología típica del estado vigilante de la microglía, que se caracteriza por la presencia de procesos largos y claramente ramificados, mientras que la microglía de las rebanadas ChR2+ muestra procesos más cortos y menos ramificados. La escala representada en las micrografías corresponde a 20 µm. En la parte inferior de la figura se muestran las cuantificaciones, para los dos grupos experimentales, de 6 diferentes mediciones morfométricas. El numeral (#) denota una diferencia significativa con respecto del grupo control ($p < 0.05$, Mann-Whitney). Es destacable que la microglía ChR2+/YFP+ presente menores área y perímetro, así como una mayor redondez con respecto al control, que son signos morfológicos asociados a la activación microglial.

En el caso de la estimulación quimiogénica, se realizó el mismo procedimiento que con la optogenética para determinar si se producían cambios morfológicos en la microglía después de la estimulación. En este caso, se identificaron signos que claramente indican cambios morfológicos en la microglía de animales que expresaron el hM3Dq+ en este tipo celular después de ser tratado con CNO (5µM), lo anterior permite distinguirlas de la microglía observada en cortes de animales hM3Dq- que

recibieron el mismo tratamiento (Figura 15). En las rebanadas hM3Dq+ la microglía presentó un incremento del área cubierta por las células ($381.9 \pm 14.32 \mu\text{m}^2$), con respecto a las rebanadas control ($295.9 \pm 12.26 \mu\text{m}^2$; $p < 0.05$; figura 15), también se observó un incremento del perímetro celular en la microglía de rebanadas hM3Dq+ ($798 \pm 30.73 \mu\text{m}$), lo anterior con respecto a las rebanadas control ($468.8 \pm 18.67 \mu\text{m}$; $p < 0.05$; figura 15). En las rebanadas hM3Dq+, después del estímulo con CNO la microglía presentó una menor circularidad (0.0094 ± 0.0006) a la observada en las rebanadas control (0.020 ± 0.001 ; $p < 0.05$; figura 15). Por otra parte, no se encontraron diferencias entre la relación dimensional de la microglía observada en rebanadas hM3Dq+ (1.69 ± 0.05) y la observada en rebanadas control hM3Dq- (1.79 ± 0.06 ; $p > 0.05$; figura 15). De la misma manera, no se encontraron diferencias en la redondez que presentaron las células microgliales en rebanadas hM3Dq+ (0.63 ± 0.01) y rebanadas control (0.59 ± 0.02 ; $p > 0.05$; figura 15). Finalmente, se encontró una menor densidad en la microglía observada en rebanadas hM3Dq+ (0.212 ± 0.007) con respecto a la microglía observada en las rebanadas control (0.29 ± 0.01 ; $p < 0.05$; figura 15).

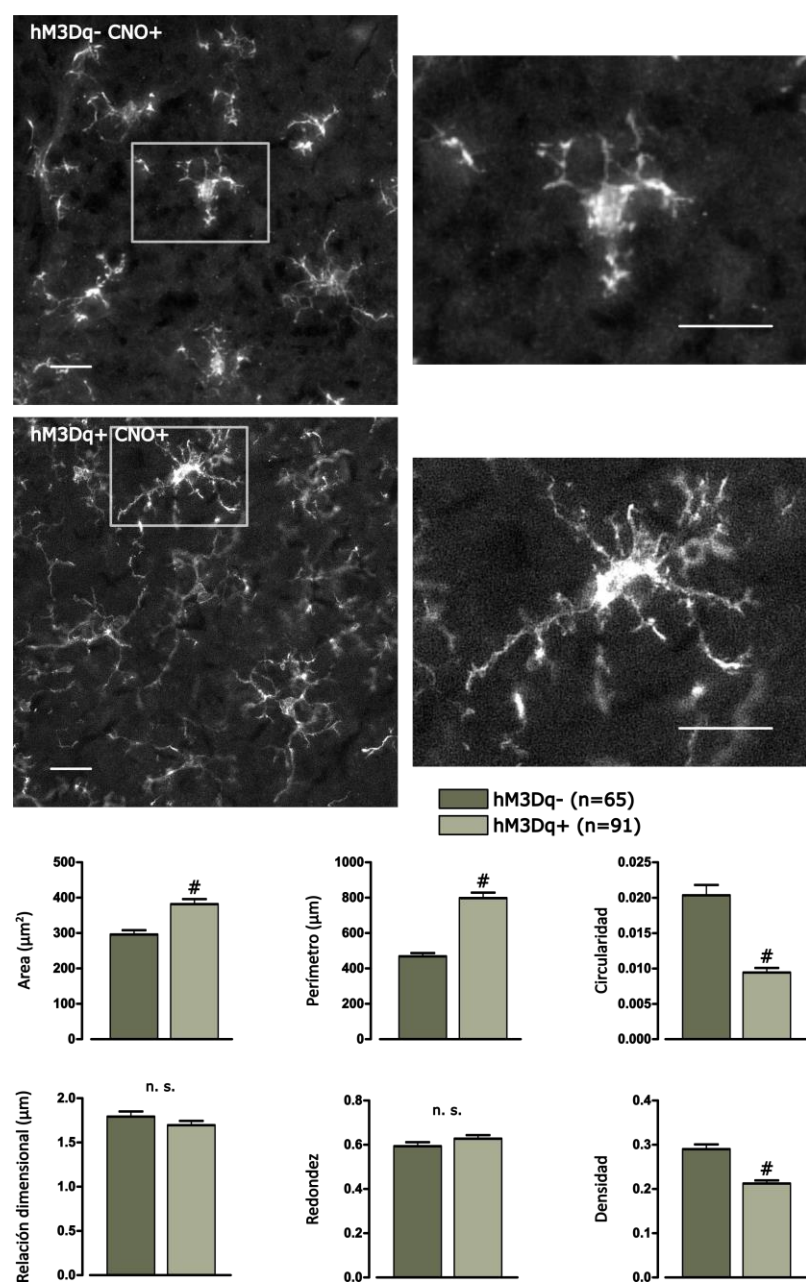


Figura 15. La estimulación quimiogénica en rebanadas de animales hM3Dq+ produce cambios en la morfología de las células microgliales. En los paneles superiores se muestran micrografías representativas de la microglía marcada del mismo modo que se mencionó en la figura 14. En primer lugar, se muestra a la microglía presente en el tallo cerebral de animales hM3Dq- (control) seguido de la microglía hM3Dq+. El tejido fue fijado 2

horas después de haber sido estimuladas con CNO. En las micrografías se identifica con un recuadro a la célula que será ampliada a la derecha. Nuevamente se encontró que la microglía en el tejido control presentó una morfología típica del estado vigilante, mientras que la microglía de las rebanadas hM3Dq+ muestra una morfología distinta, caracterizado por procesos muy largos, lo que se ve reflejado en una área y perímetro, además de una menor redondez. La escala representada en las micrografías corresponde a 20 μm . En la parte inferior de la figura se muestran las cuantificaciones de 6 diferentes mediciones morfométricas. El numeral (#) denota una diferencia significativa ($p < 0.05$, Mann-Whitney) con respecto al grupo control mientras que la ausencia de una diferencia significativa se denota con “n. s.”.

Una vez confirmada la aparición de cambios morfológicos asociados a la activación de la microglía, se corroboró si la activación opto y quimiogénica de la microglía produce la liberación de factores inflamatorios. Para ello, se realizó el registro de la liberación de H_2O_2 con el sistema EROS (Pardo-Peña et al., 2018). Los resultados muestran que la estimulación optogénica de la microglía induce un incremento significativo ($p < 0.05$, Wilcoxon) en la liberación de H_2O_2 después de que se presenta el estímulo luminoso sobre las rebanadas. Este incremento cambia la concentración basal de H_2O_2 de $3.6 \pm 0.4 \mu\text{M}$ a $9.9 \pm 1.4 \mu\text{M}$ al finalizar el periodo de estabilización de la liberación tras el estímulo luminoso (Figura 16).

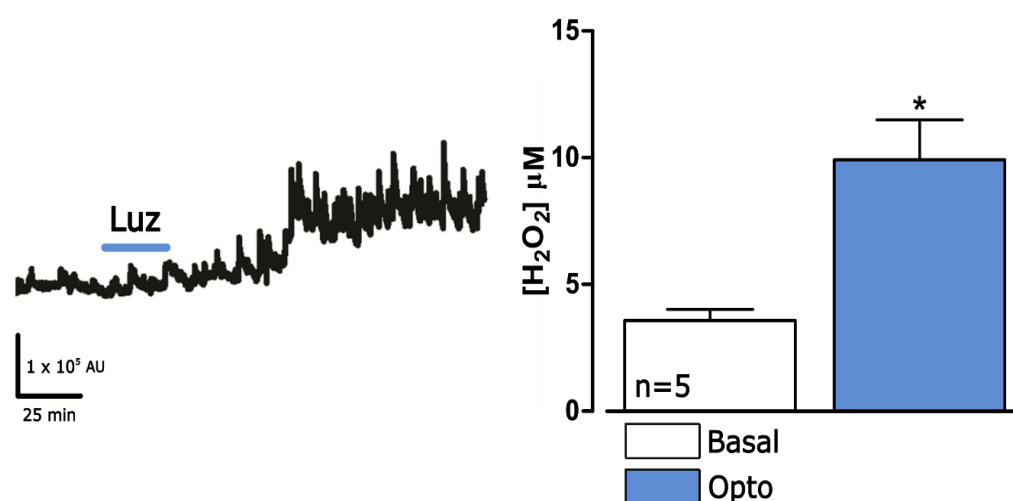


Figura 16. Liberación de H_2O_2 en la rebanada de tallo cerebral de ratones Chr2+. Se muestra un trazo representativo del registro de la intensidad de fluorescencia (UA) asociada a la liberación de H_2O_2 en la rebanada de tallo cerebral, en condiciones basales, durante los 20 minutos de estimulación óptica (barra azul) y durante el periodo post estimulación. Se puede observar un incremento en la liberación de H_2O_2 aproximadamente 50 minutos después de concluida la estimulación óptica. Este incremento se sostuvo durante el resto del registro. En la gráfica de la derecha se muestra el valor promedio de la liberación de H_2O_2 durante la condición basal y durante el periodo post estímulo (Opto). El asterisco denota una diferencia significativa con respecto a la condición basal (prueba de Wilcoxon; $p < 0.05$).

En el caso de la estimulación quimiogénica, también se realizó la cuantificación de H_2O_2 en tejido de animales hMD3q+ con el sistema EROS (Pardo-Peña et al., 2018). En estos experimentos se observó que la liberación promedio de H_2O_2 en la condición basal fue de $3.5 \pm 0.6 \mu\text{M}$ y la activación quimiogénica de la microglía incrementó los niveles de H_2O_2 a $6.3 \pm 0.7 \mu\text{M}$ después de la estimulación de la microglía hMD3q+ con CNO. El incremento en la liberación de H_2O_2 fue significativo ($p < 0.05$, Wilcoxon) y permaneció durante todo el periodo en que la rebanada de tallo cerebral estuvo expuesta a la acción del CNO (Figura 17).

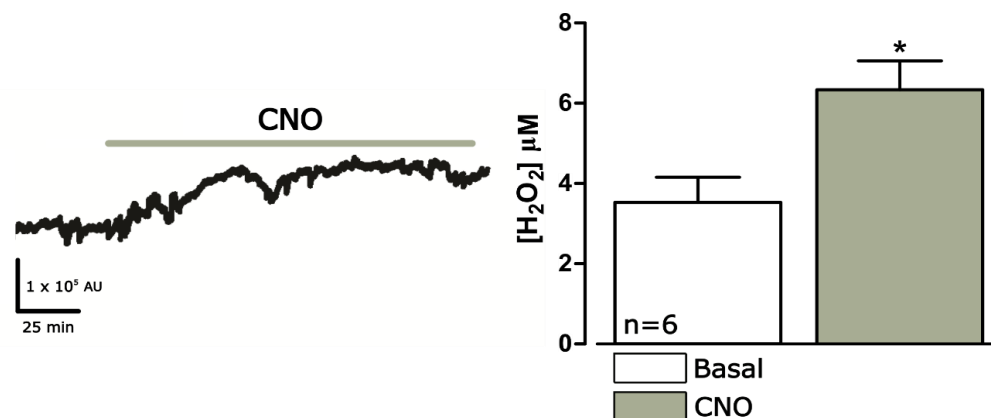


Figura 17. Cuantificación de la liberación de H₂O₂ en la rebanada de tallo cerebral de ratones hMD3q+ antes y después de la estimulación con CNO. Se muestra un trazo representativo del registro de la intensidad de fluorescencia (UA) asociada a la liberación de H₂O₂ en la rebanada de tallo cerebral, en condiciones basales y durante el periodo de post estimulación (Línea verde). Se puede observar un incremento en la liberación de H₂O₂ aproximadamente 30 minutos después de agregar el CNO, este incremento se sostuvo durante el resto del registro. En la gráfica de la derecha se muestra el valor promedio de la liberación de H₂O₂ durante la condición basal y durante el periodo post estímulo (CNO). El asterisco denota una diferencia significativa con respecto a la condición basal (prueba de Wilcoxon; $p < 0.05$).

Uno de los mediadores proinflamatorios liberados por la microglía es la IL-1 β (MacFarlane et al., 2016), misma que afecta la actividad de los circuitos neuronales (Bessis et al., 2007; Hanisch y Kettenmann, 2007). Por ello, probamos si los efectos de la estimulación opto y quimiogénica de la microglía se afectan cuando se interfiere con la acción de esta citocina, para ello utilizamos al antagonista del receptor de la intrelucina-1beta (IL1Ra) (Helmy et al., 2016) (Figuras 18 y 19).

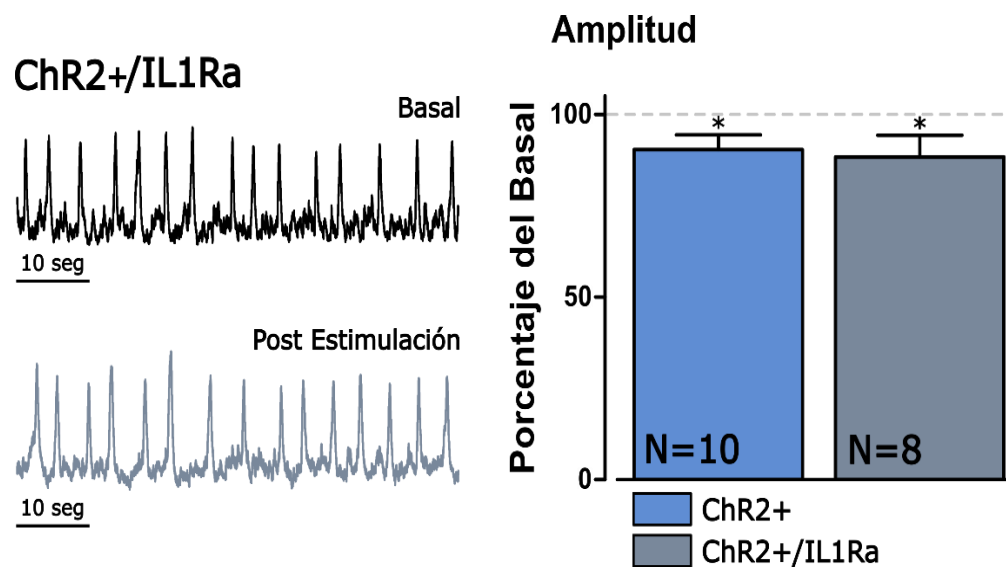


Figura 18. El tratamiento con el antagonista del receptor de la intrelucina-1beta (IL1Ra) no evita la disminución de la amplitud de las ráfagas respiratorias del preBötC inducida por la estimulación optogénica de la microglía. Del lado izquierdo se muestran trazos representativos de la actividad generada en rebanadas de tallo cerebral de ratones ChR2+ después de 60 minutos de exposición al IL1Ra (trazo superior) y después de su activación con luz azul (trazo inferior). La gráfica representa la media y el error estándar para cada grupo. Aun después del tratamiento con IL1Ra, la estimulación óptica de la microglía redujo la amplitud de las ráfagas respiratorias del preBötC en rebanadas de tallo cerebral, ambos grupos no son estadísticamente distintos ($p > 0.05$, Mann-Whitney). El asterisco denota una diferencia significativa con respecto a la condición basal (prueba de Wilcoxon; $p < 0.05$).

Los resultados muestran que 60 minutos después de la estimulación optogenética, en animales $ChR2^{+/-}/YFP^{+/-}/CX3CR1^{+/-}$ que expresan canalrhodopsina 2 en la microglía ($ChR2+$) y que además fueron tratados con el IL1Ra, todavía se observa una disminución significativa de la amplitud de las ráfagas inspiratorias (a 88.36 ± 5.919 % del basal; $p < 0.05$; figura 18). De la misma manera, en el caso de la estimulación quimiogénica (CNO por 60 minutos), en animales $hMD3q^{+/-}/CX3CR1^{+/-}$ que expresan el DREADD excitador en la microglía ($hMD3q+$) y que además fueron tratados con IL1Ra, todavía se observa una disminución significativa de la amplitud de las ráfagas inspiratorias (a 85.81 ± 4.106 % del basal; $p < 0.05$; figura 19), lo que indica que el pretratamiento con IL1Ra no evita la disminución de la amplitud de las ráfagas inspiratorias producida por la activación opto y quimiogénica de la microglía, por lo que la IL-1 β no participaría de este efecto.

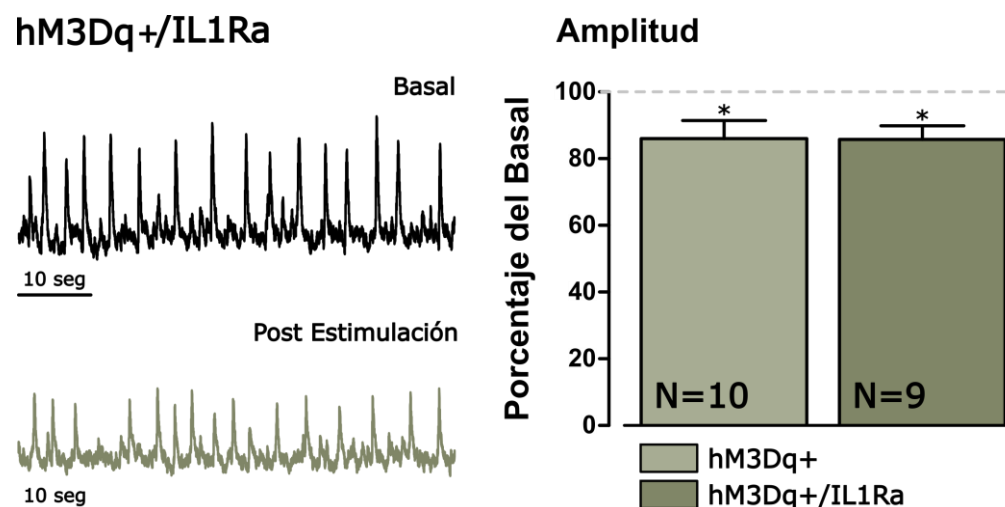


Figura 19. El tratamiento con el antagonista del receptor de la interleucina-1beta (IL1Ra) no evita la disminución de la amplitud de las ráfagas respiratorias del preBötC inducida por la quimiogénica de la microglía. Del lado izquierdo se muestran trazos representativos de ratones que expresan hM3Dq después de 1 hora en presencia del IL1Ra (trazo superior) y después de su activación con CNO (trazo inferior). Las gráficas representan la media y el error estándar para cada grupo, el asterisco denota diferencia significativa con respecto a la condición basal. Ambos grupos no son estadísticamente distintos ($p > 0.05$). El asterisco denota una diferencia significativa con respecto a la condición basal (prueba de Wilcoxon; $p < 0.05$).

Discusión

En la presente tesis, se profundizaron las observaciones realizadas previamente por nuestro grupo de investigación que indicaban que la estimulación farmacológica de la microglía modula la actividad del preBötC (Lorea-Hernández, 2015, Camacho-Hernández et al., 2018), el generador central de la actividad respiratoria (Horiuchi et al., 2017). Para ello, se implementaron estrategias que nos permitieran contender contra la posible inespecificidad del efecto producido por el LPS (Lin et al., 2015; Shen et al., 2016), una molécula ampliamente utilizada como activadora de la microglía (Rietschel et al., 1994; Nakajima et al., 2001; Wang et al., 2005; Machado et al., 2011; Yoon et al., 2012). Primero, se complementó el uso del LPS con una serie independiente de experimentos con un set de moléculas que también han sido catalogadas como activadoras de la microglía (figura 6). En este set se incluyó: al DNA fragmentado (Li et al., 2004; Collings et al., 2004; Duran-Flores y Heil, 2018), la proteína CX3CL1 (Pabon et al., 2011; Galán-Ganga et al., 2019) y a la leucadherina 1 (Czirr et al., 2017; Yao et al., 2018).

En los experimentos farmacológicos complementarios, las distintas moléculas también produjeron una reducción significativa de la amplitud de la actividad sincrónica del preBötC y, adicionalmente, la LK1 generó un incremento significativo de la frecuencia del ritmo respiratorio. Dado que el blanco común de todas las sustancias utilizadas en esta tesis, y en nuestro trabajo previo, es la activación de la microglía, puede considerarse que estas observaciones sustentan la noción de que la microglía cuando es activada, en este caso farmacológicamente, modula la actividad del preBötC. Sin embargo, existen reportes en los que se ha señalado que estas moléculas podrían afectar otros tipos celulares dentro del SNC (Muecci et al., 2000; Husemann y Silverstein, 2001; Hatori et al., 2002; Lin et al., 2015; Shen et al., 2016; Peña-Ortega, 2017), lo que limita las conclusiones obtenidas exclusivamente a partir de experimentos farmacológicos para modular a la microglía (Peña-Ortega, 2017). Considerando lo anterior, en este proyecto se incorporó la utilización de herramientas genéticamente dirigidas para estimular a la microglía, lo que reduce más la posibilidad de un efecto inespecífico (Tanaka et al., 2012; Sawada et al., 2012; Grace et al., et al., 2018). Para ello se utilizó la canalrhodopsina 2 o el DREADD3 (hM3Dq) expresados en la microglía (Parkhurst et al., 2013 Yona et al., 2013; Akins et al., 2017; Baertsch et al., 2019; Grace et al., et al., 2018). Utilizando estas herramientas genéticamente dirigidas se determinó que la estimulación optogenética y quimiogenética de la microglía modula la actividad del preBötC de manera muy similar a la producida por las manipulaciones farmacológicas. Es de reiterarse que el efecto en estos experimentos presentó similitudes importantes con el efecto observado en la mayoría de los experimentos de estimulación farmacológica de la microglía, como la reducción significativa de la amplitud de las ráfagas inspiratorias y la ausencia de alteraciones en la frecuencia del ritmo respiratorio. Lo anterior, respalda las evidencias previamente generadas en nuestro grupo (Lorea-Hernández, 2015, Camacho-Hernández et al., 2018) y permite puntualizar que la activación microglial, por si misma, es un evento capaz de modular la generación del ritmo respiratorio.

Una vez solidificada la observación de que la microglía efectivamente modula la actividad del preBötC se evaluó experimentalmente si la estimulación optogenética y quimiogenética de la microglía produce cambios morfológicos en estas células que estuvieran asociados a su activación. Para ello, se utilizó la técnica de inmunofluorescencia con la que se detectó a la proteína Iba1. Por un lado, con la estimulación optogenética, se observaron signos morfológicos típicamente ligados a la activación microglial, que incluyen la reducción en el perímetro celular y el área cubierta por las células, así como un aumento en la circularidad de las células que les da un aspecto ameboideo (Hanisch y Kettenmann, 2007; Kettenmann y Verkhratsky, 2008; Fernandez-Arjona et al., 2018). La estimulación quimiogenética, por otra parte, produjo un incremento en el perímetro y el área además de una disminución de la circularidad y de la densidad de las células, lo que permite concluir que las activaciones opto y quimiogenética de la microglía produce cambios morfológicos diferentes, e incluso opuestos, en tre ellos. Aunque la morfología adquirida por la estimulación quimiogenética difiere de la típica ameboidea, con procesos más largos que los que presenta en su estado basal, ya ha sido previamente identificada como una morfología asociada a procesos de

activación microglial (Fernandez-Arjona et al., 2018; Mishima et al., 2019). De acuerdo con lo referido en la literatura revisada para la elaboración de esta tesis, el análisis morfométrico presentado en este trabajo es el primero que describe la respuesta microglial a las estimulación opto y quimiogénica dependiente de la ChR2 y del hM3Dq, respectivamente (Tanaka et al., 2012; Sawada et al., 2012; Grace et al., 2018; Pardo-Peña et al., 2018). Lo anterior representa, en sí mismo, una importante evidencia de la utilidad que tienen la opto y la quimiogénica como herramientas de activación microglial y, complementa trabajos en donde se ha demostrado que la activación de la microglía mediante estas herramientas induce la liberación de una mayor cantidad de factores inflamatorios (Sawada et al., 2012; Grace et al., 2018).

Es probable, aunque todavía falta por determinarse experimentalmente que, con ambas herramientas de estimulación genéticamente dirigidas, se produjo un incremento en la concentración intracelular de calcio en la microglía (Lilienbaum e Israel, 2003; Nagamoto y Combs, 2010; Tanaka et al., 2012; Xu et al., 2016). Además de que se demostró que tanto la estimulación optogénica como la estimulación quimiogénica inducen un incremento en la liberación de H₂O₂. Ya se ha determinado, utilizando un sistema similar al EROS, que la liberación máxima de ROS después de una estimulación ocurre tras un periodo de una hora aproximadamente (Swindle et al., 2002), lo que es consistente con los resultados presentados en esta tesis. Adicionalmente, se ha observado que la liberación de ROS incrementa principalmente en macrófagos y no tanto en otro tipo de células inmunológicas (Swindle et al., 2002), lo que permite sugerir que el principal tipo celular detrás del incremento en la liberación de H₂O₂ en las rebanadas de tallo cerebral, en respuesta a la estimulación opto o quimiogénica, es la microglía.

El H₂O₂ es una molécula capaz de modular la excitabilidad neuronal a través de modificar el funcionamiento de diferentes canales iónicos (Avshalumov et al. 2005; Jackson y Haydon, 2008; Luin et al., 2011). Se ha reportado que el H₂O₂ puede funcionar como un bloqueador de canales de potasio (p.e. los KIR; Bychkov et al., 1999) además de aumentar la conductancia del sodio, favoreciendo un incremento en la excitabilidad neuronal (Luin et al., 2011). También, se ha reportado que un incremento en la concentración del H₂O₂ incrementa la conductancia al calcio en las neuronas (Giniatullin y Giniatullin, 2003), lo que se ha visto que favorece la transmisión sináptica (Giniatullin y Giniatullin, 2003). Por el contrario, se ha reportado que en el mesencéfalo el H₂O₂ induce la hiperpolarización de neuronas dopaminérgicas (Avshalumov et al., 2005). Mecanismos similares a estos podrían participar en la modulación de la actividad del preBötC, ya que se ha demostrado que el H₂O₂ es un potente modulador de la actividad respiratoria que produce una depresión transitoria inicial de las ráfagas inspiratorias, seguido de un incremento en la actividad neuronal (García et al. 2011).

En esta tesis, también se utilizó el LipClo en rebanadas de animales hMD3q+ y ChR2+ utilizadas para los registros de la actividad del preBötC. Lo anterior, con la finalidad de eliminar a la microglía (Van Rooijen y Sanders, 1994; Lorea-Hernández et al., 2015) y determinar si el efecto de la estimulación opto y quimiogénica de la microglía depende la presencia de esta célula en las rebanadas. Por ello, fue inesperado que la reducción en la amplitud de las ráfagas inducida por la estimulación optogénica de la microglía no fuera bloqueada por el pretratamiento con LipClo de las rebanadas de tallo cerebral, mientras que el mismo tratamiento sí bloqueó la reducción en la amplitud inducida por la estimulación quimiogénica de la microglía. Como se mencionó previamente, ante este resultado se planteó la posibilidad de que el LipClo no necesariamente estuviera induciendo la eliminación efectiva de la microglía en las rebanadas de tallo cerebral (Van Rooijen y Sanders, 1994). Con respecto a lo anterior, recientemente se ha demostrado que el tratamiento agudo con LipClo induce signos de activación en la microglía con un protocolo similar al utilizado en los experimentos de este trabajo (Raghuramana et al., 2019). Coincidentemente, se ha reportado que para conseguir una importante eliminación de la microglía (80-95 % menos células que en la condición basal) se requieren periodos de al menos 24 horas de exposición, e incluso más de una aplicación (Winkler et al., 2010), Raghuramana y cols. (2019) encontraron que con 3 horas de tratamiento, el LipClo induce una morfología ameboidea en la microglía (típicamente asociada a su estado activado) en rebanadas de hipocampo, además de observar un incremento en la liberación de factores inflamatorios como el TNF α y la IL1 β (Raghuramana et al., 2019). En los experimentos presentados en esta tesis, se trató con LipClo a las rebanadas de tallo cerebral durante 2 horas antes de inducir la estimulación opto o quimiogénica de la microglía, lo que puede considerarse un periodo agudo de exposición al fármaco de

acuerdo con lo reportado por Raghuramana y cols. (2019). Lo anterior apoya la posibilidad de que la activación que pudiera inducir el LipClo en la microglía se contraponen al efecto de la estimulación quimiogénica, pero no al efecto de la estimulación optogénica, lo que además sugiere que el efecto sobre la amplitud de las ráfagas inspiratorias de ambos tipos de estimulación podría producirse a través de mecanismos distintos.

Si bien se observó que la estimulación optogénica y la estimulación quimiogénica inducen cambios morfológicos en la microglía y un incremento en la liberación de H₂O₂ en rebanadas de tallo cerebral, la determinación precisa del estado de activación que adquiere la microglía con estas estrategias de estimulaciones requeriría un análisis transcriptómico y proteómico (Wes et al., 2015), aunque los cambios en la morfología sirven como indicador de la respuesta microglial ante un estímulo, no es posible hacer una asociación directa entre las características morfológicas y las características funcionales en la microglía. Desde su salida del saco vitelino y su establecimiento en el SNC, la actividad de la microglía y su “estado” es determinado por la interacción que establece con el microambiente local, además de ser altamente responsiva a cualquier cambio que en este ocurra (Dubbelaar et al., 2018). Se ha observado que la respuesta microglial ante diferentes modulaciones es estímulo-específica, lo que supera por mucho la noción convencional de activación M1 y M2 (proinflamatorio-citotóxico y antiinflamatorio-trófica respectivamente) de otros macrófagos, lo que en el caso de la microglía se considera ya como un sistema inválido de categorización (Mittelbronn, 2014; Ransohoff, 2016). La activación de la microglía involucra una reprogramación transcripcional determinada por el propio estímulo que la indujo en principio (Xue et al., 2014).

Durante la respuesta de la microglía ante un estímulo pueden ser liberados factores anti y proinflamatorios simultáneamente (Wang et al. 2018), además de que un mismo estímulo puede producir respuestas con efectos opuestos en la microglía dependiendo del estado inicial de las células (Yu et al., 2017). De hecho, se han descrito hasta 299 perfiles de transcripción distintos resultantes de la exposición de la microglía a 29 condiciones *in vitro* diferentes, lo que ha permitido resolver que la respuesta microglial, si bien es dirigida por las características del estímulo que la induce, puede variar (Cook et al., 2003; Hammond et al., 2015; Ransohoff, 2016). Considerando lo anterior podría suponerse que con los estímulos optogénico y quimiogénico la microglía adquiere estados de activación específicos con perfiles transcripcionales propios (Dubbelaar et al., 2018), lo que es muy probable pues, se ha reportado que incluso la manipulación experimental en los modelos *in vitro* modifica la firma transcripcional de la microglía con respecto a la que se observa *in vivo* (Bennett et al., 2016; Yu et al., 2017). Inclusive, se ha demostrado *in vivo* que la microglía adquiere estados con perfiles transcripcionales asociados a patologías que en conjunto son llamados “DAM”, por las siglas en inglés de “disease-associated microglía” (Krasemann et al., 2017). La DAM desempeña funciones protectoras o nocivas para el SNC dependiendo de la patología a la que se asocie (Keren-Shaul et al., 2017). Además, como se mencionó previamente, se han descrito fenotipos particulares de la microglía en distintas regiones del SNC con perfiles transcripcionales derivados de las interacciones que establece con el microambiente local (Ramirez et al., 2015). Inclusive, se ha observado en murinos que estos perfiles transcripcionales se modifican en etapas específicas del desarrollo, pudiendo distinguir microglía asociada a la etapa neonatal, a la juvenil, a la madurez y a la senectud (Matcovitch-Natan et al., 2016).

Aun cuando son muy diversos los estados de activación que la microglía puede presentar y que estos están determinados por varios factores, la microglía invariablemente requiere de vías de señalización reguladas por calcio para llevar a cabo procesos involucrados en su activación como la proliferación, la migración, la fagocitosis y la transcripción génica de factores proinflamatorios y antiinflamatorios (Färber y Kettenmann, 2006). Estas vías de señalización son reguladas por la concentración intracelular de calcio, regulada a su vez por el flujo de iones a través de la membrana celular o por la liberación de calcio desde las reservas internas como el retículo endoplasmático (REp; Xu y Beech, 2001) a través de mecanismos similares a los que se presentan en la estimulación opto y quimiogénica. En la microglía, como en otras células, el flujo de calcio a través de su membrana está regulado por la acción de varios canales (Ohana et al., 2009), algunos activados por voltaje (Eder, 1998; Kotecha y Schlichter, 1999), otros acoplados a receptores clásicos (Liu et al., 2016; Murugan et al., 2011) y otros acoplados al sistema SOCE, siglas en inglés de “store operated calcium entry” (Ohana et al., 2009). La liberación de calcio desde las

reservas intracelulares es regulada por los canales que controlan al sistema SOCE y que se encuentran en el REp (Ohana et al., 2009). Como se mencionó previamente, en la microglía existen mecanismos de regulación de la concentración intracelular de calcio de este tipo y son la base de la estimulación optogenética y quimiogenética utilizadas para los experimentos del presente trabajo.

La microglía expresa basalmente receptores ionotrópicos y metabotrópicos que regulan su concentración intracelular de calcio (Liu et al., 2016). En condiciones fisiológicas el monitoreo del microambiente, el mantenimiento de las sinapsis y el soporte trófico son funciones constitutivas de la microglía en su estado vigilante que son reguladas por la neurotransmisión ionotrópica (Wong et al., 2015). Sin embargo, también se ha observado que el ingreso de calcio a través de receptores ionotrópicos de glutamato como los AMPA, así como los Kainato y NMDA, que producen la liberación de factores inflamatorios como el TNF α , la IL1 β y el óxido nítrico (ON) en la microglía (Liu et al., 2016). En cultivos primarios se ha observado la estimulación del receptor NMDA produce un incremento en la concentración intracelular de calcio en la microglía, mientras que la aplicación de MK801, un antagonista de los receptores tipo-NMDA, evita la translocación de Nf- κ B hacia el núcleo, lo que reduce la expresión de TNF α , IL-1 β , iNOS y ON (Murugan et al., 2011). La microglía también expresa receptores para GABA de tipo A y B, mientras que los primeros son receptores ionotrópicos que cuando se activan inducen un fenotipo neuroprotector en la microglía, los segundos son metabotrópicos y su actividad favorece la producción de factores inflamatorios (Liu et al., 2016).

Lo anterior, señala que la naturaleza ionotrópica o metabotrópica de los receptores activados en la microglía determina las características del estado de activación que adquiera la microglía, lo que podría contribuir a las diferencias observadas en este trabajo entre los efectos de la estimulación optogenética y de la estimulación quimiogenética, siendo la primera muy similar a la acción de un receptor ionotrópico y la segunda utilizando un receptor metabotrópico. Aun así, como se mencionó previamente, estos dos tipos de estimulación tienen en común que inducen un incremento de la concentración intracelular de calcio en la microglía (Tanaka et al., 2012; Sawada et al., 2012; Grace et al., 2018), lo que induce la actividad del NF- κ B (Machado et al., 2011). Este factor de transcripción promueve la síntesis y liberación de factores inflamatorios como la IL-1 β , la IL-6 y el TNF- α en la microglía (Wang et al., 2015). Se ha demostrado que la actividad de estas citocinas está relacionada con la presentación de deficiencias respiratorias en distintas patologías (Vega et al., 1995; Ferrante et al., 2008; Wang et al., 2015). De hecho, se ha demostrado *in vivo* que la IL-1 β es un depresor de la actividad respiratoria que se produce en gran cantidad cuando se activa la microglía (Olsson et al., 2003; Hofstetter y Herlenius, 2005; Gresham et al., 2011).

Uno de los resultados más inesperados de esta tesis fue que la estimulación opto y quimiogenética de la microglía produjeran una reducción significativa en la amplitud de las ráfagas inspiratorias registradas en rebanadas de tallo cerebral previamente tratadas con el IL1Ra, pues esto sugiere que se trata de un efecto independiente de la actividad de la IL1 β . El efecto de los mediadores microgliales sobre la actividad neuronal puede ser distinto dependiendo de la región del sistema nervioso en que se liberen (García et al., 2011). La modulación de la actividad respiratoria por la IL1 β a menudo es estudiada *in vivo* (Olsson et al., 2003; Hofstetter y Herlenius, 2005) y no hay reportes, anteriores a lo mostrado en los resultados de este trabajo, que muestren una modulación directa de la actividad basal del preBötC inducida por IL1 β . Una posibilidad es que la IL1 β liberada después de la estimulación en el tejido de animales ChR2+ y hMD3q+ represente un incremento en su concentración que permanece por debajo de 1 ng/mL, por lo que este incremento de IL1 β no produciría un cambio significativo en la actividad del preBötC. No debe descartarse que la modulación de la actividad respiratoria que se ha reportado en modelos *in vivo* pudiera ser inducida por la acción de la IL1 β , ya que probablemente, en otras regiones del SNC que contribuyen a la modulación de la actividad respiratoria los circuitos neuronales locales podrían ser más sensibles a la actividad de la IL1 β (Olsson et al., 2003; Gresham et al., 2011). Adicionalmente, en un modelo *in vivo* la liberación de IL1 β podría ser amplificada por otras células efectoras de la respuesta inflamatoria, como los astrocitos (Gourine et al., 2010; Pascual et al., 2011), las células perivasculares y ependimarias (Schiltz y Sawchenko, 2003; Vadeboncoeur et al., 2003; Faraco et al., 2017), que podrían secundariamente modular la ventilación (Olsson et al., 2003; Hofstetter y Herlenius, 2005). Además, como ya se mencionó, la microglía responde de manera compleja (Yu et al., 2017; Wang et al. 2018) y diversa (Cook et al., 2003; Hammond et al., 2015;

Ransohoff, 2016) ante los estímulos que recibe, por lo que no se puede descartar la posibilidad de que otros mediadores inflamatorios, distintos a los probados o cuantificados en este proyecto, participen en el efecto producido por la estimulación optogenética (Tanaka et al., 2012; Han et al., 2014; Wang et al., 2015) y quimiogenética (Grace et al., 2018) de la microglía. Aunque su posible efecto sobre la actividad del preBötC no fue corroborado mediante experimentos de bloqueo, en este proyecto se determinó que el H₂O₂ incrementa su liberación después de ambos estímulos, lo que podría indicar una relación con la reducción de la amplitud de las ráfagas inspiratorias, pues como se mencionó previamente, el H₂O₂ puede modular la excitabilidad (Luin et al., 2011) y la transmisión sináptica (Giniatullin y Giniatullin, 2003) en las neuronas.

Se ha reportado que la amplitud de las ráfagas inspiratorias en el preBötC depende del reclutamiento de neuronas que se denominan seguidoras (Del Negro et al., 2002; Thoby-Brisson et al., 2000; Peña et al., 2004). Dado que el reclutamiento de estas neuronas se lleva a cabo a través de interacciones sinápticas dentro del preBötC una posible explicación para la reducción de la amplitud de las ráfagas, producida por la activación de la microglía, es que la actividad sináptica del preBötC es afectada por la activación de la microglía a través de mecanismos complejos. Es necesario investigar con más profundidad qué alteraciones ocurren dentro del preBötC después de la activación microglial inducida por los estímulos opto y quimiogénicos, para determinar por ejemplo si alguna población neuronal es más sensible a los efectos de los mediadores liberados por la microglía activada, lo que podría revelar blancos terapéuticos para las alteraciones respiratorias que producen la neuroinflamación que acompaña a varias patologías, además de entender como la microglía contribuye a la generación del ritmo respiratorio.

Considerando la distinción entre ritmo y patrón de la actividad poblacional respiratoria (Haji et al., 2000), donde el ritmo corresponde a la frecuencia del ciclo respiratorio y el patrón corresponde a las características de las ráfagas inspiratorias (p.e. su duración, amplitud y forma; Haji et al., 2000; Marchenko et al., 2016), se ha propuesto que el ritmo respiratorio es producido a través de la acción conjunta de dos componentes, un generador de ritmo y un generador de patrones (Haji et al., 2000; Marchenko et al., 2016). Con base en la evidencia que existe en la literatura y en la aportación realizada por este proyecto, es muy probable que la microglía sea una parte fundamental del generador de patrones, pues es capaz de modular la amplitud de las ráfagas generadas en el preBötC, probablemente a través de la liberación de numerosos y diversos gliotransmisores (Haji et al., 2000), excluyendo la IL1 β , con base en los resultados presentados en este trabajo.

Conclusión

Los resultados presentados en este trabajo apoyan la propuesta de que la activación de la microglía puede modular la actividad del preBötC (Lorea-Hernandez, 2015; Camacho-Hernández et al., 2018), tanto la estimulación farmacológica como la estimulación genéticamente dirigida de la microglía reducen la amplitud de las ráfagas inspiratorias registradas en el complejo pre-Bötzinger. Se determinó en rebanadas de tallo cerebral que tanto la estimulación optogenética como la quimiogenética modifican la morfología de la microglía e inducen un incremento en la liberación de H₂O₂, estos cambios se asocian típicamente a la activación de la microglía (Hanisch y Kettenmann, 2007; Kettenmann y Verkhratsky, 2008; Fernandez-Arjona et al., 2018; Mishima et al., 2019), lo anterior incrementa el valor de estas herramientas como activadores específicos de la microglía (Sawada et al., 2012, Tanaka et al., 2012, Grace et al., 2018), aventajando a las aproximaciones farmacológicas que con frecuencia presentan efectos inespecíficos. El efecto producido por la estimulación optogenética y la estimulación quimiogenética sobre la actividad del preBötC no depende de la IL-1 β , pero podría depender de la acción del H₂O₂ puesto que se observó un incremento en la liberación de esta molécula con los dos tipos de estimulación específica, explorar esta posibilidad resulta de gran valor y podría representar una línea de investigación muy interesante.

Bibliografía citada.

- Akins, V. T., Weragalaarachchi, K., Picardo, M. D., Revill, A. L., & Negro, C. A. (2017). Morphology of Dbx1 respiratory neurons in the preBötzinger complex and reticular formation of neonatal mice. *Scientific Data*, 4(1), 170097. doi: 10.1038/sdata.2017.97
- Akiyoshi, R., Wake, H., Kato, D., Horiuchi, H., Ono, R., Ikegami, A., Nabekura, J. (2018). Microglia enhance synapse activity to promote local network synchronization. *eNeuro*, 5(5), 18. doi: 10.1523/eneuro.0088-18.2018
- Alarcon, B., Gonzalez, M. E., & Carrasco, L. (1984). Antiherpesvirus action of atropine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 26(5), 702-706. doi: 10.1128/aac.26.5.702
- Aleksandrova, N. P., & Danilova, G. A. (2010). Effect of intracerebroventricular injection of interleukin-1-beta on the ventilatory response to hyperoxic hypercapnia. *European journal of medical research*, 15 Suppl 2(Suppl 2), 3–6. <https://doi.org/10.1186/2047-783x-15-s2-3>
- Aleksandrova, N. P., Danilova, G. A., & Aleksandrov, V. G. (2015). Cyclooxygenase pathway in modulation of the ventilatory response to hypercapnia by interleukin-1 β in rats. *Respiratory physiology & neurobiology*, 209, 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2014.12.006>
- Aleksandrova, N. P., Danilova, G. A., & Aleksandrov, V. G. (2017). Interleukin-1beta suppresses the ventilatory hypoxic response in rats via prostaglandin-dependent pathways. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 95(6), 681–685. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2016-0419>
- Alliot, F., Godin, I., & Pessac, B. (1999). Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Developmental Brain Research*, 117(2), 145-152. doi: 10.1016/s0165-3806(99)00113-3
- Angelova, P. R., Kasymov, V., Christie, I., Sheikhabaei, S., Turovsky, E., Marina, N., Gourine, A. V. (2015). Functional Oxygen Sensitivity of Astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, 35(29), 10460-10473. doi: 10.1523/jneurosci.0045-15.2015
- Araque, A., & Navarrete, M. (2010). Glial cells in neuronal network function. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1551), 2375-2381. doi: 10.1098/rstb.2009.0313
- Araque, A., Sanzgiri, R. P., Parpura, V., & Haydon, P. G. (1998). Calcium Elevation in Astrocytes Causes an NMDA Receptor-Dependent Increase in the Frequency of Miniature Synaptic Currents in Cultured Hippocampal Neurons. *Journal of Neuroscience*, 18(17), 6822-6829. doi: 10.1523/jneurosci.18-17-06822.1998
- Araque, A., Sanzgiri, R. P., Parpura, V., & Haydon, P. G. (1999). Astrocyte-induced modulation of synaptic transmission. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 77(9), 699-706. doi: 10.1139/y99-076
- Armbruster, B. N., Li, X., Pausch, M. H., Herlitze, S., & Roth, B. L. (2007). Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(12), 5163-5168. doi: 10.1073/pnas.0700293104
- Ashwell, K. (1991). The distribution of microglia and cell death in the fetal rat forebrain. *Developmental Brain Research*, 58(1), 1-12. doi: 10.1016/0165-3806(91)90231-7
- Avshalumov, M. V., Chen, B. T., Koós, T., Tepper, J. M., & Rice, M. E. (2005). Endogenous Hydrogen Peroxide Regulates the Excitability of Midbrain Dopamine Neurons via ATP-Sensitive Potassium Channels. *The Journal of Neuroscience*, 25(17), 4222-4231. doi: 10.1523/jneurosci.4701-04.2005

- Baertsch, N. A., Severs, L. J., Anderson, T. M., & Ramirez, J.-M. (2019). A spatially dynamic network underlies the generation of inspiratory behaviors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(15), 201900523. doi: 10.1073/pnas.1900523116
- Ballanyi, K., Kuwana, S.-i., Völker, A., Morawietz, G., & Richter, D. W. (1992). Developmental changes in the hypoxia tolerance of the in vitro respiratory network of rats. *Neuroscience Letters*, 148(1-2), 141-144. doi: 10.1016/0304-3940(92)90824-q
- Ballanyi, K., Panaitescu, B., & Ruangkittisakul, A. (2010). Control of Breathing by “Nerve Glue”. *Sci. Signal.*, 3(147). doi: 10.1126/scisignal.3147pe41
- Behardi, R., & Ramirez, G. (2001). Microglia - astrocyte interaction in Alzheimer's disease: friends or foes for the nervous system? *Biological Research*, 34(2). doi: 10.4067/s0716-97602001000200017
- Bennett, M. L., Bennett, C. F., Liddel, S. A., Ajami, B., Zamanian, J. L., Fernhoff, N. B., Barres, B. A. (2016). New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(12). doi: 10.1073/pnas.1525528113
- Berridge, M. J. (1998). Neuronal Calcium Signaling. *Neuron*, 21(1), 13-26. doi: 10.1016/s0896-6273(00)80510-3
- Besong, G., Battaglia, G., D'Onofrio, M., Marco, R., Ngomba, R., Storto, M., Nicoletti, F. (2002). Activation of Group III Metabotropic Glutamate Receptors Inhibits the Production of RANTES in Glial Cell Cultures. *Journal of Neuroscience*, 22(13), 5403-5411. doi: 10.1523/jneurosci.22-13-05403.2002
- Bessis, A., Béchade, C., Bernard, D., & Roumier, A. (2007). Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia*, 55(3), 233-238. doi: 10.1002/glia.20459
- Biber, K., Neumann, H., Inoue, K., & Boddeke, H. (2007). Neuronal ‘On’ and ‘Off’ signals control microglia. *Trends in Neurosciences*, 30(11), 596-602. doi: 10.1016/j.tins.2007.08.007
- Bouvier, J., Autran, S., Dehorter, N., Katz, D. M., Champagnat, J., Fortin, G., & Thoby-Brisson, M. (2008). Brain-derived neurotrophic factor enhances fetal respiratory rhythm frequency in the mouse preBötzinger complex in vitro. *European Journal of Neuroscience*, 28(3), 510-520. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06345.x
- Brady, L. S., Lynn, A. B., Herkenham, M., & Gottesfeld, Z. (1994). Systemic interleukin-1 induces early and late patterns of c-fos mRNA expression in brain. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 14(8), 4951–4964. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-08-04951.1994>
- Bruno, V., Battaglia, G., Casabona, G., Copani, A., Caciagli, F., & Nicoletti, F. (1998). Neuroprotection by Glial Metabotropic Glutamate Receptors Is Mediated by Transforming Growth Factor- β . *Journal of Neuroscience*, 18(23), 9594-9600. doi: 10.1523/jneurosci.18-23-09594.1998
- Bruno, V., Sureda, F. X., Storto, M., Casabona, G., Caruso, A., Knopfel, T., Nicoletti, F. (1997). The Neuroprotective Activity of Group-II Metabotropic Glutamate Receptors Requires New Protein Synthesis and Involves a Glial–Neuronal Signaling. *Journal of Neuroscience*, 17(6), 1891-1897. doi: 10.1523/jneurosci.17-06-01891.1997
- Burnstock, G. (2009). Purinergic cotransmission. *Experimental Physiology*, 94(1), 20-24. doi: 10.1113/expphysiol.2008.043620
- Bychkov, R., Pieper, K., Ried, C., Milosheva, M., Bychkov, E., Luft, F. C., & Haller, H. (1999). Hydrogen peroxide, potassium currents, and membrane potential in human endothelial cells. *Circulation*, 99(13), 1719-1725. doi: 10.1161/01.cir.99.13.1719
- Camacho-Hernández, N. P., Lorea-Hernández, J. J., & Peña-Ortega, F. (2019). Microglial modulators reduce respiratory rhythm long-term facilitation in vitro. *Respiratory physiology & neurobiology*, 265, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2018.07.012>

- Carroll, M. S., & Ramirez, J.-M. (2013). Cycle-by-cycle assembly of respiratory network activity is dynamic and stochastic. *Journal of Neurophysiology*, 109(2), 296-305. doi: 10.1152/jn.00830.2011
- Center, J. J., Stultz, R. D., & McDonald, D. (2017). Brain Microglial Cells Are Highly Susceptible to HIV-1 Infection and Spread. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 33(11), 1155-1165. doi: 10.1089/aid.2017.0004
- Chen, R. Z., Akbarian, S., Tudor, M., & Jaenisch, R. (2001). Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. *Nature Genetics*, 27(3), 327-331. doi: 10.1038/85906
- Chen, Z., Jalabi, W., Hu, W., Park, H.-J., Gale, J. T., Kidd, G. J., Trapp, B. D. (2014). Microglial displacement of inhibitory synapses provides neuroprotection in the adult brain. *Nature Communications*, 5(1), 4486. doi: 10.1038/ncomms5486
- Chen, Z., Jalabi, W., Shpargel, K. B., Farabaugh, K. T., Dutta, R., Yin, X., Trapp, B. D. (2012). Lipopolysaccharide-Induced Microglial Activation and Neuroprotection against Experimental Brain Injury Is Independent of Hematogenous TLR4. *The Journal of Neuroscience*, 32(34), 11706-11715. doi: 10.1523/jneurosci.0730-12.2012
- Chou, Y.-L., Scarupa, M. D., Mori, N., & Canning, B. J. (2008). Differential effects of airway afferent nerve subtypes on cough and respiration in anesthetized guinea pigs. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 295(5). doi: 10.1152/ajpregu.90382.2008
- Coddou, C., Bravo, E., & Eugeni, J. (2009). Alterations in cholinergic sensitivity of respiratory neurons induced by pre-natal nicotine: a mechanism for respiratory dysfunction in neonatal mice. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1529), 2527-2535. doi: 10.1098/rstb.2009.0078
- Conn, P. J., & Pin, J. P. (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 37, 205-237. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.37.1.205
- Cook, A. D., Braine, E. L., & Hamilton, J. A. (2003). The Phenotype of Inflammatory Macrophages Is Stimulus Dependent: Implications for the Nature of the Inflammatory Response. *The Journal of Immunology*, 171(9), 4816-4823. doi: 10.4049/jimmunol.171.9.4816
- Coull, J. A. M., Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., Koninck, Y. (2005). BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*, 438(7070), 1017-1021. doi: 10.1038/nature04223
- Cui, Y., Kam, K., Sherman, D., Janczewski, W. A., Zheng, Y., & Feldman, J. L. (2016). Defining preBötzinger Complex Rhythm- and Pattern-Generating Neural Microcircuits In Vivo. *Neuron*, 91(3), 602-614. doi: 10.1016/j.neuron.2016.07.003
- Cunha, C., Angelucci, A., D'Antoni, A., Dobrossy, M. D., Dunnett, S. B., Berardi, N., & Brambilla, R. (2009). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) overexpression in the forebrain results in learning and memory impairments. *Neurobiology of Disease*, 33(3), 358-368. doi: 10.1016/j.nbd.2008.11.004
- Czirr, E., Castello, N. A., Mosher, K. I., Castellano, J. M., Hinkson, I. V., Lucin, K. M., Wyss-Coray, T. (2017). Microglial complement receptor 3 regulates brain A β levels through secreted proteolytic activity. *The Journal of experimental medicine*, 214(4), 1081-1092. doi: 10.1084/jem.20162011
- D'Antoni, S., Berretta, A., Bonaccorso, C., Bruno, V., Aronica, E., Nicoletti, F., & Catania, M. (2008). Metabotropic Glutamate Receptors in Glial Cells. *Neurochemical Research*, 33(12), 2436-2443. doi: 10.1007/s11064-008-9694-9
- Dalmau, I., Finsen, B., Zimmer, J., González, B., & Castellano, B. (1998). Development of microglia in the postnatal rat hippocampus. *Hippocampus*, 8(5), 458-474. doi: 10.1002/(sici)1098-1063(1998)8:5<458::aid-hipo6>3.0.co;2-n
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V., Zuo, Y., Jung, S., Gan, W.-B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neuroscience*, 8(6), 752-758. doi: 10.1038/nn1472

- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Futreal, A. P. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417(6892), 949-954. doi: 10.1038/nature00766
- Derecki, N. C., Cronk, J. C., Lu, Z., Xu, E., Abbott, S. B. G., Guyenet, P. G., & Kipnis, J. (2012). Wild-type microglia arrest pathology in a mouse model of Rett syndrome. *Nature*, 484(7392), 105-109. doi: 10.1038/nature10907
- Derijard, B., Raingeaud, J., Barrett, T., Wu, I., Han, J., Ulevitch, R., & Davis, R. (1995). Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science*, 267(5198), 682-685. doi: 10.1126/science.7839144
- Desforges, N. M., Hebron, M. L., Algarzae, N. K., Lonskaya, I., & Moussa, C. (2012). Fractalkine Mediates Communication between Pathogenic Proteins and Microglia: Implications of Anti-Inflammatory Treatments in Different Stages of Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2012, 345472. doi: 10.1155/2012/345472
- Domercq, M., Sánchez-Gómez, M., Areso, P., & Matute, C. (1999). Expression of glutamate transporters in rat optic nerve oligodendrocytes. *European Journal of Neuroscience*, 11(7), 2226-2236. doi: 10.1046/j.1460-9568.1999.00639.x
- Domercq, M., Sánchez-Gómez, M., Sherwin, C., Etxebarria, E., Fern, R., & Matute, C. (2007). System xc⁻ and Glutamate Transporter Inhibition Mediates Microglial Toxicity to Oligodendrocytes. *The Journal of Immunology*, 178(10), 6549-6556. doi: 10.4049/jimmunol.178.10.6549
- Dubbelaar, M. L., Kracht, L., Eggen, B. J. L., & Boddeke, E. W. G. M. (2018). The Kaleidoscope of Microglial Phenotypes. *Frontiers in Immunology*, 9. doi: 10.3389/fimmu.2018.01753
- Duran-Flores, D., & Heil, M. (2018). Extracellular self-DNA as a damage-associated molecular pattern (DAMP) that triggers self-specific immunity induction in plants. *Brain, Behavior, and Immunity*, 72, 78-88. doi: 10.1016/j.bbi.2017.10.010
- Dutschmann, M., Bischoff, A., Büsselberg, D., & Richter, D. (2003). Histaminergic modulation of the intact respiratory network of adult mice. *Pflügers Archiv*, 445(5), 570-576. doi: 10.1007/s00424-002-0904-z
- Echeverry, S., Rodriguez, M., & Torres, Y. P. (2016). Transient Receptor Potential Channels in Microglia: Roles in Physiology and Disease. *Neurotoxicity Research*, 30(3), 467-478. doi: 10.1007/s12640-016-9632-6
- Eder, C. (1998). Ion channels in microglia (brain macrophages). *The American journal of physiology*, 275(2), 42. doi: 10.1152/ajpcell.1998.275.2.C327
- Eglen, R. M., Reddy, H., Watson, N., & Challiss, R. A. J. (1994). Muscarinic acetylcholine receptor subtypes in smooth muscle. *Trends in Pharmacological Sciences*, 15(4), 114-119. doi: 10.1016/0165-6147(94)90047-7
- Ek, M., Kurosawa, M., Lundeberg, T., & Ericsson, A. (1998). Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1beta: role of endogenous prostaglandins. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(22), 9471-9479. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-22-09471.1998>
- Elmore, M. R., Burton, M. D., Conrad, M. S., Rytych, J. L., Van Alstine, W. G., & Johnson, R. W. (2014). Respiratory viral infection in neonatal piglets causes marked microglia activation in the hippocampus and deficits in spatial learning. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 34(6), 2120-2129. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2180-13.2014>
- Ericsson, A., Liu, C., Hart, R. P., & Sawchenko, P. E. (1995). Type 1 interleukin-1 receptor in the rat brain: distribution, regulation, and relationship to sites of IL-1-induced cellular activation. *The Journal of comparative neurology*, 361(4), 681-698. <https://doi.org/10.1002/cne.903610410>
- Esiri, M. M., al Izz, M. S., & Reading, M. C. (1991). Macrophages, microglial cells, and HLA-DR antigens in fetal and infant brain. *Journal of Clinical Pathology*, 44(2), 102-106. doi: 10.1136/jcp.44.2.102

- Fanaroff, A. A., Korones, S. B., Wright, L. L., Verter, J., Poland, R. L., Bauer, C. R., Tyson, J. E., Phillips, J. B., 3rd, Edwards, W., Lucey, J. F., Catz, C. S., Shankaran, S., & Oh, W. (1998). Incidence, presenting features, risk factors and significance of late onset septicemia in very low birth weight infants. The National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *The Pediatric infectious disease journal*, 17(7), 593–598. <https://doi.org/10.1097/00006454-199807000-00004>
- Faraco, G., Park, L., Anrather, J., & Iadecola, C. (2017). Brain perivascular macrophages: characterization and functional roles in health and disease. *Journal of Molecular Medicine*, 95(11), 1143-1152. doi: 10.1007/s00109-017-1573-x
- Färber, K., & Kettenmann, H. (2006). Functional role of calcium signals for microglial function. *Glia*, 54(7), 656-665. doi: 10.1002/glia.20412
- Feldman, J. L., & Negro, C. A. (2006). Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(3), 232-241. doi: 10.1038/nrn1871
- Fellin, T., Sul, J.-Y. Y., D'Ascenzo, M., Takano, H., Pascual, O., & Haydon, P. G. (2006). Bidirectional astrocyte-neuron communication: the many roles of glutamate and ATP. *Novartis Foundation symposium*, 276, 208. doi: 10.1002/9780470032244.ch16
- Fernández-Arjona, M. D. M. D. M., Grondona, J. M. M., Granados-Durán, P., Fernández-Llebrez, P., & López-Ávalos, M. D. D. (2017). Microglia Morphological Categorization in a Rat Model of Neuroinflammation by Hierarchical Cluster and Principal Components Analysis. *Frontiers in cellular neuroscience*, 11, 235. doi: 10.3389/fncel.2017.00235
- Fleisch, H. (1988). Calcium in Drug Actions. *Calcium in Drug Actions*, 441-466. doi: 10.1007/978-3-642-71806-9_21
- Frith, J. C., Mönkkönen, J., Blackburn, G. M., Russell, R. G., & Rogers, M. J. (1997). Clodronate and liposome-encapsulated clodronate are metabolized to a toxic ATP analog, adenosine 5'-(beta, gamma-dichloromethylene) triphosphate, by mammalian cells in vitro. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 12(9), 1358-1367. doi: 10.1359/jbmr.1997.12.9.1358
- Frøen, J. F., Akre, H., Stray-Pedersen, B., & Saugstad, O. D. (2000). Adverse effects of nicotine and interleukin-1beta on autoresuscitation after apnea in piglets: implications for sudden infant death syndrome. *Pediatrics*, 105(4). doi: 10.1542/peds.105.4.e52
- Frøen, J. F., Amerio, G., Stray-Pedersen, B., & Saugstad, O. D. (2002). Detrimental effects of nicotine and endotoxin in the newborn piglet brain during severe hypoxemia. *Biology of the neonate*, 82(3), 188–196. <https://doi.org/10.1159/000063610>
- Gainetdinov, R. R., Premont, R. T., Bohn, L. M., Lefkowitz, R. J., & Caron, M. G. (2004). Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annual review of neuroscience*, 27, 107-144. doi: 10.1146/annurev.neuro.27.070203.144206
- Galán-Ganga, M., García-Yagüe, Á. J., & Lastres-Becker, I. (2019). Role of MSK1 in the Induction of NF-κB by the Chemokine CX3CL1 in Microglial Cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 39(3), 331-340. doi: 10.1007/s10571-019-00664-w
- Garcia, A. J., Khan, S. A., Kumar, G. K., Prabhakar, N. R., & Ramirez, J.-M. (2011). Hydrogen peroxide differentially affects activity in the pre-Bötzinger complex and hippocampus. *Journal of Neurophysiology*, 106(6), 3045-3055. doi: 10.1152/jn.00550.2010
- Garcia, A. J., Zanella, S., Dashevskiy, T., Khan, S. A., Khuu, M. A., Prabhakar, N. R., & Ramirez, J.-M. (2016). Chronic Intermittent Hypoxia Alters Local Respiratory Circuit Function at the Level of the preBötzinger Complex. *Frontiers in Neuroscience*, 10, 4. doi: 10.3389/fnins.2016.00004

- Gasque, P., Chan, P., Mauger, C., Schouff, M. T., Singhrao, S., Dierich, M. P., Fontaine, M. (1996). Identification and characterization of complement C3 receptors on human astrocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 156(6), 2247-2255.
- Geny, C., Naimi-Sadaoui, S., Belkadi, A., Jeny, R., Kammoun, M., & Peschanski, M. (1995). Microglial chimaerism in human xenografts to the rat brain. *Brain Research Bulletin*, 38(4), 383-391. doi: 10.1016/0361-9230(95)02004-b
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Merad, M. (2010). Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science*, 330(6005), 841-845. doi: 10.1126/science.1194637
- Giniatullin, A. R., & Giniatullin, R. A. (2003). Dual action of hydrogen peroxide on synaptic transmission at the frog neuromuscular junction. *The Journal of physiology*, 552(Pt 1), 283–293. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.050690>
- Giniatullin, R., Sokolova, E., & Nistri, A. (2003). Modulation of P2X3 receptors by Mg²⁺ on rat DRG neurons in culture. *Neuropharmacology*, 44(1), 132–140. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(02\)00338-6](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(02)00338-6)
- Goehler, L. E., Gaykema, R. P., Opitz, N., Reddaway, R., Badr, N., & Lyte, M. (2005). Activation in vagal afferents and central autonomic pathways: early responses to intestinal infection with *Campylobacter jejuni*. *Brain, behavior, and immunity*, 19(4), 334–344. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2004.09.002>
- Gomez-Nicola, D., & Perry, H. V. (2015). Microglial Dynamics and Role in the Healthy and Diseased Brain. *The Neuroscientist*, 21(2), 169-184. doi: 10.1177/1073858414530512
- Gong, T., Yang, Y., Jin, T., Jiang, W., & Zhou, R. (2018). Orchestration of NLRP3 Inflammasome Activation by Ion Fluxes. *Trends in Immunology*, 39(5), 393-406. doi: 10.1016/j.it.2018.01.009
- Gourine, A. V., & Kasparov, S. (2011). Astrocytes as brain interoceptors. *Experimental Physiology*, 96(4), 411-416. doi: 10.1113/expphysiol.2010.053165
- Gourine, A. V., Atkinson, L., Deuchars, J., & Spyer, M. K. (2003). Purinergic Signalling in the Medullary Mechanisms of Respiratory Control in the Rat: Respiratory Neurones Express the P2X2 Receptor Subunit. *The Journal of Physiology*, 552(1), 197-211. doi: 10.1113/jphysiol.2003.045294
- Gourine, A. V., Kasymov, V., Marina, N., Tang, F., Figueiredo, M. F., Lane, S., Kasparov, S. (2010). Astrocytes Control Breathing Through pH-Dependent Release of ATP. *Science*, 329(5991), 571-575. doi: 10.1126/science.1190721
- Gourine, A. V., Llaudet, E., Dale, N., & Spyer, M. K. (2005). Release of ATP in the Ventral Medulla during Hypoxia in Rats: Role in Hypoxic Ventilatory Response. *The Journal of Neuroscience*, 25(5), 1211-1218. doi: 10.1523/jneurosci.3763-04.2005
- Grabert, K., Michoel, T., Karavolos, M. H., Clohisey, S., Baillie, K. J., Stevens, M. P., McColl, B. W. (2016). Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nature Neuroscience*, 19(3), 504-516. doi: 10.1038/nn.4222
- Grace, P. M., Wang, X., Strand, K. A., Baratta, M. V., Zhang, Y., Galer, E. L., Watkins, L. R. (2018). DREADDED microglia in pain: Implications for spinal inflammatory signaling in male rats. *Experimental Neurology*, 304, 125-131. doi: 10.1016/j.expneurol.2018.03.005
- Graeber, M. B., Li, W., & Rodriguez, M. L. (2011). Role of microglia in CNS inflammation. *FEBS Letters*, 585(23), 3798-3805. doi: 10.1016/j.febslet.2011.08.033
- Graff, G. R., & Gozal, D. (1999). Cardiorespiratory responses to interleukin-1beta in adult rats: role of nitric oxide, eicosanoids and glucocorticoids. *Archives of physiology and biochemistry*, 107(2), 97–112. <https://doi.org/10.1076/apab.107.2.97.4344>

- Gray, P. A., Janczewski, W. A., Mellen, N., McCrimmon, D. R., & Feldman, J. L. (2001). Normal breathing requires preBötzing complex neurokinin-1 receptor-expressing neurons. *Nature neuroscience*, 4(9), 927-930. doi: 10.1038/nn0901-927
- Gresham, K., Boyer, B., Mayer, C., Foglyano, R., Martin, R., & Wilson, C. G. (2011). Airway inflammation and central respiratory control: Results from in vivo and in vitro neonatal rat. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 178(3), 414-421. doi: 10.1016/j.resp.2011.05.008
- Guntheroth W. G. (1989). Interleukin-1 as intermediary causing prolonged sleep apnea and SIDS during respiratory infections. *Medical hypotheses*, 28(2), 121–123. [https://doi.org/10.1016/0306-9877\(89\)90025-x](https://doi.org/10.1016/0306-9877(89)90025-x)
- Hagberg, B., Aicardi, J., Dias, K., & Ramos, O. (1983). A progressive syndrome of autism, dementia, ataxia, and loss of purposeful hand use in girls: Rett's syndrome: Report of 35 cases. *Annals of Neurology*, 14(4), 471-479. doi: 10.1002/ana.410140412
- Haji, A., Takeda, R., & Okazaki, M. (2000). Neuropharmacology of control of respiratory rhythm and pattern in mature mammals. *Pharmacology & therapeutics*, 86(3), 277-304. doi: 10.1016/s0163-7258(00)00059-0
- Halliday, G. M., & Stevens, C. H. (2011). Glia: Initiators and progressors of pathology in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 26(1), 6-17. doi: 10.1002/mds.23455
- Hammond, T. R., Dufort, C., Dissing-Olesen, L., Giera, S., Young, A., Wysoker, A., Stevens, B. (2019). Single-Cell RNA Sequencing of Microglia throughout the Mouse Lifespan and in the Injured Brain Reveals Complex Cell-State Changes. *Immunity*, 50(1), 253-271000000. doi: 10.1016/j.immuni.2018.11.004
- Han, Z., Shen, F., He, Y., Degos, V., Camus, M., Maze, M., Su, H. (2014). Activation of α -7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Reduces Ischemic Stroke Injury through Reduction of Pro-Inflammatory Macrophages and Oxidative Stress. *PLoS ONE*, 9(8). doi: 10.1371/journal.pone.0105711
- Hanisch, U.-K., & Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neuroscience*, 10(11), 1387-1394. doi: 10.1038/nn1997
- Haque, M. E., Kim, I.-S. S., Jakaria, M., Akther, M., & Choi, D.-K. K. (2018). Importance of GPCR-Mediated Microglial Activation in Alzheimer's Disease. *Frontiers in cellular neuroscience*, 12, 258. doi: 10.3389/fncel.2018.00258
- Hatori, K., Nagai, A., Heisel, R., Ryu, J. K., & Kim, S. U. (2002). Fractalkine and fractalkine receptors in human neurons and glial cells. *Journal of Neuroscience Research*, 69(3), 418-426. doi: 10.1002/jnr.10304
- Haydon, P. G., & Carmignoto, G. (2006). Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiological reviews*, 86(3), 1009-1031. doi: 10.1152/physrev.00049.2005
- He, F., & Sun, Y. E. (2007). Glial cells more than support cells? *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(4), 661-665. doi: 10.1016/j.biocel.2006.10.022
- He, Y., Taylor, N., Fourgeaud, L., & Bhattacharya, A. (2017). The role of microglial P2X7: modulation of cell death and cytokine release. *Journal of Neuroinflammation*, 14(1), 135. doi: 10.1186/s12974-017-0904-8
- Helmy, A., Guilfoyle, M. R., Carpenter, K. L. H., Pickard, J. D., Menon, D. K., & Hutchinson, P. J. (2015). Recombinant human interleukin-1 receptor antagonist promotes M1 microglia biased cytokines and chemokines following human traumatic brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 36(8), 1434-1448. doi: 10.1177/0271678x15620204
- Henry, C. J., Huang, Y., Wynne, A. M., & Godbout, J. P. (2009). Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1 β and anti-inflammatory IL-10 cytokines. *Brain, behavior, and immunity*, 23(3), 309–317. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.09.002>

- Herlenius, E. (2011). An inflammatory pathway to apnea and autonomic dysregulation. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 178(3), 449-457. doi: 10.1016/j.resp.2011.06.026
- Herlenius, E., & Lagercrantz, H. (1999). Adenosinergic modulation of respiratory neurones in the neonatal rat brainstem in vitro. *The Journal of Physiology*, 518(1), 159-172. doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.0159r.x
- Hilaire, G., & Pásaro, R. (2003). Genesis and Control of the Respiratory Rhythm in Adult Mammals. *Physiology*, 18(1), 23-28. doi: 10.1152/nips.01406.2002
- Hilaire, G., Viemari, J.-C., Coulon, P., Simonneau, M., & Bévençut, M. (2004). Modulation of the respiratory rhythm generator by the pontine noradrenergic A5 and A6 groups in rodents. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 143(2-3), 187-197. doi: 10.1016/j.resp.2004.04.016
- Hines, D. J., Choi, H. B., Hines, R. M., Phillips, A. G., & MacVicar, B. A. (2013). Prevention of LPS-Induced Microglia Activation, Cytokine Production and Sickness Behavior with TLR4 Receptor Interfering Peptides. *PLoS ONE*, 8(3). doi: 10.1371/journal.pone.0060388
- Hocker, A. D., & Huxtable, A. G. (2018). IL-1 receptor activation undermines respiratory motor plasticity after systemic inflammation. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md.: 1985), 125(2), 504–512. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01051.2017>
- Hoek, R. M., Ruuls, S. R., Murphy, C. A., Wright, G. J., Goddard, R., Zurawski, S. M., Sedgwick, J. D. (2000). Down-Regulation of the Macrophage Lineage Through Interaction with OX2 (CD200). *Science*, 290(5497), 1768-1771. doi: 10.1126/science.290.5497.1768
- Hofstetter, A., & Herlenius, E. (2005). Interleukin-1 β depresses hypoxic gasping and autoresuscitation in neonatal DBA/1lacJ mice. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 146(2-3), 135-146. doi: 10.1016/j.resp.2004.11.002
- Hofstetter, C., Boost, K. A., Flondor, M., Basagan-Mogol, E., Betz, C., Homann, M., Muhl, H., Pfeilschifter, J., & Zwissler, B. (2007). Anti-inflammatory effects of sevoflurane and mild hypothermia in endotoxemic rats. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*, 51(7), 893–899. <https://doi.org/10.1111/j.1399-6576.2007.01353.x>
- Horiuchi, M., Smith, L., Maezawa, I., & Jin, L.-W. (2017). CX3CR1 ablation ameliorates motor and respiratory dysfunctions and improves survival of a Rett syndrome mouse model. *Brain, Behavior, and Immunity*, 60, 106-116. doi: 10.1016/j.bbi.2016.02.014
- Hülsmann, S., Oku, Y., Zhang, W., & Richter, D. W. (2000). Metabolic coupling between glia and neurons is necessary for maintaining respiratory activity in transverse medullary slices of neonatal mouse. *The European journal of neuroscience*, 12(3), 856-862. doi: 10.1046/j.1460-9568.2000.00973.x
- Husemann, J., & Silverstein, S. C. (2001). Expression of scavenger receptor class B, type I, by astrocytes and vascular smooth muscle cells in normal adult mouse and human brain and in Alzheimer's disease brain. *The American journal of pathology*, 158(3), 825-832. doi: 10.1016/s0002-9440(10)64030-8
- Hutchins, K. D., Dickson, D. W., Rashbaum, W. K., & Lyman, W. D. (1990). Localization of morphologically distinct microglial populations in the developing human fetal brain: implications for ontogeny. *Developmental Brain Research*, 55(1), 95-102. doi: 10.1016/0165-3806(90)90109-c
- Huxtable, A. G., Zwicker, J. D., Alvares, T. S., Ruangkittisakul, A., Fang, X., Hahn, L. B., Funk, G. D. (2010). Glia Contribute to the Purinergic Modulation of Inspiratory Rhythm-Generating Networks. *The Journal of Neuroscience*, 30(11), 3947-3958. doi: 10.1523/jneurosci.6027-09.2010

- Huxtable, A. G., Zwicker, J. D., Poon, B. Y., Pagliardini, S., Vrouwe, S. Q., Greer, J. J., & Funk, G. D. (2009). Tripartite Purinergic Modulation of Central Respiratory Networks during Perinatal Development: The Influence of ATP, Ectonucleotidases, and ATP Metabolites. *The Journal of Neuroscience*, 29(47), 14713-14725. doi: 10.1523/jneurosci.2660-09.2009
- Jackson, F. R., & Haydon, P. G. (2008). Glial cell regulation of neurotransmission and behavior in *Drosophila*. *Neuron glia biology*, 4(1), 11–17. <https://doi.org/10.1017/S1740925X09000027>
- Ji, K., Miyauchi, J., & Tsirka, S. E. (2013). Microglia: An Active Player in the Regulation of Synaptic Activity. *Neural Plasticity*, 2013, 1-9. doi: 10.1155/2013/627325
- Johnson, S. M., Koshiya, N., & Smith, J. C. (2001). Isolation of the kernel for respiratory rhythm generation in a novel preparation: the pre-Bötzinger complex "island". *Journal of neurophysiology*, 85(4), 1772-1776. doi: 10.1152/jn.2001.85.4.1772
- Johnson, S. M., Randhawa, K. S., Epstein, J. J., Gustafson, E., Hocker, A. D., Huxtable, A. G., Baker, T. L., & Watters, J. J. (2018). Gestational intermittent hypoxia increases susceptibility to neuroinflammation and alters respiratory motor control in neonatal rats. *Respiratory physiology & neurobiology*, 256, 128–142. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2017.11.007>
- Kapuscinski J. (1995). DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotechnic & histochemistry: official publication of the Biological Stain Commission*, 70(5), 220–233. <https://doi.org/10.3109/10520299509108199>
- Kasparov, S. (2011). Glial–neuronal interactions in the central nervous cardiovascular and respiratory control. *Experimental Physiology*, 96(4), 391-392. doi: 10.1113/expphysiol.2010.053116
- Kasymov, V., Larina, O., Castaldo, C., Marina, N., Patrushev, M., Kasparov, S., & Gourine, A. V. (2013). Differential Sensitivity of Brainstem versus Cortical Astrocytes to Changes in pH Reveals Functional Regional Specialization of Astroglia. *The Journal of Neuroscience*, 33(2), 435-441. doi: 10.1523/jneurosci.2813-12.2013
- Kawai, A., Ballantyne, D., Mückenhoff, K., & Scheid, P. (1996). Chemosensitive medullary neurones in the brainstem--spinal cord preparation of the neonatal rat. *The Journal of Physiology*, 492(1), 277-292. doi: 10.1113/jphysiol.1996.sp021308
- Kelley, J. L., Ozment, T. R., Li, C., Schweitzer, J. B., & Williams, D. L. (2014). Scavenger Receptor-A (CD204): A Two-Edged Sword in Health and Disease. *Critical Reviews in Immunology*, 34(3), 241-261. doi: 10.1615/CritRevImmunol.2014010267
- Kenia, P.-P., Julio, L.-H., Polet, C.-H., Benito, O., Benjamín, V.-S., Alberto, M.-V., & Peña-Ortega, F. (2018). Hydrogen peroxide extracellular concentration in the ventrolateral medulla and its increase in response to hypoxia in vitro: possible role of microglia. *Brain Research*, 1692, 87-99. doi: 10.1016/j.brainres.2018.04.032
- Keren-Shaul, H., Spinrad, A., Weiner, A., Matcovitch-Natan, O., Dvir-Szternfeld, R., Ulland, T. K., Amit, I. (2017). A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell*, 169(7), 1276-1499725824. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.018
- Kettenmann, H., & Verkhratsky, A. (2008). Neuroglia: the 150 years after. *Trends in Neurosciences*, 31(12), 653-659. doi: 10.1016/j.tins.2008.09.003
- Kettenmann, H., & Verkhratsky, A. (2011). Neuroglia, living nerve glue. *Fortschr Neurol Psychia*, 79(10), 588-597. doi: 10.1055/s-0031-1281704
- Kettenmann, H., Kirchhoff, F., & Verkhratsky, A. (2013). Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron*, 77(1), 10-18. doi: 10.1016/j.neuron.2012.12.023
- Kiernan, E. A., Smith, S. M. C., Mitchell, G. S., & Watters, J. J. (2016). Mechanisms of microglial activation in models of inflammation and hypoxia: Implications for chronic intermittent hypoxia. *The Journal of Physiology*, 594(6), 1563-1577. doi: 10.1113/jp271502

- Koch, H., Caughie, C., Elsen, F. P., Doi, A., Garcia, A. J., Zanella, S., & Ramirez, J. M. (2015). Prostaglandin E2 differentially modulates the central control of eupnoea, sighs and gasping in mice. *The Journal of Physiology*, 593(1), 305-319. doi: 10.1113/jphysiol.2014.279794
- Koshiya, N., & Smith, J. C. (1999). Neuronal pacemaker for breathing visualized in vitro. *Nature*, 400(6742), 360-363. doi: 10.1038/22540
- Kotecha, S. A., & Schlichter, L. C. (1999). A Kv1.5 to Kv1.3 switch in endogenous hippocampal microglia and a role in proliferation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(24), 10680-10693.
- Krasemann, S., Madore, C., Cialic, R., Baufeld, C., Calcagno, N., El Fatimy, R., Butovsky, O. (2017). The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Immunity*, 47(3), 566-1179415040. doi: 10.1016/j.immuni.2017.08.008
- Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neurosciences*, 19(8), 312-318. doi: 10.1016/0166-2236(96)10049-7
- Ladeby, R., Wirenfeltdt, M., Garcia-Ovejero, D., Fenger, C., Dissing-Olesen, L., Dalmau, I., & Finsen, B. (2005). Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Research Reviews*, 48(2), 196-206. doi: 10.1016/j.brainresrev.2004.12.009
- Lauro, C., Cipriani, R., Catalano, M., Trettel, F., Chece, G., Brusadin, V., Limatola, C. (2010). Adenosine A1 receptors and microglial cells mediate CX3CL1-induced protection of hippocampal neurons against Glu-induced death. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 35(7), 1550-1559. doi: 10.1038/npp.2010.26
- Lawson, L. J., Perry, V. H., Dri, P., & Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, 39(1), 151-170. doi: 10.1016/0306-4522(90)90229-w
- Lehenkari, P. P., Kellinsalmi, M., Näpänkangas, J. P., Ylitalo, K. V., Mönkkönen, J., Rogers, M. J., Hassinen, I. E. (2002). Further insight into mechanism of action of clodronate: inhibition of mitochondrial ADP/ATP translocase by a nonhydrolyzable, adenine-containing metabolite. *Molecular pharmacology*, 61(5), 1255-1262. doi: 10.1124/mol.61.5.1255
- Leng, S., Iwanowycz, S., Saaoud, F., Wang, J., Wang, Y., Sergin, I., Fan, D. (2016). Ursolic acid enhances macrophage autophagy and attenuates atherogenesis. *Journal of Lipid Research*, 57(6), 1006-1016. doi: 10.1194/jlr.M065888
- Li, Y., Liu, L., Liu, D., Woodward, S., Barger, S. W., Mrak, R. E., & Griffin, W. S. (2004). Microglial activation by uptake of fDNA via a scavenger receptor. *Journal of neuroimmunology*, 147(1-2), 50-55. doi: 10.1016/j.jneuroim.2003.10.043
- Lieske, S. P., Thoby-Brisson, M., Telgkamp, P., & Ramirez, J. M. (2000). Reconfiguration of the neural network controlling multiple breathing patterns: eupnea, sighs and gasps [see comment]. *Nature neuroscience*, 3(6), 600-607. doi: 10.1038/75776
- Lilienbaum, A., & Israël, A. (2003). From calcium to NF-kappa B signaling pathways in neurons. *Molecular and cellular biology*, 23(8), 2680-2698. doi: 10.1128/mcb.23.8.2680-2698.2003
- Lin, H., Lee, E., Hestir, K., Leo, C., Huang, M., Bosch, E., Williams, L. T. (2008). Discovery of a Cytokine and Its Receptor by Functional Screening of the Extracellular Proteome. *Science*, 320(5877), 807-811. doi: 10.1126/science.1154370
- Lin, J.-J., Du, Y., Cai, W.-K., Kuang, R., Chang, T., Zhang, Z., Kuang, F. (2015). Toll-like receptor 4 signaling in neurons of trigeminal ganglion contributes to nociception induced by acute pulpitis in rats. *Scientific Reports*, 5(1), 12549. doi: 10.1038/srep12549
- Lindgren, C., & Grögaard, J. (1996). Reflex apnoea response and inflammatory mediators in infants with respiratory tract infection. *Acta paediatrica (Oslo, Norway:1992)*, 85(7), 798-803. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1996.tb14154.x>

- Lioy, D. T., Garg, S. K., Monaghan, C. E., Raber, J., Foust, K. D., Kaspar, B. K., Mandel, G. (2011). A role for glia in the progression of Rett's syndrome. *Nature*, 475(7357), 497-500. doi: 10.1038/nature10214
- Liu, H., Leak, R. K., & Hu, X. (2016). Neurotransmitter receptors on microglia. *BMJ*, 1(2), 52-58. doi: 10.1136/svn-2016-000012
- Liu, X., Wu, Z., Hayashi, Y., & Nakanishi, H. (2012). Age-dependent neuroinflammatory responses and deficits in long-term potentiation in the hippocampus during systemic inflammation. *Neuroscience*, 216, 133–142. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.04.050>
- Liu, Y. Y., Ju, G., & Wong-Riley, M. T. (2001). Distribution and colocalization of neurotransmitters and receptors in the pre-Bötzing complex of rats. *Journal of applied physiology* (Bethesda, MD.: 1985), 91(3), 1387-1395. doi: 10.1152/jappl.2001.91.3.1387
- Lively, S., & Schlichter, L. C. (2018). Microglia Responses to Pro-inflammatory Stimuli (LPS, IFN γ +TNF α) and Reprogramming by Resolving Cytokines (IL-4, IL-10). *Frontiers in cellular neuroscience*, 12, 215. doi: 10.3389/fncel.2018.00215
- Lorea-Hernández, J. J., Morales, T., Rivera-Angulo, A. J., Alcantara-Gonzalez, D., & Peña-Ortega, F. (2016). Microglia modulate respiratory rhythm generation and autoresuscitation. *Glia*, 64(4), 603-619. doi: 10.1002/glia.22951
- Lorier, A. R., Lipski, J., Housley, G. D., Greer, J. J., & Funk, G. D. (2008). ATP sensitivity of preBötzing complex neurones in neonatal rat in vitro: mechanism underlying a P2 receptor-mediated increase in inspiratory frequency. *The Journal of Physiology*, 586(5), 1429-1446. doi: 10.1113/jphysiol.2007.143024
- Lovering, A. T., Fraigne, J. J., Dunin-Barkowski, W. L., Vidruk, E. H., & Orem, J. M. (2012). Tonic and phasic drive to medullary respiratory neurons during periodic breathing. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 181(3), 286-301. doi: 10.1016/j.resp.2012.03.012
- Luin, E., Giniatullin, R., & Sciancalepore, M. (2011). Effects of H₂O₂ on electrical membrane properties of skeletal myotubes. *Free radical biology & medicine*, 50(2), 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.11.015>
- Luo, X.-G. G., & Chen, S.-D. D. (2012). The changing phenotype of microglia from homeostasis to disease. *Translational neurodegeneration*, 1(1), 9. doi: 10.1186/2047-9158-1-9
- MacFarlane, P. M., Mayer, C. A., & Litvin, D. G. (2016). Microglia modulate brainstem serotonergic expression following neonatal sustained hypoxia exposure: implications for sudden infant death syndrome. *The Journal of Physiology*, 594(11), 3079-3094. doi: 10.1113/jp271845
- Machado, A., Herrera, A. J., Venero, J. L., Santiago, M., de Pablos, R. M., Villarán, R. F., Cano, J. (2011). Inflammatory Animal Model for Parkinson's Disease: The Intranigral Injection of LPS Induced the Inflammatory Process along with the Selective Degeneration of Nigrostriatal Dopaminergic Neurons. *ISRN neurology*, 2011, 476158. doi: 10.5402/2011/476158
- Maezawa, I., & Jin, L.-W. (2010). Rett Syndrome Microglia Damage Dendrites and Synapses by the Elevated Release of Glutamate. *The Journal of Neuroscience*, 30(15), 5346-5356. doi: 10.1523/jneurosci.5966-09.2010
- Maezawa, I., Swanberg, S., Harvey, D., LaSalle, J. M., & Jin, L.-W. (2009). Rett Syndrome Astrocytes Are Abnormal and Spread MeCP2 Deficiency through Gap Junctions. *The Journal of Neuroscience*, 29(16), 5051-5061. doi: 10.1523/jneurosci.0324-09.2009
- Malko, P., Mortadza, S. A., McWilliam, J., & Jiang, L.-H. (2019). TRPM2 Channel in Microglia as a New Player in Neuroinflammation Associated With a Spectrum of Central Nervous System Pathologies. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 239. doi: 10.3389/fphar.2019.00239

- Marchenko, V., Koizumi, H., Mosher, B., Koshiya, N., Tariq, M. F., Bezdudnaya, T. G., Zhang, R., Molkov, Y. I., Rybak, I. A., & Smith, J. C. (2016). Perturbations of Respiratory Rhythm and Pattern by Disrupting Synaptic Inhibition within Pre-Bötzinger and Bötzing Complexes. *eNeuro*, 3(2), ENEURO.0011-16.2016. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0011-16.2016>
- Marrone, M. C., Morabito, A., Giustizieri, M., Chiurchiù, V., Leuti, A., Mattioli, M., Marinelli, S. (2017). TRPV1 channels are critical brain inflammation detectors and neuropathic pain biomarkers in mice. *Nature communications*, 8, 15292. doi: 10.1038/ncomms15292
- Matcovitch-Natan, O., Winter, D. R., Giladi, A., Vargas Aguilar, S., Spinrad, A., Sarrazin, S., Amit, I. (2016). Microglia development follows a stepwise program to regulate brain homeostasis. *Science (New York, N.Y.)*, 353(6301). doi: 10.1126/science.aad8670
- McKay, L. C., & Feldman, J. L. (2008). Unilateral Ablation of Pre-Bötzinger Complex Disrupts Breathing during Sleep but Not Wakefulness. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 178(1), 89-95. doi: 10.1164/rccm.200712-1901OC
- Meucci, O., Fatatis, A., Simen, A. A., & Miller, R. J. (2000). Expression of CX3CR1 chemokine receptors on neurons and their role in neuronal survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(14), 8075-8080. doi: 10.1073/pnas.090017497
- Meucci, O., Fatatis, A., Simen, A. A., & Miller, R. J. (2000). Expression of CX3CR1 chemokine receptors on neurons and their role in neuronal survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(14), 8075–8080. <https://doi.org/10.1073/pnas.090017497>
- Mishima, T., Nagai, T., Yahagi, K., Akther, S., Oe, Y., Monai, H., Hirase, H. (2019). Transcranial direct current stimulation (tDCS) induces adrenergic receptor-dependent microglial morphological changes in mice. *eNeuro*, 6(5), 19. doi: 10.1523/eneuro.0204-19.2019
- Mittelbronn, M. (2014). The M1/M2 immune polarization concept in microglia: a fair transfer? *Neuroimmunology and Neuroinflammation*, 1(1), 6-7. doi: 10.4103/2347-8659.135567
- Mitterauer, B. J. (2011). The gliocentric hypothesis of the pathophysiology of the sudden infant death syndrome (SIDS). *Medical Hypotheses*, 76(4), 482-485. doi: 10.1016/j.mehy.2010.11.026
- Miyamoto, A., Wake, H., Ishikawa, A., Eto, K., Shibata, K., Murakoshi, H., Nabekura, J. (2016). Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. *Nature Communications*, 7(1), 12540. doi: 10.1038/ncomms12540
- Miyamoto, A., Wake, H., Moorhouse, A. J., & Nabekura, J. (2013). Microglia and synapse interactions: fine tuning neural circuits and candidate molecules. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 70. doi: 10.3389/fncel.2013.00070
- Monif, M., Reid, C. A., Powell, K. L., Smart, M. L., & Williams, D. A. (2009). The P2X7 Receptor Drives Microglial Activation and Proliferation: A Trophic Role for P2X7R Pore. *The Journal of Neuroscience*, 29(12), 3781-3791. doi: 10.1523/jneurosci.5512-08.2009
- Morioka, T., & Streit, W. J. (1991). Expression of immunomolecules on microglial cells following neonatal sciatic nerve axotomy. *Journal of Neuroimmunology*, 35(1-3), 21-30. doi: 10.1016/0165-5728(91)90158-4
- Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 958-969. doi: 10.1038/nri2448
- Mulkey, D. K., & Wenker, I. C. (2011). Astrocyte chemoreceptors: mechanisms of H⁺ sensing by astrocytes in the retrotrapezoid nucleus and their possible contribution to respiratory drive. *Experimental Physiology*, 96(4), 400-406. doi: 10.1113/expphysiol.2010.053140

- Murakami, T., Ockinger, J., Yu, J., Byles, V., McColl, A., Hofer, A. M., & Horng, T. (2012). Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(28), 11282-11287. doi: 10.1073/pnas.1117765109
- Murugan, M., Sivakumar, V., Lu, J., Ling, E. A., & Kaur, C. (2011). Expression of N-methyl D-aspartate receptor subunits in amoeboid microglia mediates production of nitric oxide via NF- κ B signaling pathway and oligodendrocyte cell death in hypoxic postnatal rats. *Glia*, 59(4), 521-539. doi: 10.1002/glia.21121
- Nagamoto-Combs, K., & Combs, C. K. (2010). Microglial Phenotype Is Regulated by Activity of the Transcription Factor, NFAT (Nuclear Factor of Activated T Cells). *The Journal of Neuroscience*, 30(28), 9641-9646. doi: 10.1523/jneurosci.0828-10.2010
- Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., Bamberg, E. (2003). Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24), 13940-13945. doi: 10.1073/pnas.1936192100
- Nakajima, K., Honda, S., Tohyama, Y., Imai, Y., Kohsaka, S., & Kurihara, T. (2001). Neurotrophin secretion from cultured microglia. *Journal of Neuroscience Research*, 65(4), 322-331. doi: 10.1002/jnr.1157
- Negro, C. A., Morgado-Valle, C., & Feldman, J. L. (2002). Respiratory Rhythm An Emergent Network Property? *Neuron*, 34(5), 821-830. doi: 10.1016/s0896-6273(02)00712-2
- Negro, C. A., Morgado-Valle, C., Hayes, J. A., Mackay, D. D., Pace, R. W., Crowder, E. A., & Feldman, J. L. (2005). Sodium and Calcium Current-Mediated Pacemaker Neurons and Respiratory Rhythm Generation. *The Journal of Neuroscience*, 25(2), 446-453. doi: 10.1523/jneurosci.2237-04.2005
- Nie, J., Huang, G.-I., Deng, S.-Z., Bao, Y., Liu, Y.-W., Feng, Z.-P., Pan, J. (2017). The purine receptor P2X7R regulates the release of pro-inflammatory cytokines in human craniopharyngioma. *Endocrine-Related Cancer*, 24(6), 287-296. doi: 10.1530/erc-16-0338
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5726), 1314-1318. doi: 10.1126/science.1110647
- North, A. R., & Verkhratsky, A. (2006). Purinergic transmission in the central nervous system. *Pflügers Archiv*, 452(5), 479-485. doi: 10.1007/s00424-006-0060-y
- Northrup, N. A., & Yamamoto, B. K. (2011). Neuroimmune Pharmacology from a Neuroscience Perspective. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 6(1), 10-19. doi: 10.1007/s11481-010-9239-2
- Ohana, L., Newell, E. W., Stanley, E. F., & Schlichter, L. C. (2009). The Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ current (I_{CRAC}) mediates store-operated Ca²⁺ entry in rat microglia. *Channels*, 3(2), 129-139. doi: 10.4161/chan.3.2.8609
- Ohsawa, K., Imai, Y., Sasaki, Y., & Kohsaka, S. (2004). Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *Journal of Neurochemistry*, 88(4), 844-856. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.02213.x
- Okada, Y., Sasaki, T., Oku, Y., Takahashi, N., Seki, M., Ujita, S., Ikegaya, Y. (2012). Preinspiratory calcium rise in putative pre-Bötzing complex astrocytes. *The Journal of Physiology*, 590(19), 4933-4944. doi: 10.1113/jphysiol.2012.231464
- Olsson, A., Kayhan, G., Lagercrantz, A. N. D., & Herlenius, E. (2003). IL-1 β ; Depresses Respiration and Anoxic Survival via a Prostaglandin-Dependent Pathway in Neonatal Rats. *Pediatric Research*, 54(3), 326-331. doi: 10.1203/01.pdr.0000076665.62641.a2
- Orr, A. G., Orr, A. L., Li, X.-J., Gross, R. E., & Traynelis, S. F. (2009). Adenosine A2A receptor mediates microglial process retraction. *Nature Neuroscience*, 12(7), 872-878. doi: 10.1038/nn.2341

- Pabon, M. M., Bachstetter, A. D., Hudson, C. E., Gemma, C., & Bickford, P. C. (2011). CX3CL1 reduces neurotoxicity and microglial activation in a rat model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 8(1), 9. doi: 10.1186/1742-2094-8-9
- Pannell, M., Meier, M., Szulzewsky, F., Matyash, V., Endres, M., Kronenberg, G., Kettenmann, H. (2016). The subpopulation of microglia expressing functional muscarinic acetylcholine receptors expands in stroke and Alzheimer's disease. *Brain Structure and Function*, 221(2), 1157-1172. doi: 10.1007/s00429-014-0962-y
- Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Gross, C. T. (2011). Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development. *Science*, 333(6048), 1456-1458. doi: 10.1126/science.1202529
- Pardo-Peña, K., Lorea-Hernández, J. J., Camacho-Hernández, N. P., Ordaz, B., Villasana-Salazar, B., Morales-Villagrán, A., & Peña-Ortega, F. (2018). Hydrogen peroxide extracellular concentration in the ventrolateral medulla and its increase in response to hypoxia in vitro: Possible role of microglia. *Brain research*, 1692, 87–99. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.04.032>
- Parkhurst, C. N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J. N., Yates, J. R., Lafaille, J. J., Gan, W.-B. (2013). Microglia Promote Learning-Dependent Synapse Formation through Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Cell*, 155(7), 1596-1609. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.030
- Parpura, V., & Verkhratsky, A. (2012). Neuroglia at the Crossroads of Homeostasis, Metabolism and Signalling: Evolution of the Concept. *ASN Neuro*, 4(4). doi: 10.1042/an20120019
- Pascual, O., Achour, S., Rostaing, P., Triller, A., & Bessis, A. (2012). Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(4). doi: 10.1073/pnas.1111098109
- Pasquale, E., Monteau, R., & Hilaire, G. (1994). Endogenous serotonin modulates the fetal respiratory rhythm: an in vitro study in the rat. *Developmental Brain Research*, 80(1-2), 222-232. doi: 10.1016/0165-3806(94)90107-4
- Paton, J. (2018). Appeasing the Carotid Body After Chronic Intermittent Hypoxia. *Hypertension*, 68(2), 315-317. doi: 10.1161/hypertensionaha.116.07377
- Peña, F. (2009). Neuronal network properties underlying the generation of gasping. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 36(12), 1218-1228. doi: 10.1111/j.1440-1681.2009.05301.x
- Peña, F., & Aguilera, M.-A. (2007). Effects of riluzole and flufenamic acid on eupnea and gasping of neonatal mice in vivo. *Neuroscience Letters*, 415(3), 288-293. doi: 10.1016/j.neulet.2007.01.032
- Peña, F., & García, O. (2006). Breathing generation and potential pharmacotherapeutic approaches to central respiratory disorders. *Current medicinal chemistry*, 13(22), 2681-2693. doi: 10.2174/092986706778201602
- Peña, F., & Ramirez, J.-M. (2002). Endogenous Activation of Serotonin-2A Receptors Is Required for Respiratory Rhythm Generation In Vitro. *Journal of Neuroscience*, 22(24), 11055-11064. doi: 10.1523/jneurosci.22-24-11055.2002
- Peña, F., & Ramirez, J.-M. (2004). Substance P-Mediated Modulation of Pacemaker Properties in the Mammalian Respiratory Network. *The Journal of Neuroscience*, 24(34), 7549-7556. doi: 10.1523/jneurosci.1871-04.2004
- Peña-Ortega, F. (2012). Tonic Neuromodulation of the Inspiratory Rhythm Generator. *Frontiers in Physiology*, 3, 253. doi: 10.3389/fphys.2012.00253
- Peña-Ortega, F. (2017). Pharmacological Tools to Activate Microglia and their Possible use to Study Neural Network Pathophysiology. *Current neuropharmacology*, 15(4), 595-619. doi: 10.2174/1570159x14666160928151546

- Picardo, M. D., Weragalaarachchi, K. T. H., Akins, V. T., & Negro, C. A. (2013). Physiological and morphological properties of Dbx1-derived respiratory neurons in the pre-Bötzinger complex of neonatal mice. *The Journal of Physiology*, 591(10), 2687-2703. doi: 10.1113/jphysiol.2012.250118
- Pocock, J. M., & Kettenmann, H. (2007). Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends in Neurosciences*, 30(10), 527-535. doi: 10.1016/j.tins.2007.07.007
- Polazzi, E., & Contestabile, A. (2002). Reciprocal interactions between microglia and neurons: from survival to neuropathology. *Reviews in the neurosciences*, 13(3), 221-242. doi: 10.1515/revneuro.2002.13.3.221
- Polet, C.-H., Julio, L.-H., & Peña-Ortega, F. (2018). Microglial modulators reduce respiratory rhythm long-term facilitation in vitro. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 265, 9-18. doi: 10.1016/j.resp.2018.07.012
- Ponomarev, E. D., Shriver, L. P., Maresz, K., & Dittel, B. N. (2005). Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity. *Journal of Neuroscience Research*, 81(3), 374-389. doi: 10.1002/jnr.20488
- Prandota J. (2004). Possible pathomechanisms of sudden infant death syndrome: key role of chronic hypoxia, infection/inflammation states, cytokine irregularities, and metabolic trauma in genetically predisposed infants. *American journal of therapeutics*, 11(6), 517–546. <https://doi.org/10.1097/01.mjt.0000140648.30948.bd>
- Ptak, K., Yamanishi, T., Aungst, J., Milescu, L. S., Zhang, R., Richerson, G. B., & Smith, J. C. (2009). Raphé 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(12), 3720-3737. doi: 10.1523/jneurosci.5271-08.2009
- Putney, J. W. (2009). Capacitative calcium entry: from concept to molecules. *Immunological reviews*, 231(1), 10-22. doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00810.x
- Pyatin, V. F., & Miroshnichenko, I. V. (2001). Effects of Nitric Oxide on Respiratory Activity in Bulbospinal Preparation From Rat Fetus. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 132(2), 723-726. doi: 10.1023/a:1013009323839
- Raghuraman, R., Karthikeyan, A., Wei, W., Dheen, T. S., & Sajikumar, S. (2019). Activation Of Microglia In Acute Hippocampal Slices Affects Activity-Dependent Long-Term Potentiation And Synaptic Tagging And Capture In Area CA1. *Neurobiology of Learning and Memory*, 163, 107039. doi: 10.1016/j.nlm.2019.107039
- Raivich, G., Bohatschek, M., Kloss, C. U., Werner, A., Jones, L. L., & Kreutzberg, G. W. (1999). Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain research. Brain research reviews*, 30(1), 77-105. doi: 10.1016/s0165-0173(99)00007-7
- Ramírez, A. I., Rojas, B., de Hoz, R., Salazar, J. J., Gallego, B. I., Triviño, A. (2015). *Microglia, inflammation, and glaucoma. Glaucoma; SM Group Open Access eBooks: Dover, DE, USA, 1-16*
- Ramirez, J. M., Schwarzacher, S. W., Pierrefiche, O., Olivera, B. M., & Richter, D. W. (1998). Selective lesioning of the cat pre-Bötzinger complex in vivo eliminates breathing but not gasping. *The Journal of Physiology*, 507(3), 895-907. doi: 10.1111/j.1469-7793.1998.895bs.x
- Ramirez, J.-M., & Viemari, J.-C. (2005). Determinants of inspiratory activity. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 147(2-3), 145-157. doi: 10.1016/j.resp.2005.05.003
- Ramírez-Jarquín, J. O., Lara-Hernández, S., López-Guerrero, J. J., Aguilera, M. A., Rivera-Angulo, A. J., Sampieri, A., Peña-Ortega, F. (2012). Somatostatin modulates generation of inspiratory rhythms and determines asphyxia survival. *Peptides*, 34(2), 360-372. doi: 10.1016/j.peptides.2012.02.011
- Ransohoff, R. M. (2016). A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nature Neuroscience*, 19(8), 987-991. doi: 10.1038/nn.4338

- Rappert, A., Biber, K., Nolte, C., Lipp, M., Schubel, A., Lu, B., Kettenmann, H. (2002). Secondary Lymphoid Tissue Chemokine (CCL21) Activates CXCR3 to Trigger a Cl⁻ Current and Chemotaxis in Murine Microglia. *The Journal of Immunology*, 168(7), 3221-3226. doi: 10.4049/jimmunol.168.7.3221
- Raza, M. W., & Blackwell, C. C. (1999). Sudden infant death syndrome, virus infections and cytokines. *FEMS immunology and medical microbiology*, 25(1-2), 85–96. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1999.tb01330.x>
- Revill, A. L., Vann, N. C., Akins, V. T., Kottick, A., Gray, P. A., Negro, C. A., & Funk, G. D. (2015). Dbx1 precursor cells are a source of inspiratory XII premotoneurons. *eLife*, 4. doi: 10.7554/eLife.12301
- Rezaie, P., & Male, D. (1999). Colonisation of the developing human brain and spinal cord by microglia: a review. *Microscopy research and technique*, 45(6), 359-382. doi: 10.1002/(sici)1097-0029(19990615)45:6<359::aid-jemt4>3.0.co;2-d
- Richter, D. W., Schmidt-Garcon, P., Pierrefiche, O., Bischoff, A. M., & Lalley, P. M. (1999). Neurotransmitters and neuromodulators controlling the hypoxic respiratory response in anaesthetized cats. *The Journal of Physiology*, 514(2), 567-578. doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.567ae.x
- Rietschel, E. T., Kirikae, T., Schade, U. F., Mamat, U., Schmidt, G., Loppnow, H., Brade, H. (1994). Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *The FASEB Journal*, 8(2), 217-225. doi: 10.1096/fasebj.8.2.8119492
- Rivera-Angulo, A. J., & Peña-Ortega, F. (2014). Isocitrate supplementation promotes breathing generation, gasping, and autoresuscitation in neonatal mice. *Journal of Neuroscience Research*, 92(3), 375-388. doi: 10.1002/jnr.23330
- Rodgers, K. M., Hutchinson, M. R., Northcutt, A., Maier, S. F., Watkins, L. R., & Barth, D. S. (2009). The cortical innate immune response increases local neuronal excitability leading to seizures. *Brain*, 132(9), 2478-2486. doi: 10.1093/brain/awp177
- Rojas, J., Arán-Sekul, T., Cortés, E., Jaldín, R., Ordenes, K., Orrego, P., Catalán, A. (2017). Phospholipase D from *Loxosceles laeta* Spider Venom Induces IL-6, IL-8, CXCL1/GRO- α , and CCL2/MCP-1 Production in Human Skin Fibroblasts and Stimulates Monocytes Migration. *Toxins*, 9(4), 125. doi: 10.3390/toxins9040125
- Rooijen, N., & Sanders, A. (1994). Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *Journal of Immunological Methods*, 174(1-2), 83-93. doi: 10.1016/0022-1759(94)90012-4
- Rubio, M. E., & Soto, F. (2001). Distinct Localization of P2X Receptors at Excitatory Postsynaptic Specializations. *Journal of Neuroscience*, 21(2), 641-653. doi: 10.1523/jneurosci.21-02-00641.2001
- Rupalla, K., Allegrini, P. R., Sauer, D., & Wiessner, C. (1998). Time course of microglia activation and apoptosis in various brain regions after permanent focal cerebral ischemia in mice. *Acta Neuropathologica*, 96(2), 172-178. doi: 10.1007/s004010050878
- Saijo, K., Crotti, A., & Glass, C. K. (2013). Regulation of microglia activation and deactivation by nuclear receptors. *Glia*, 61(1), 104-111. doi: 10.1002/glia.22423
- Sasaki, T., Beppu, K., Tanaka, K. F., Fukazawa, Y., Shigemoto, R., & Matsui, K. (2012). Application of an optogenetic byway for perturbing neuronal activity via glial photostimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(50), 20720-20725. doi: 10.1073/pnas.1213458109
- Sawada, M. (2012). Strategies of myelin regeneration with optogenetically controlled glial cells. *Rinsho Shinkeigaku*, 52(11), 1357-1359. doi: 10.5692/clinicalneuro.52.1357
- Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama, R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., Stevens, B. (2012). Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron*, 74(4), 691-705. doi: 10.1016/j.neuron.2012.03.026

- Schiltz, J. C., & Sawchenko, P. E. (2003). Signaling the brain in systemic inflammation: the role of perivascular cells. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 8, 9. doi: 10.2741/1211
- Schmidt, C., Bellingham, M. C., & Richter, D. W. (1995). Adenosinergic modulation of respiratory neurones and hypoxic responses in the anaesthetized cat. *The Journal of Physiology*, 483(3), 769-781. doi: 10.1113/jphysiol.1995.sp020621
- Schnell, C., Fresemann, J., & Hülsmann, S. (2011). Determinants of functional coupling between astrocytes and respiratory neurons in the pre-Bötzinger complex. *PloS one*, 6(10). doi: 10.1371/journal.pone.0026309
- Schnell, C., Negm, M., Driehaus, J., Scheller, A., & Hülsmann, S. (2016). Norepinephrine-induced calcium signaling in astrocytes in the respiratory network of the ventrolateral medulla. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 226, 18-23. doi: 10.1016/j.resp.2015.10.008
- Shao, X. M., & Feldman, J. L. (2005). Cholinergic neurotransmission in the preBötzinger Complex modulates excitability of inspiratory neurons and regulates respiratory rhythm. *Neuroscience*, 130(4), 1069-1081. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.10.028
- Shen, Y., Qin, H., Chen, J., Mou, L., He, Y., Yan, Y., Zhou, Y.-D. (2016). Postnatal activation of TLR4 in astrocytes promotes excitatory synaptogenesis in hippocampal neurons. *Astrocytic TLR4 activation promotes synaptogenesis. The Journal of Cell Biology*, 215(5), 719-734. doi: 10.1083/jcb.201605046
- Sheng, J. G., Mrak, R. E., Jones, R. A., Brewer, M. M., Zhou, X. Q., McGinness, J., Griffin, W. S. (2001). Neuronal DNA damage correlates with overexpression of interleukin-1beta converting enzyme in APPV717F mice. *Neurobiology of aging*, 22(6), 895-902. doi: 10.1016/s0197-4580(01)00298-6
- Smith, J. C., Abdala, A. P., Koizumi, H., Rybak, I. A., & Paton, J. F. (2007). Spatial and functional architecture of the mammalian brain stem respiratory network: a hierarchy of three oscillatory mechanisms. *Journal of neurophysiology*, 98(6), 3370-3387. doi: 10.1152/jn.00985.2007
- Smith, J. C., Butera, R. J., Koshiya, N., Del Negro, C., Wilson, C. G., & Johnson, S. M. (2000). Respiratory rhythm generation in neonatal and adult mammals: the hybrid pacemaker-network model. *Respiration physiology*, 122(2-3), 131-147. doi: 10.1016/s0034-5687(00)00155-9
- Smith, J., Ellenberger, H., Ballanyi, K., Richter, D., & Feldman, J. (1991). Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science*, 254(5032), 726-729. doi: 10.1126/science.1683005
- Sperlágh, B., Heinrich, A., & Csölle, C. (2007). P2 receptor-mediated modulation of neurotransmitter release—an update. *Purinergic Signalling*, 3(4), 269-284. doi: 10.1007/s11302-007-9080-0
- Stellwagen, D., & Malenka, R. C. (2006). Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . *Nature*, 440(7087), 1054-1059. doi: 10.1038/nature04671
- Stevens, E. R., Esguerra, M., Kim, P. M., Newman, E. A., Snyder, S. H., Zahs, K. R., & Miller, R. F. (2003). d-serine and serine racemase are present in the vertebrate retina and contribute to the physiological activation of NMDA receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(11), 6789-6794. doi: 10.1073/pnas.1237052100
- Stokes, J. A., Arbogast, T. E., Moya, E. A., Fu, Z., & Powell, F. L. (2017). Minocycline blocks glial cell activation and ventilatory acclimatization to hypoxia. *Journal of Neurophysiology*, 117(4), 1625-1635. doi: 10.1152/jn.00525.2016
- Stoltenberg, L., Sundar, T., Almaas, R., & Saugstad, O. D. (1994). Changes in apnea and autoresuscitation in piglets after intravenous and intratechal interleukin-1 β injection. *Pediatric Research*, 35(2), 267-267. doi: 10.1203/00006450-199402000-00078

- Stornetta, R. L., Rosin, D. L., Wang, H., Sevigny, C. P., Weston, M. C., & Guyenet, P. G. (2003). A group of glutamatergic interneurons expressing high levels of both neurokinin-1 receptors and somatostatin identifies the region of the pre-Bötzinger complex. *Journal of Comparative Neurology*, 455(4), 499-512. doi: 10.1002/cne.10504
- Suetomi, T., Willeford, A., Brand, C. S., Cho, Y., Ross, R. S., Miyamoto, S., & Brown, J. (2018). Inflammation and NLRP3 Inflammasome Activation Initiated in Response to Pressure Overload by Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II δ Signaling in Cardiomyocytes Are Essential for Adverse Cardiac Remodeling. *Circulation*, 138(22), 2530-2544. doi: 10.1161/circulationaha.118.034621
- Sun, S., Yu, H., Yu, H., Honglin, M., Ni, W., Zhang, Y., Li, H. (2015). Inhibition of the Activation and Recruitment of Microglia-Like Cells Protects Against Neomycin-Induced Ototoxicity. *Molecular Neurobiology*, 51(1), 252-267. doi: 10.1007/s12035-014-8712-y
- Sun, Y., Chauhan, A., Sukumaran, P., Sharma, J., Singh, B. B., & Mishra, B. B. (2014). Inhibition of store-operated calcium entry in microglia by helminth factors: implications for immune suppression in neurocysticercosis. *Journal of Neuroinflammation*, 11(1), 210. doi: 10.1186/s12974-014-0210-7
- Suzuki, F., Nanki, T., Imai, T., Kikuchi, H., Hirohata, S., Kohsaka, H., & Miyasaka, N. (2005). Inhibition of CX3CL1 (Fractalkine) Improves Experimental Autoimmune Myositis in SJL/J Mice. *The Journal of Immunology*, 175(10), 6987-6996. doi: 10.4049/jimmunol.175.10.6987
- Swindle, E. J., Hunt, J. A., & Coleman, J. W. (2002). A Comparison of Reactive Oxygen Species Generation by Rat Peritoneal Macrophages and Mast Cells Using the Highly Sensitive Real-Time Chemiluminescent Probe Pholasin: Inhibition of Antigen-Induced Mast Cell Degranulation by Macrophage-Derived Hydrogen Peroxide. *The Journal of Immunology*, 169(10), 5866-5873. doi: 10.4049/jimmunol.169.10.5866
- Tan, W., Janczewski, W. A., Yang, P., Shao, X. M., Callaway, E. M., & Feldman, J. L. (2008). Silencing preBötzinger complex somatostatin-expressing neurons induces persistent apnea in awake rat. *Nature neuroscience*, 11(5), 538-540. doi: 10.1038/nn.2104
- Tanaka, K. F., Matsui, K., Sasaki, T., Sano, H., Sugio, S., Fan, K., Yamanaka, A. (2012). Expanding the Repertoire of Optogenetically Targeted Cells with an Enhanced Gene Expression System. *Cell Reports*, 2(2), 397-406. doi: 10.1016/j.celrep.2012.06.011
- Taylor, D. L., Diemel, L. T., & Pocock, J. M. (2003). Activation of Microglial Group III Metabotropic Glutamate Receptors Protects Neurons against Microglial Neurotoxicity. *Journal of Neuroscience*, 23(6), 2150-2160. doi: 10.1523/jneurosci.23-06-02150.2003
- Taylor, D. L., Jones, F., Kubota, E. S. F., & Pocock, J. M. (2005). Stimulation of Microglial Metabotropic Glutamate Receptor mGlu2 Triggers Tumor Necrosis Factor α -Induced Neurotoxicity in Concert with Microglial-Derived Fas Ligand. *The Journal of Neuroscience*, 25(11), 2952-2964. doi: 10.1523/jneurosci.4456-04.2005
- Thatcher, J. D. (2010). The Inositol Trisphosphate (IP₃) Signal Transduction Pathway. *Sci. Signal.*, 3(119). doi: 10.1126/scisignal.3119tr3
- Thoby-Brisson, M., & Ramirez, J. M. (2001). Identification of two types of inspiratory pacemaker neurons in the isolated respiratory neural network of mice. *Journal of neurophysiology*, 86(1), 104-112. doi: 10.1152/jn.2001.86.1.104
- Thoby-Brisson, M., Telgkamp, P., & Ramirez, J. M. (2000). The role of the hyperpolarization-activated current in modulating rhythmic activity in the isolated respiratory network of mice. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(8), 2994-3005.

- Tremblay, M.-È., Lowery, R. L., & Majewska, A. K. (2010). Microglial Interactions with Synapses Are Modulated by Visual Experience. *PLoS Biology*, 8(11). doi: 10.1371/journal.pbio.1000527
- Tryba, A. K., Peña, F., & Ramirez, J.-M. (2003). Stabilization of Bursting in Respiratory Pacemaker Neurons. *Journal of Neuroscience*, 23(8), 3538-3546. doi: 10.1523/jneurosci.23-08-03538.2003
- Tryba, A. K., Peña, F., Lieske, S. P., Viemari, J.-C., Thoby-Brisson, M., & Ramirez, J.-M. (2008). Differential Modulation of Neural Network and Pacemaker Activity Underlying Eupnea and Sigh-Breathing Activities. *Journal of Neurophysiology*, 99(5), 2114-2125. doi: 10.1152/jn.01192.2007
- Vadeboncoeur, N., Segura, M., Al-Numani, D., Vanier, G., & Gottschalk, M. (2003). Pro-inflammatory cytokine and chemokine release by human brain microvascular endothelial cells stimulated by *Streptococcus suis* serotype 2. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 35(1), 49-58. doi: 10.1111/j.1574-695X.2003.tb00648.x
- Vege, A., Rognum, T. O., & Opdal, S. H. (1998). SIDS--changes in the epidemiological pattern in eastern Norway 1984-1996. *Forensic science international*, 93(2-3), 155–166. [https://doi.org/10.1016/s0379-0738\(98\)00048-6](https://doi.org/10.1016/s0379-0738(98)00048-6)
- Viemari, J.-C. (2008). Noradrenergic modulation of the respiratory neural network. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 164(1-2), 123-130. doi: 10.1016/j.resp.2008.06.016
- Viemari, J.-C., Roux, J.-C., Tryba, A. K., Saywell, V., Burnet, H., Peña, F., Hilaire, G. (2005). *Mecp2* Deficiency Disrupts Norepinephrine and Respiratory Systems in Mice. *The Journal of Neuroscience*, 25(50), 11521-11530. doi: 10.1523/jneurosci.4373-05.2005
- Wake, H., Moorhouse, A. J., Jinno, S., Kohsaka, S., & Nabekura, J. (2009). Resting Microglia Directly Monitor the Functional State of Synapses In Vivo and Determine the Fate of Ischemic Terminals. *The Journal of Neuroscience*, 29(13), 3974-3980. doi: 10.1523/jneurosci.4363-08.2009
- Wake, H., Moorhouse, A. J., Miyamoto, A., & Nabekura, J. (2013). Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. *Trends in Neurosciences*, 36(4), 209-217. doi: 10.1016/j.tins.2012.11.007
- Wang, A., Yu, A., Lau, L., Lee, C., Wu, L., Zhu, X. A., & Tso, M. (2005). Minocycline inhibits LPS-induced retinal microglia activation. *Neurochemistry International*, 47(1-2), 152-158. doi: 10.1016/j.neuint.2005.04.018
- Wang, X., Wang, B. R., Duan, X. L., Zhang, P., Ding, Y. Q., Jia, Y., Jiao, X. Y., & Ju, G. (2002). Strong expression of interleukin-1 receptor type I in the rat carotid body. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 50(12), 1677–1684. <https://doi.org/10.1177/002215540205001213>
- Wang, Y.-L., Han, Q.-Q., Gong, W.-Q., Pan, D.-H., Wang, L.-Z., Hu, W., Liu, Q. (2018). Microglial activation mediates chronic mild stress-induced depressive- and anxiety-like behavior in adult rats. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 21. doi: 10.1186/s12974-018-1054-3
- Weaver, K. F., Stokes, J. V., Gunnoe, S. A., Follows, J. S., Shafer, L., Ammari, M. G., Pinchuk, L. M. (2014). Effect of liposomal clodronate-dependent depletion of professional antigen presenting cells on numbers and phenotype of canine cd4+cd25+foxp3+ regulatory t cells. *Journal of veterinary medicine and research*, 1(1).
- Weinhard, L., di Bartolomei, G., Bolasco, G., Machado, P., Schieber, N. L., Neniskyte, U., Gross, C. T. (2018). Microglia remodel synapses by presynaptic trogocytosis and spine head filopodia induction. *Nature Communications*, 9(1), 1228. doi: 10.1038/s41467-018-03566-5
- Wenninger, J. M., Pan, L. G., Klum, L., Leekley, T., Bastastic, J., Hodges, M. R., Forster, H. V. (2004). Large lesions in the pre-Bötzinger complex area eliminate eupneic respiratory rhythm in awake goats. *Journal of Applied Physiology*, 97(5), 1629-1636. doi: 10.1152/jappphysiol.00953.2003

- Wes, P. D., Holtman, I. R., Boddeke, E. W., Möller, T., & Eggen, B. J. (2016). Next generation transcriptomics and genomics elucidate biological complexity of microglia in health and disease. *Glia*, 64(2), 197-213. doi: 10.1002/glia.22866
- Wilken, B., Ramirez, J. M., Hanefeld, F., & Richter, D. W. (2000). Aminophylline modulation of the mouse respiratory network changes during postnatal maturation. *Journal of applied physiology (Bethesda, MD.: 1985)*, 89(5), 2015-2022. doi: 10.1152/jappl.2000.89.5.2015
- Winkler, I. G., Sims, N. A., Pettit, A. R., Barbier, V., Nowlan, B., Helwani, F., Lévesque, J.-P. (2010). Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood*, 116(23), 4815-4828. doi: 10.1182/blood-2009-11-253534
- Wirenfeldt, M., Babcock, A., Ladeby, R., Lambertsen, K., Dagnaes-Hansen, F., Leslie, R., Finsen, B. (2005). Reactive microgliosis engages distinct responses by microglial subpopulations after minor central nervous system injury. *Journal of Neuroscience Research*, 82(4), 507-514. doi: 10.1002/jnr.20659
- Witts, E. C., Panetta, K. M., & Miles, G. B. (2012). Glial-derived adenosine modulates spinal motor networks in mice. *Journal of Neurophysiology*, 107(7), 1925-1934. doi: 10.1152/jn.00513.2011
- Wong, W. T., Wang, M., & Li, W. (2011). Regulation of microglia by ionotropic glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *Neuron Glia Biology*, 7(1), 41-46. doi: 10.1017/s1740925x11000123
- Wong-Riley, M., & Liu, Q. (2005). Neurochemical development of brain stem nuclei involved in the control of respiration. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 149(1-3), 83-98. doi: 10.1016/j.resp.2005.01.011
- Xu, J., Wang, Y., Hua, X., Xu, J., Tian, Z., Jin, H., Huang, C. (2016). Inhibition of PHLPP2/cyclin D1 protein translation contributes to the tumor suppressive effect of NFκB2 (p100). *Oncotarget*, 7(23), 34112-34130. doi: 10.18632/oncotarget.8746
- Xu, S. Z., & Beech, D. J. (2001). TrpC1 is a membrane-spanning subunit of store-operated Ca(2+) channels in native vascular smooth muscle cells. *Circulation research*, 88(1), 84-87. doi: 10.1161/01.res.88.1.84
- Xue, J., Schmidt, S. V., Sander, J., Draffehn, A., Krebs, W., Quester, I., Schultze, J. L. (2014). Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation. *Immunity*, 40(2), 274-288. doi: 10.1016/j.immuni.2014.01.006
- Yabuuchi, K., Minami, M., Katsumata, S., & Satoh, M. (1994). Localization of type I interleukin-1 receptor mRNA in the rat brain. *Brain research. Molecular brain research*, 27(1), 27-36. [https://doi.org/10.1016/0169-328x\(94\)90180-5](https://doi.org/10.1016/0169-328x(94)90180-5)
- Yang, Q., Wang, Y., Feng, J., Cao, J., & Chen, B. (2013). Intermittent hypoxia from obstructive sleep apnea may cause neuronal impairment and dysfunction in central nervous system: the potential roles played by microglia. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 9, 1077-1086. <https://doi.org/10.2147/NDT.S49868>
- Yao, X., Dong, G., Zhu, Y., Yan, F., Zhang, H., Ma, Q., Si, C. (2019). Leukadherin-1-Mediated Activation of CD11b Inhibits LPS-Induced Pro-inflammatory Response in Macrophages and Protects Mice Against Endotoxic Shock by Blocking LPS-TLR4 Interaction. *Frontiers in Immunology*, 10, 215. doi: 10.3389/fimmu.2019.00215
- Yeh, S.-Y., Huang, W.-H., Wang, W., Ward, C. S., Chao, E. S., Wu, Z., Zoghbi, H. Y. (2017). Respiratory Network Stability and Modulatory Response to Substance P Require Nalcn. *Neuron*, 94(2), 294-3030000. doi: 10.1016/j.neuron.2017.03.024
- Yona, S., Kim, K.-W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Jung, S. (2013). Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity*, 38(1), 79-91. doi: 10.1016/j.immuni.2012.12.001
- Yoon, S. Y., Patel, D., & Dougherty, P. M. (2012). Minocycline blocks lipopolysaccharide induced hyperalgesia by suppression of microglia but not astrocytes. *Neuroscience*, 221, 214-224. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.06.024

- Yu, H., Liu, X., & Zhong, Y. (2017). The Effect of Osteopontin on Microglia. *BioMed Research International*, 2017, 1-6. doi: 10.1155/2017/1879437
- Zavala-Tecuapetla, C., Aguilera, M. A., Lopez-Guerrero, J. J., González-Marín, M. C., & Peña, F. (2008). Calcium-activated potassium currents differentially modulate respiratory rhythm generation. *European Journal of Neuroscience*, 27(11), 2871-2884. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06214.x
- Zeng, Q., Jin, C., Ao, L., Cleveland, J. C., Song, R., Xu, D., Meng, X. (2012). Cross-Talk Between the Toll-Like Receptor 4 and Notch1 Pathways Augments the Inflammatory Response in the Interstitial Cells of Stenotic Human Aortic Valves. *Circulation*, 126(11_suppl_1). doi: 10.1161/circulationaha.111.083675
- Zhang, L., McLarnon, J. G., Goghari, V., Lee, Y., Kim, S. U., & Krieger, C. (1998). Cholinergic agonists increase intracellular Ca²⁺ in cultured human microglia. *Neuroscience Letters*, 255(1), 33-36. doi: 10.1016/s0304-3940(98)00706-x
- Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S. A., Bennett, M. L., Scholze, A. R., O'Keefe, S., Wu, J. Q. (2014). An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *The Journal of neuroscience +: the official journal of the Society for Neuroscience*, 34(36), 11929-11947. doi: 10.1523/jneurosci.1860-14.2014
- Zwicker, J. D., Rajani, V., Hahn, L. B., & Funk, G. D. (2011). Purinergic modulation of preBötzinger complex inspiratory rhythm in rodents: the interaction between ATP and adenosine. *The Journal of Physiology*, 589(18), 4583-4600. doi: 10.1113/jphysiol.2011.210930

Anexos.

Artículo requisito de titulación.



Interleukin 1-beta but not the interleukin-1 receptor antagonist modulates inspiratory rhythm generation *in vitro*



Lorea-Hernández Jonathan Julio¹, Camacho-Hernández Neira Polet, Peña-Ortega Fernando*

Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Qro, 76230, México

ARTICLE INFO

Keywords:
preBötzinger complex
Inflammation
Cytokines
Interleukin 1-beta
Neuromodulation.

ABSTRACT

Interleukin 1-beta (IL-1 β) is a cytokine that modulates breathing when applied systemically or directly into the brain. IL-1 β is expressed, along with its receptors, in IL-1 β -sensitive respiratory-related circuits, which likely include the inspiratory rhythm generator (the preBötzinger complex, preBötC). Thus, considering that IL-1 β might directly modulate preBötC function, we tested whether IL-1 β and its endogenous antagonist IL1Ra modulate inspiratory rhythm generation in the brainstem slice preparation containing the preBötC. We found that IL-1 β reduces, in a concentration-dependent manner, the amplitude of the fictive inspiratory rhythm generated by the preBötC, which is prevented by IL1Ra. Only a negligible effect on the rhythm frequency was observed at one of the concentrations tested (10 ng/mL). In sum, these findings indicate that IL-1 β modulates respiratory rhythm generation. In contrast, IL1Ra did not produce a major effect but slightly increased burst amplitude regularity of the fictive respiratory rhythm. Our findings show that IL-1 β modulates breathing by directly modulating the inspiratory rhythm generation. This modulation could contribute to the respiratory response to inflammation in health and disease.

1. Introduction

Different proinflammatory mediators modulate breathing [1–10]. One of them is the cytokine interleukin 1-beta (IL-1 β) [7,9,10], which is expressed, along with its receptors, in several brainstem respiratory-related circuits [7,11–13], likely including the inspiratory rhythm generator (the preBötzinger complex, preBötC) [12,14]. Moreover, different respiratory-related neurons respond to IL-1 β application [11,12,15] and produce a change in tidal volume and respiratory frequency [1,3,15]; the latter suggesting that IL-1 β modulates rhythm generation. Since the inspiratory rhythm generation by the preBötC is sensitive to proinflammatory modulation [2,4,8] and IL-1 β modulates synchronized neural network activity [16,17], we decided to test whether IL-1 β and its endogenous antagonist IL1Ra [18–21] modulate preBötC activity in a brainstem slice preparation. We found that IL-1 β reduces the amplitude of the inspiratory rhythm in a concentration-dependent manner and has a negligible effect on rhythm frequency at only one concentration. This modulation is prevented by IL1Ra, which did not produce a major effect by itself.

2. Experimental procedures

2.1. Ethics statement

The Bioethics Committee of the Institute of Neurobiology at Universidad Nacional Autónoma de México approved all experimental procedures, which were carried out in accordance with the guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook (NIH, Bethesda, MD, USA).

2.2. Brainstem slice preparation

Details of the slice preparation have been previously reported [22,23]. Briefly, 6- to 8-day-old male or female CD-1 mice were anesthetized and decapitated, and brainstems were removed and placed in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (ACSF) bubbled with carbogen (95 % O₂ and 5% CO₂). The ACSF (pH 7.4) contained (in mM): 119 NaCl, 3 KCl, 1.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 25 NaHCO₃, and 30 D-glucose. Brainstems were mounted on a vibratome (The Vibratome Company, St. Louis, MO) and serially sliced until the rostral boundary of the preBötC was intuited

* Corresponding author at: Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Boulevard Juriquilla 3001, CP 76230, Juriquilla, Querétaro, QRO, México.

E-mail address: jfpena@unam.mx (F. Peña-Ortega).

¹ Enrolled in Posgrado en Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado, Edificio D, 1° piso. Circuito de Posgrado, Ciudad Universitaria, Coyoacán, C.P. 04510, CDMX, México.

<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.134934>

Received 31 January 2020; Received in revised form 24 March 2020; Accepted 25 March 2020

Available online 04 April 2020

0304-3940/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

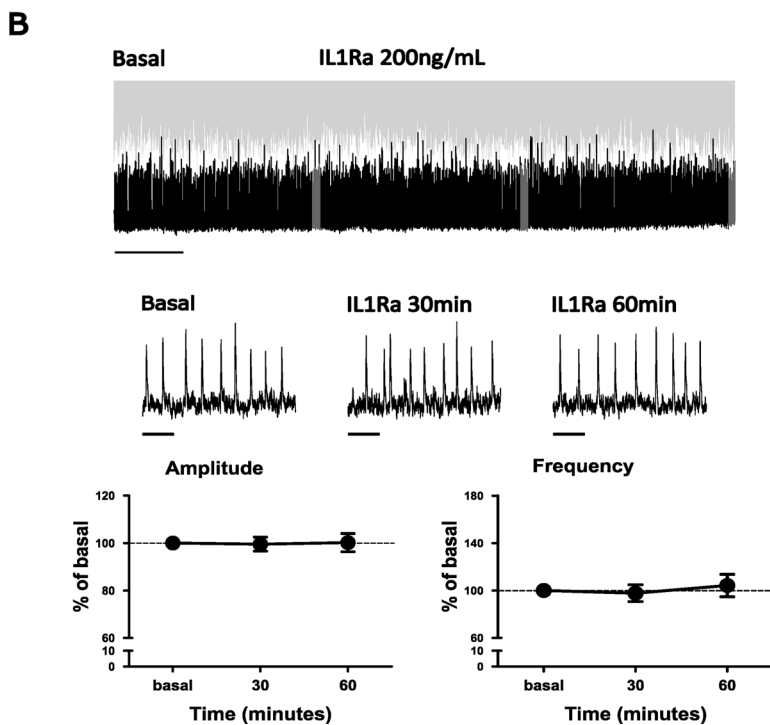
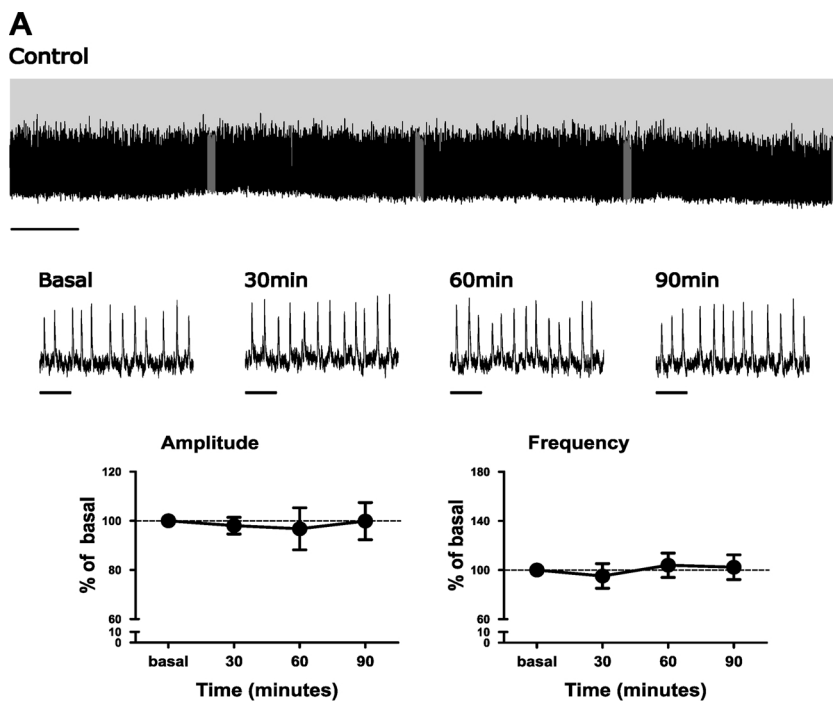


Fig. 1. Stable long-lasting VRG recordings and lack of modulation by IL1Ra. (A) Upper trace shows the time-compacted VRG integrated recording (black) in an untreated slice (scale bar corresponds to 10 min). Above the trace, a complementary shadow (light gray) was drawn to show the stability of the inspiratory burst amplitude in the untreated slice (this complementary shadow was inserted in the rest of the compacted traces). Dark gray rectangles delimit the periods of the expanded traces shown in the middle (scale bar corresponds to 10 s). At the bottom, the time-course quantifications (as % of basal) of the inspiratory burst amplitude (left) and frequency (right) are shown. (B) Upper trace shows the time-compacted VRG integrated activity (black) in a slice before and after IL1Ra application (scale bar corresponds to 10 min). Above the trace, the complementary shadow (light gray) of the control trace from panel A was inserted. Dark gray rectangles delimit the periods of the expanded traces shown in the middle (scale bar corresponds to 10 s). At the bottom, the time-course quantifications (as % of basal) of the inspiratory burst amplitude (left) and frequency (right) are shown.

relative to neuronal landmarks such as the presence of the nucleus ambiguus, the disappearance of the facial nucleus and the appearance of the inferior olive and the hypoglossal nucleus. A single slice (700 μ m thick) per animal was obtained and transferred into a perfusion chamber. Each slice was perfused by re-circulating 30 mL of ACSF, bubbled with carbogen, at a flow rate of 20 mL/min [22,23]. The temperature was maintained at 30 ± 1 °C. Extracellular KCl was elevated from 3 mM to 8 mM over a span of 30 min before starting the recordings [24].

2.2.1. Electrophysiological recordings

Population activity at the ventral respiratory group (VRG), likely in

the neighborhood of the preBötC, was recorded with glass suction electrodes positioned on this circuit at the surface of the slice [22,23]. The signal was amplified and filtered (low pass, 0.25 KHz; high pass, 5 Hz) using a wide-band AC amplifier (Grass Instruments, Quincy, MA). The signal was also rectified and integrated by an electronic filter (time constant of 30–50 ms; designed by JFI electronics at the University of Chicago) [25,26]. The experimental protocol consisted of at least 60 min of basal stable recording before cytokines were bath-applied as follows: IL1Ra 200 ng/mL (Prospec, East Brunswick, NJ; n = 7) was applied and left in the bath for 60 min when tested alone or applied 60 min before the IL-1 β application (while IL1Ra remained in the bath). IL-1 β (American Research Products, Waltham, MA; n = 8) was applied

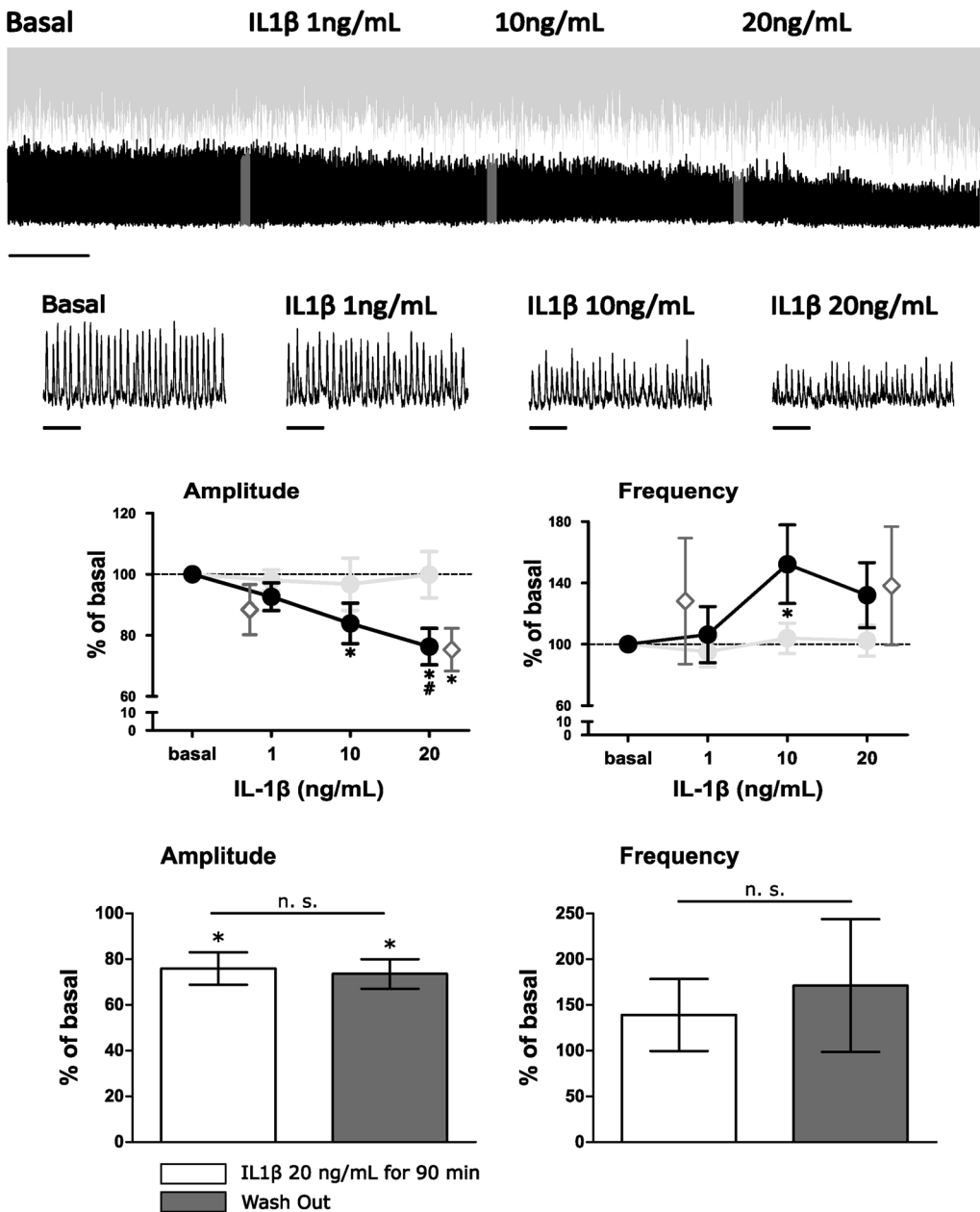


Fig. 2. Modulation of VRG activity by IL-1 β . Upper trace shows the time-compacted VRG integrated activity (black) in a slice before and after IL-1 β application at incremental concentrations for 30 min (scale bar corresponds to 10 min). Above the trace, the complementary shadow (light gray) of the control trace from Fig. 1A was inserted. Dark gray rectangles delimit the periods of the expanded traces shown in the middle (scale bar corresponds to 10 s). At the middle, the concentration-response quantifications (as % of basal) of the inspiratory burst amplitude (left) and frequency (right) are shown. The time-course quantifications obtained from control (untreated) slices are inserted for comparison (light gray). The quantifications of the effects of IL-1 β at 1 or 20 ng/mL applied for 90 min were also inserted as diamonds. At the bottom, the quantifications (as % of basal) of the inspiratory burst amplitude (left) and frequency (right) of the effects of IL-1 β 20 ng/mL are plotted along with the same variables measured 60 min after removing IL-1 β from the bath (Wash out). * denotes a significant difference compared to basal conditions ($p < 0.05$). # denotes a significant difference compared to the untreated slices (light gray) at the same time-point ($p < 0.05$).

in incremental concentrations (1, 10 and 20 ng/mL). Each concentration was evaluated for 30 min. Alternatively, the concentrations of 1 and 20 ng/mL were evaluated, independently, for 90 min. After the application of IL-1 β 20 ng/mL for 90 min, the cytokine was washed out and its reversibility was evaluated for 60 min. As mentioned, in an independent group of experiments, the incremental concentrations application of IL-1 β was performed in the continuous presence of IL1Ra 200 ng/mL ($n = 6$), which was applied 60 min before and left in the bath for the rest of the experiment.

2.3. Data analysis and statistics

Signals were digitalized at 10 kHz using an analog-to-digital converter (BNC-2110, National Instruments) and stored on a personal computer for offline analysis. Recordings were analyzed with Clampfit 10.6 (Molecular Devices, San Jose, CA). Burst frequency was expressed in Hz and burst amplitude was expressed in arbitrary units (a.u.). Data were also normalized to basal conditions (defined as 100 %). The irregularity score for both measurements was calculated as follows: $S_n =$

$ABS(X_n - X_{n-1})/X_{n-1}$ where S_n is the score of the nth cycle or burst, X_n is its instantaneous frequency or amplitude, X_{n-1} is the instantaneous frequency or amplitude of the preceding cycle or burst, and ABS is the absolute value. Data was plotted using GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, CA), which was also used for statistical analysis. The results are expressed as the mean \pm SEM. When comparing two independent groups, the Mann-Whitney U test was used. When comparing quantifications within the same group, the Wilcoxon test was used. Differences were considered significant with $p < 0.05$.

3. Results

3.1. preBötC produces a long-lasting inspiratory rhythm that is not affected by IL1Ra

The fictive respiratory rhythm recorded from the VRG in control conditions (in the absence of any drug), for all the slices included in this study ($n = 31$), showed a frequency of 0.42 ± 0.05 Hz (irregularity score = 0.70 ± 0.09) and an amplitude of 1.41 ± 0.11 a.u.

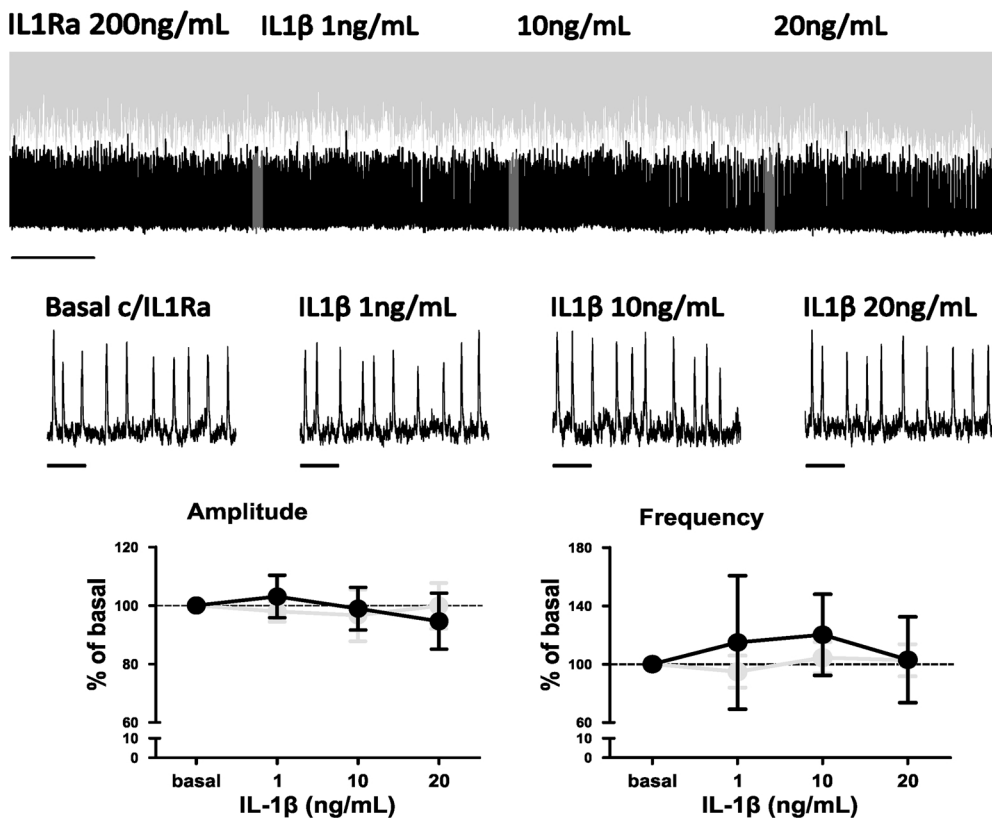


Fig. 3. IL1Ra prevents IL-1 β -induced VRG activity modulation. Upper trace shows the time-compacted VRG integrated activity (black) in a slice before and after IL-1 β application at incremental concentrations in the continuous presence of IL1Ra, which was applied earlier (scale bar corresponds to 10 min). Above the trace, the complementary shadow (light gray) of the control trace from Fig. 1A was inserted. Dark gray rectangles delimit the periods of the expanded traces shown in the middle (scale bar corresponds to 10 s). At the bottom, the concentration-response quantifications (as % of basal) of the inspiratory burst amplitude (left) and frequency (right) are shown. The time-course quantifications obtained from control (untreated) slices are inserted for comparison (light gray).

(irregularity score = 0.22 ± 0.01) under basal conditions. To test the stability of this activity under *in vitro* conditions, a subgroup of non-treated slices was left unperturbed in the chamber while recording their activity for two hours ($n = 10$). The basal respiratory rhythm frequency of these slices was 0.59 ± 0.12 Hz (irregularity score = 0.81 ± 0.21) and their burst amplitude was 1.28 ± 0.24 a.u. (irregularity score = 0.22 ± 0.03). These values remained unchanged after two hours of continuous recording, as the slices exhibited then a respiratory rhythm frequency of 0.62 ± 0.14 Hz (102.40 ± 10.12 % of basal; $n = 10$; $p > 0.05$, Fig. 1A) and a burst amplitude of 1.21 ± 0.20 a.u. (99.89 ± 7.57 % of basal; $n = 10$; $p > 0.05$, Fig. 1A), which are not different from the variables quantified at the beginning of the experiments ($p > 0.05$). The irregularity scores for burst frequency and amplitude, did not change after two hours either (0.76 ± 0.21 and 0.23 ± 0.03 , respectively; $p > 0.05$; $n = 10$).

To evaluate whether IL1Ra could modulate respiratory rhythm generation, we applied it to the bath and tested its effects for one hour. The activity recorded from the VRG in slices later treated with IL1Ra 200 ng/mL showed a frequency of 0.33 ± 0.07 Hz (irregularity score = 0.61 ± 0.20) and an amplitude of 1.34 ± 0.16 a.u. (irregularity score = 0.21 ± 0.02) under control conditions (basal; $n = 7$; Fig. 1B). One hour after the application of IL1Ra neither the amplitude [1.31 ± 0.12 Hz (100.20 ± 3.85 % of basal; $p > 0.05$, Fig. 1B)] nor the frequency [0.34 ± 0.08 Hz (104.20 ± 9.46 % of basal; $p > 0.05$, Fig. 1B)] of the inspiratory bursts changed. While the irregularity score of the burst frequency did not change in the presence of IL1Ra (0.85 ± 0.40 ; $p > 0.05$; $n = 7$), there was a slight but significant decrease in the irregularity score of the burst amplitude in the presence of IL1Ra (0.18 ± 0.02 ; $p < 0.05$; $n = 7$).

3.2. IL-1 β reduced inspiratory burst amplitude in a concentration-dependent manner

To evaluate whether IL-1 β could modulate respiratory rhythm generation, we applied it to the bath in incremental concentrations. The

activity recorded from the VRG in slices later treated with IL-1 β showed a frequency of 0.33 ± 0.08 Hz (irregularity score = 0.76 ± 0.16) and an amplitude of 1.41 ± 0.19 a.u. (irregularity score = 0.24 ± 0.03) under control conditions (basal; $n = 8$; Fig. 2). After the application of IL-1 β , the amplitude of the inspiratory bursts slightly decreased to 1.32 ± 0.20 a.u. (92.66 ± 4.58 % of basal; $p > 0.05$, Fig. 2) with IL-1 β 1 ng/mL, further decreased to 1.16 ± 0.17 a.u. (83.91 ± 6.61 % of basal; $p < 0.05$, Fig. 2) with IL-1 β 10 ng/mL and decreased again to 1.10 ± 0.20 a.u. (76.31 ± 5.99 % of basal; $p < 0.05$, Fig. 2) with IL-1 β 20 ng/mL. Statistical evaluation indicates that the IL-1 β -induced decrease in inspiratory bursts amplitude reaches significance at 10 and 20 ng/mL ($p < 0.05$), but not with 1 ng/mL ($p = 0.098$). IL-1 β application did not affect inspiratory burst frequency at the lowest (1 ng/mL; 0.39 ± 0.13 Hz; 106.30 ± 18.32 % of basal) and highest concentrations tested (20 ng/mL; 0.44 ± 0.46 Hz; 132.10 ± 21.20 % of basal; $n = 8$; Fig. 2). However, IL-1 β application at the intermediate concentration (10 ng/mL) significantly increased inspiratory burst frequency (to 0.45 ± 0.10 Hz; 152.30 ± 25.61 % of basal; $n = 8$; Fig. 2). This increase in inspiratory burst frequency is not significant when compared to the frequency of control slices at the same time-point ($p > 0.05$; Fig. 2). The irregularity scores for burst frequency and amplitude did not change after the presence of IL-1 β at any of the concentrations tested (data not shown; $p > 0.05$; $n = 8$). While evaluating whether longer application of IL-1 β could produce higher effects, we found that the administration of either 1 or 20 ng/mL of IL-1 β for 90 min, produce the same effect on burst amplitude (87.91 ± 8.67 % of basal; $p > 0.05$; $n = 6$ and 75.90 ± 7.09 % of basal; $p < 0.05$; $n = 6$, respectively; Fig. 2) than their application for 30 min. In both cases, burst frequency did not change either ($p > 0.05$; Fig. 2). Sixty minutes after removing IL-1 β 20 ng/mL from the bath, the reduction in burst amplitude remained intact (73.51 ± 6.45 % of basal; $n = 6$; Fig. 2), which indicates that, in our experimental conditions, the effects of IL-1 β are irreversible.

3.3. The IL-1 β -induced inspiratory burst amplitude reduction is prevented by IL1Ra

To evaluate whether IL1Ra could prevent the IL-1 β -induced inspiratory burst amplitude reduction, we applied IL1Ra 60 min before the application of IL-1 β in incremental concentrations. The activity recorded from the VRG 60 min after the application of IL1Ra showed a frequency of 0.39 ± 0.11 Hz (irregularity score = 1.02 ± 0.45) and an amplitude of 1.53 ± 0.16 a.u. (irregularity score = 0.19 ± 0.01 ; basal; $n = 6$; Fig. 3). After the application of IL-1 β , in the continuous presence of IL1Ra, no change in the burst amplitude was observed at 1 ng/mL (1.53 ± 0.12 a.u.; 103.10 ± 7.28 % of basal; $p > 0.05$, Fig. 3), 10 ng/mL (1.46 ± 0.10 a.u.; 98.93 ± 7.31 % of basal; $p > 0.05$, Fig. 3), or 20 ng/mL (1.38 ± 0.07 a.u.; 94.65 ± 9.57 % of basal; $p > 0.05$, Fig. 3). After the application of IL-1 β , in the continuous presence of IL1Ra, no change in the burst frequency was observed at 1 ng/mL (0.45 ± 0.23 Hz; 115.00 ± 45.81 % of basal; $p > 0.05$, Fig. 3), 10 ng/mL (0.52 ± 0.20 Hz; 120.20 ± 27.80 % of basal; $p > 0.05$, Fig. 3), or 20 ng/mL (0.43 ± 0.17 Hz; 103.10 ± 29.44 % of basal; $p > 0.05$, Fig. 3). The irregularity scores for burst frequency and amplitude did not change after IL-1 β application in the continuous presence of IL1Ra at any of the concentrations tested (data not shown; $p > 0.05$; $n = 8$).

4. Discussion

Here we show that IL-1 β reduces the amplitude of the fictive inspiratory rhythm in a concentration-dependent manner and that this reduction is prevented by IL1Ra. IL-1 β also increases respiratory rhythm frequency only at 10 ng/mL. These findings indicate that the preBötC can be directly modulated by IL-1 β . In addition, our findings show that endogenous IL-1 β does not exert a major influence on preBötC activity in the brainstem slice preparation, since IL1Ra by itself only produced a tiny increase in burst amplitude regularity in the fictive inspiratory rhythm.

The IL-1 β -induced inspiratory burst amplitude reduction observed in this study, which is concentration-dependent and prevented by IL1Ra, is consistent with previous findings of a reduction in tidal volume after peripheral administration of IL-1 β to rodents [1] and the inhibition of breathing by IL-1 β injections into the nTS in the *in vitro* brainstem-spinal cord preparation [15]. It also coincides with the modulation of phrenic burst amplitude after the intrathecal administration of IL-1 β [6]. We also found that at 10 ng/mL, IL-1 β produces a tiny increase in respiratory rhythm frequency that is not concentration-dependent (absent in 1 and 20 ng/mL) despite being prevented by IL1Ra. This IL-1 β -induced increase in respiratory rhythm frequency is similar to the observed tendency to increase respiratory frequency and the significant increase in minute ventilation upon intracerebral injection of IL-1 β [3], but contrasts with the decrease in the respiratory rhythm frequency induced by IL-1 β administration *in vivo* and *in vitro* [1,15]. Overall, the main contribution of the present study is that IL-1 β directly modulates, in a concentration-dependent manner, the generation of the inspiratory rhythm by the preBötC, mainly by an inhibitory effect that reduces inspiratory burst amplitude, which could be involved in the breathing response to inflammation. As mentioned, the possibility of a direct modulation of the preBötC by IL-1 β has been suggested by the presence of this cytokine in the brainstem [7], the presence of its receptor in an area that could include the preBötC [12,14] and the responsiveness of respiratory cells to IL-1 β [12].

Previous reports have shown that IL-1 β inhibits synchronized network activity in other circuits beyond the preBötC, which can be prevented by IL1Ra [9,10,16,17]. The IL-1 β -induced inhibition of synchronized network activity can be mediated by a reduction in neuronal excitability [16,27–30] and changes in synaptic transmission [21,29–33]. While some reports indicate that the inhibitory effects of IL-1 β could involve a reduction in glutamatergic synaptic potentials

[29,32,33] and a decrease in the surface expression of AMPA receptors [34], the more widespread inhibitory effect of IL-1 β involves an enhancement in GABAergic transmission [21,27,28,30,31,35]. For instance, IL-1 β increases GABAergic synaptic potentials [21,28,30,31] and GABA release [28,36]. Furthermore, IL-1 β also increases GABAergic presynaptic inhibition of synaptic transmission [27] and enhances GABA_A-mediated currents [19,35] and chloride accumulation [19]. Coincidentally, it has been recently shown that enhancing inhibition reduces the amplitude of the inspiratory bursts generated by the preBötC [37].

Our observation that IL-1 β -induced inspiratory burst amplitude reduction is not reversible, might differ from previous findings showing that, when applied for a short period of time, the effects of IL-1 β can be reversed [27–30,33], although not completely [27,28,30]. However, on the contrary, there is evidence that the effects of IL-1 β can be long-lasting [38,39]. In fact, a single administration of IL-1 β could produce changes in the CNS lasting for up to 3 weeks, which might be mediated by the production and release of a variety of modulators triggered by the initial IL-1 β administration [38]. Similarly, a single administration of IL-1 β produce protective effects that last for up to 2 months [39]. It is possible that the long-lasting effects of IL-1 β involve the activation of signal transducing kinases, transcription factors and gene expression [40–43].

Our finding that IL1Ra produces minor effects on VRG activity, coincides with a previous finding that the intracisternal micro-injection of the IL-1 receptor antagonist AF12198 does not affect the respiratory rhythm either [5]. Thus, despite the evidence that IL-1 β is present in the brainstem under basal conditions [7] and that its receptors could be expressed in the preBötC [12,14], it seems that under basal conditions the endogenous IL-1 β exerts no major modulation on preBötC activity but slightly influences the reliability of burst amplitude. This contradicts previous findings that IL1Ra can produce major effects on neural function [21]. However, it must be considered that the actions of IL-1 β and IL1Ra are highly variable throughout the brain, possibly due to differences in the expression of their receptors [44].

Finally, our finding that IL1Ra prevents the IL-1 β -induced inspiratory bursts amplitude reduction coincides with the reports that IL1Ra prevents the IL-1 β -induced increase in GABAergic transmission [19] or IL-1 β -induced reduction of cortical spreading depolarization amplitude [17]. This is possible because IL1Ra lacks one of the binding sites of IL-1 β to its receptors [20] and functions as a pure endogenous antagonist of IL-1 β actions [18]. Regarding breathing, it has been demonstrated that antagonizing IL-1 β receptors blocks the alterations in respiratory rhythm plasticity induced by inflammation [5,6]. Thus, our study indicates that IL-1 β modulates respiratory rhythm generation, which could contribute to both the respiratory response to inflammation [1,3] and the breathing alterations observed in several pathologies related to inflammation [9,10].

CRediT authorship contribution statement

Lorea-Hernández Jonathan Julio: Formal analysis, Writing - review & editing. **Camacho-Hernández Neira Polet:** Writing - review & editing. **Peña-Ortega Fernando:** Funding acquisition, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors have no conflict of interest to declare.

Acknowledgements

The authors thank Jessica González Norris and Anaid Antaramian for editorial comments. We thank Benito Ordaz and Sair Flores for technical support. Lorea-Hernández Jonathan Julio and Camacho-

Hernández Neira Polet are PhD students at UNAM and received fellowships from National Council of Science and Technology (CONACyT). This manuscript constitutes a partial fulfillment of the PhD program at Posgrado en Ciencias Biológicas of the National Autonomous University of México (UNAM) of Lorea-Hernández Jonathan Julio and acknowledges the scholarship and financial support provided by CONACyT (fellowship 412080). This work was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, México (grant number IN202018) and by CONACyT (grant number A1-S-7540), México. Dedicated to the health professionals fighting the COVID-19 pandemic.

References

- [1] A. Olsson, G. Kayhan, H. Lagercrantz, E. Herlenius, IL-1 beta depresses respiration and anoxic survival via a prostaglandin-dependent pathway in neonatal rats, *Pediatr. Res.* 54 (2003) 326–331, <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000076665.62641.A2>.
- [2] A.D. Lu, J.F. Wang, Y.H. Chen, L.L. Hou, X.J. Zhou, J.J. Bian, J.J. Wang, K.M. Zhu, Nitric oxide and ATP-sensitive potassium channels mediate lipopolysaccharide-induced depression of central respiratory-like activity in brain slices, *Neurosignals* 20 (2012) 103–111, <https://doi.org/10.1159/000330841>.
- [3] N.P. Aleksandrova, G.A. Danilova, V.G. Aleksandrov, Cyclooxygenase pathway in modulation of the ventilatory response to hypercapnia by interleukin-1 β in rats, *Respir. Physiol. Neurobiol.* 209 (2015) 85–90, <https://doi.org/10.1016/j.resp.2014.12.006>.
- [4] J.J. Lorea-Hernández, T. Morales, A.J. Rivera-Angulo, D. Alcantara-Gonzalez, F. Peña-Ortega, Microglia modulate respiratory rhythm generation and auto-resuscitation, *Glia* 64 (2016) 603–619, <https://doi.org/10.1002/glia.22951>.
- [5] A.P. Ribeiro, C.A. Mayer, C.G. Wilson, R.J. Martin, P.M. MacFarlane, Intratracheal LPS administration attenuates the acute hypoxic ventilatory response: role of brainstem IL-1 β receptors, *Respir. Physiol. Neurobiol.* 242 (2017) 45–51, <https://doi.org/10.1016/j.resp.2017.03.005>.
- [6] A.D. Hocker, A.G. Huxtable, IL-1 receptor activation undermines respiratory motor plasticity after systemic inflammation, *J. Appl. Physiol.* (1985) 125 (2018) 504–512, <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01051.2017>.
- [7] S.M. Johnson, K.S. Randhawa, J.J. Epstein, E. Gustafson, A.D. Hocker, A.G. Huxtable, T.L. Baker, J.J. Watters, Gestational intermittent hypoxia increases susceptibility to neuroinflammation and alters respiratory motor control in neonatal rats, *Respir. Physiol. Neurobiol.* 256 (2018) 128–142, <https://doi.org/10.1016/j.resp.2017.11.007>.
- [8] N.P. Camacho-Hernández, J.J. Lorea-Hernández, F. Peña-Ortega, Microglial modulators reduce respiratory rhythm long-term facilitation in vitro, *Respir. Physiol. Neurobiol.* 265 (2019) 9–18, <https://doi.org/10.1016/j.resp.2018.07.012>.
- [9] F. Peña-Ortega, Brain arrhythmias induced by amyloid beta and inflammation: involvement in Alzheimer's disease and other inflammation-related pathologies, *Curr. Alzheimer Res.* 16 (2019) 1108–1131, <https://doi.org/10.2174/1567205017666191213162223>.
- [10] F. Peña-Ortega, Clinical and experimental aspects of breathing modulation by inflammation, *Auton. Neurosci.* 216 (2019) 72–86, <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2018.11.002>.
- [11] L.S. Brady, A.B. Lynn, M. Herkenham, Z. Gottesfeld, Systemic interleukin-1 induces early and late patterns of c-fos mRNA expression in brain, *J. Neurosci.* 14 (1994) 4951–4964, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-08-04951.1994>.
- [12] A. Ericsson, C. Liu, R.P. Hart, P.E. Sawchenko, Type 1 interleukin-1 receptor in the rat brain: distribution, regulation, and relationship to sites of IL-1-induced cellular activation, *J. Comp. Neurol.* 361 (1995) 681–698, <https://doi.org/10.1002/cne.903610410>.
- [13] K. Yabuuchi, M. Minami, S. Katsumata, M. Satoh, Localization of type I interleukin-1 receptor mRNA in the rat brain, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 27 (1994) 27–36, [https://doi.org/10.1016/0169-328x\(94\)90180-5](https://doi.org/10.1016/0169-328x(94)90180-5).
- [14] A. Jafri, A. Belkadi, S.I. Zaidi, P. Getsy, C.G. Wilson, R.J. Martin, Lung inflammation induces IL-1 β expression in hypoglossal neurons in rat brainstem, *Respir. Physiol. Neurobiol.* 188 (2013) 21–28, <https://doi.org/10.1016/j.resp.2013.04.022>.
- [15] K. Gresham, B. Boyer, C. Mayer, R. Foglyano, R. Martin, C.G. Wilson, Airway inflammation and central respiratory control: results from in vivo and in vitro neonatal rat, *Respir. Physiol. Neurobiol.* 178 (2011) 414–421, <https://doi.org/10.1016/j.resp.2011.05.008>.
- [16] A. Manfredi, D. Brambilla, S. Bianchi, M. Mariotti, M.R. Opp, L. Imeri, Interleukin-1 β enhances non-rapid eye movement sleep when microinjected into the dorsal raphe nucleus and inhibits serotonergic neurons in vitro, *Eur. J. Neurosci.* 18 (2003) 1041–1049, <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02836.x>.
- [17] F. Richter, A. Eitner, J. Leuchtweis, R. Bauer, A. Lehmenkühler, H.G. Schaible, Effects of interleukin-1 β on cortical spreading depolarization and cerebral vasculature, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 37 (2017) 1791–1802, <https://doi.org/10.1177/0271678X16641127>.
- [18] C.H. Hannum, C.J. Wilcox, W.P. Arend, F.G. Joslin, D.J. Dripps, P.L. Heimdal, L.G. Armes, A. Sommer, S.P. Eisenberg, R.C. Thompson, Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor, *Nature* 343 (1990) 336–340, <https://doi.org/10.1038/343336a0>.
- [19] L.G. Miller, W.R. Galpern, K. Dunlap, C.A. Dinarello, T.J. Turner, Interleukin-1 augments gamma-aminobutyric acid A receptor function in brain, *Mol. Pharmacol.* 39 (1991) 105–108 PMID: 1847488.
- [20] R.J. Evans, J. Bray, J.D. Childs, G.P. Vigers, B.J. Brandhuber, J.J. Skalicky, R.C. Thompson, S.P. Eisenberg, Mapping receptor binding sites in interleukin (IL)-1 receptor antagonist and IL-1 beta by site-directed mutagenesis. Identification of a single site in IL1Ra and two sites in IL-1 beta, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 11477–11483, <https://doi.org/10.1074/jbc.270.19.11477>.
- [21] R.R. Patel, S. Khom, M.Q. Steinman, F.P. Varodayan, W.B. Kiesses, D.M. Hedges, R. Vlkolinsky, T. Nadav, I. Polis, M. Bajo, A.J. Roberts, M. Roberto, IL-1 β expression is increased and regulates GABA transmission following chronic ethanol in mouse central amygdala, *Brain Behav. Immun.* 75 (2019) 208–219, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.10.009>.
- [22] F. Peña, M.A. Parkis, A.K. Tryba, J.M. Ramirez, Differential contribution of pacemaker properties to the generation of respiratory rhythms during normoxia and hypoxia, *Neuron* 43 (2004) 105–117, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.06.023>.
- [23] F. Peña, R. Meza-Andrade, V. Páez-Zayas, M.C. González-Marín, Gasping generation in developing Swiss-Webster mice in vitro and in vivo, *Neurochem. Res.* 33 (2008) 1492–1500, <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9616-x>.
- [24] A.K. Tryba, F. Peña, J.M. Ramirez, Stabilization of bursting in respiratory pacemaker neurons, *J. Neurosci.* 23 (2003) 3538–3546, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-08-03538.2003>.
- [25] C. Zavala-Tecuapetla, D. Tapia, A.J. Rivera-Angulo, E. Galarraga, F. Peña-Ortega, Morphological characterization of respiratory neurons in the pre-Bötzinger complex, *Prog. Brain Res.* 209 (2014) 39–56, <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63274-6.00003-5>.
- [26] C. Zavala-Tecuapetla, M.A. Aguilera, J.J. Lopez-Guerrero, M.C. González-Marín, F. Peña, Calcium-activated potassium currents differentially modulate respiratory rhythm generation, *Eur. J. Neurosci.* 27 (2008) 2871–2884, <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06214.x>.
- [27] B. Yu, P. Shinnick-Gallagher, Interleukin-1 beta inhibits synaptic transmission and induces membrane hyperpolarization in amygdala neurons, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271 (1994) 590–600 PMID: 7525939.
- [28] I.V. Tabarean, H. Korn, T. Bartfai, Interleukin-1 β induces hyperpolarization and modulates synaptic inhibition in preoptic and anterior hypothalamic neurons, *Neuroscience* 141 (2006) 1685–1695, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.05.007>.
- [29] D. Brambilla, S. Franciosi, M.R. Opp, L. Imeri, Interleukin-1 inhibits firing of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus and enhances GABAergic inhibitory post-synaptic potentials, *Eur. J. Neurosci.* 26 (2007) 1862–1869, <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05796.x>.
- [30] D. Brambilla, I. Barajon, S. Bianchi, M.R. Opp, L. Imeri, Interleukin-1 inhibits putative cholinergic neurons in vitro and REM sleep when microinjected into the rat laterodorsal tegmental nucleus, *Sleep* 33 (2010) 919–929, <https://doi.org/10.1093/sleep/33.7.919>.
- [31] M.L. Zeise, S. Madamba, G.R. Siggins, Interleukin-1 beta increases synaptic inhibition in rat hippocampal pyramidal neurons in vitro, *Regul. Pept.* 39 (1992) 1–7, [https://doi.org/10.1016/0167-0115\(92\)90002-c](https://doi.org/10.1016/0167-0115(92)90002-c).
- [32] F.P. Bellinger, S. Madamba, G.R. Siggins, Interleukin 1 beta inhibits synaptic strength and long-term potentiation in the rat CA1 hippocampus, *Brain Res.* 628 (1993) 227–234, [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90959-q](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90959-q).
- [33] W.P. Luk, Y. Zhang, T.D. White, F.A. Lue, C.G. Jiang, L. Zhang, H. Moldofsky, Adenosine: a mediator of interleukin-1 β -induced hippocampal synaptic inhibition, *J. Neurosci.* 19 (1999) 4238–4244, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-11-04238.1999>.
- [34] A.Y. Lai, R.D. Swazey, A. El-Husseini, C. Song, Interleukin-1 beta modulates AMPA receptor expression and phosphorylation in hippocampal neurons, *J. Neuroimmunol.* 175 (2006) 97–106, <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.03.001>.
- [35] D.S. Wang, A.A. Zurek, I. Lecker, J. Yu, A.M. Abramian, S. Avramescu, P.A. Davies, S.J. Moss, W.Y. Lu, B.A. Orser, Memory deficits induced by inflammation are regulated by α 5-subunit-containing GABAA receptors, *Cell Rep.* 2 (2012) 488–496, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.08.022>.
- [36] C. Feleder, P. Arias, D. Refojo, S. Nacht, J. Moguilevsky, Interleukin-1 inhibits NMDA-stimulated GnRH secretion: associated effects on the release of hypothalamic inhibitory amino acid neurotransmitters, *Neuroimmunomodulation* 7 (2000) 46–50, <https://doi.org/10.1159/000026419>.
- [37] K.D. Harris, T. Dashevskiy, J. Mendoza, A.J. Garcia 3rd, J.M. Ramirez, E. Shea-Brown, Different roles for inhibition in the rhythm-generating respiratory network, *J. Neurophysiol.* 118 (2017) 2070–2088, <https://doi.org/10.1152/jn.00174.2017>.
- [38] E.D. Schmidt, G. Aguilera, R. Binnekade, F.J. Tilders, Single administration of interleukin-1 increased corticotropin releasing hormone and corticotropin releasing hormone-receptor mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus which paralleled long-lasting (weeks) sensitization to emotional stressors, *Neuroscience* 116 (2003) 275–283, [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00555-9](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00555-9).
- [39] P. Tiberghien, V. Laithier, M. Mabed, E. Racadot, C.W. Reynolds, R. Angonin, R. Loumi, J.J. Pavy, J.Y. Cahn, A. Noir, Interleukin-1 administration before lethal irradiation and allogeneic bone marrow transplantation: early transient increase of peripheral granulocytes and successful engraftment with accelerated leukocyte, erythrocyte, and platelet recovery, *Blood* 81 (1993) 1933–1939 PMID: 8461477.
- [40] T.J. Novak, D. Chen, E.V. Rothenberg, Interleukin-1 synergy with phosphoinositide pathway agonists for induction of interleukin-2 gene expression: molecular basis of costimulation, *Mol. Cell. Biol.* 10 (1990) 6325–6334, <https://doi.org/10.1128/mcb.10.12.6325>.
- [41] Z. Cao, J. Xiong, M. Takeuchi, T. Kurama, D.V. Goeddel, TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1, *Nature* 383 (1996) 443–446, <https://doi.org/10.1038/383443a0>.
- [42] M. Komine, L.S. Rao, I.M. Freedberg, M. Simon, V. Milisavljevic, M. Blumenberg,

- Interleukin-1 induces transcription of keratin K6 in human epidermal keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.* 116 (2001) 330–338, <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2001.01249.x>.
- [43] R.W. Wyszynski, B.F. Gibbs, L. Varani, D. Iannotta, V.V. Sumbayev, Interleukin-1 beta induces the expression and production of stem cell factor by epithelial cells: crucial involvement of the PI-3K/mTOR pathway and HIF-1 transcription complex, *Cell. Mol. Immunol.* 13 (2016) 47–56, <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.113>.
- [44] S.J. Hewett, N.A. Jackman, R.J. Claycomb, Interleukin-1 β in central nervous system injury and repair, *Eur. J. Neurodegener. Dis.* 1 (2012) 195–211 PMID: 26082912.