



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE PSICOLOGÍA



**“NEUROMODULACIÓN DEL CIRCUITO GENERADOR DEL
RITMO RESPIRATORIO EN NORMOXIA E HIPOXIA *IN VITRO*”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN PSICOLOGÍA

P R E S E N T A:

MARÍA DEL CARMEN GONZÁLEZ MARÍN

**DIRECTOR DE TESIS
DR. JOSÉ FERNANDO PEÑA ORTEGA**

**REVISOR DE TESIS
DR. CÉSAR CASASOLA CASTRO**

MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por el privilegio de formar parte de ella.

A la Facultad de Psicología por la formación académica.

Al CINVESTAV por las facilidades prestadas para la realización de este trabajo.

Al Dr. José Fernando Peña Ortega por ser un excelente tutor además de mejor persona. Por permitirme formar parte de su laboratorio y compartir su conocimiento. Por su apoyo y paciencia. Gracias por enseñarme a hacer investigación.

A mis compañeros de Laboratorio (los que fueron y los que están): Abraham, Álvaro, Armando, Benito, Cecilia, Daniel, Hugo, Josué, Juanito, Liliana, María, Miguel, Noé, Rafael, Ramón, Roberto, Sergio y el Sr. Arturo por su apoyo con la realización de este trabajo.

Al Ing. José Rodolfo Fernández Calderón por la ayuda con la burocracia.

Al Dr. César Casasola Castro por sus aportaciones al desarrollo de este trabajo. Por ayudarme en la normalización de los datos.

Al Mtro. Alfonso Salgado Benítez por el término teleología.

A la Lic. Karina Simón Arceo por la minuciosidad con que revisó mi trabajo.

A la Dra. Irma Yolanda del Río Portilla por sus valiosos comentarios.

Un agradecimiento especial a la Mtra. Gabriela Orozco Calderón por introducirme al mundo de la investigación. Gracias por tu amistad y por todos los momentos compartidos.

DEDICATORIAS

Este trabajo está dedicado a mis padres. Gracias por quererme incondicionalmente. Gracias por todos los sacrificios y esfuerzos que han hecho por Gil y por mí. Gracias por ayudarme a cumplir mis sueños. Gracias por haberme dado la oportunidad de viajar y conocer el mundo. No hubiera podido realizar nada sin ustedes. Esta tesis es por y para ustedes.

A mi hermano Gil. Gracias por compartir la vida conmigo. Por los momentos buenos y malos.

A mis abuelos. Gracias por todos los recuerdos. Porque a pesar de la distancia siempre los llevo conmigo.

A mi familia González y a mi familia Marín por todo el apoyo y cariño.

A Edgar. Gracias por existir. Gracias por tu amor incondicional. Gracias por tu apoyo y cariño en la distancia. Gracias por tu nobleza y tu ejemplo. Eres una persona admirable. Gracias por creer en mí incluso cuando yo ya no lo hacía. ¡Vamos por el posgrado!

Oh, I get by with a little help from my friends,
Mmm I get high with a little help from my friends,
Mmm I'm gonna try with a little help from my friends...

The Beatles

A la familia Durand Rosas: Gracias por todos los viernes de dominó, por la comida, por los consejos y por las risas. Gracias por apoyarme.

A la familia Soria Gómez: Gracias por abrirme las puertas de su casa. Gracias por su apoyo y cariño.

Aimmé, Brenda y Rosalinda: Gracias por compartir la carrera. Gracias por todos los buenos recuerdos.

Ale y Barney: Gracias por compartir Canadá y McGill conmigo. Nunca lo voy a olvidar.

Alex, Karina, Miriam y Norma: Gracias por su ayuda en mi inicio en la investigación. Y claro, gracias por todas las risas.

Andrea: Gracias por tu amistad, cariño, apoyo y comprensión. Gracias por todos estos años y los que vienen.

Beatriz: Gracias por ayudarme con la estadística.

Carlos: Por todos estos años de amistad. Gracias por tu apoyo y cariño incondicional.

Charly, David y Pablo: Gracias por su amistad.

Cristina: ¡Amigui!... Gracias por reencontrarnos. Gracias por ser tan buena persona y no olvidarme.

Josué: Gracias por toda tu ayuda en el laboratorio, sin ella no lo hubiera logrado.

Loops: ¡Hermaniux!... Gracias por todo, por las sesiones en el msn, por ser cupido, por la investigación, por los pretzels, por Miss Nature, por las piñatas... y por ser una excelente investigadora.

Natalia: Gracias por tu apoyo y cariño.

Noé: Gracias por tu ayuda en el laboratorio. Gracias por siempre desearme lo mejor.

Oscar: Mi amigo y confidente. Gracias por estar siempre ahí para ayudarme a levantarme.

Rafa: Gracias por compartir el equipo B y hacerme reír con tus trucos de magia.

Zeidy: Gracias por tu amistad y buenos deseos.

ABREVIATURAS

5-HT: Serotonina.

5SP: Núcleo Espinal del Trigémino.

AMPA: Ácido alfa amino-3 hidro-5 metil-4 isoxazol propiónico.

AMPc: Monofosfato Cíclico de Adenosina.

Ca²⁺: Calcio.

CAN: Corriente catiónica no específica activada por calcio.

CCHS: Síndrome Congénito de Hipoventilación.

CCP: Fenómeno Frénico Cruzado.

CI-marcapaso: Neuronas marcapaso insensibles a cadmio.

CO₂: Dióxido de carbono.

CPB: Complejo pre-Bötzing.

CPG: Generador del Patrón Central.

CS-marcapaso: Neuronas marcapaso sensibles a cadmio.

DA: Dopamina.

DAG: Diacilglicerol.

DIRD: Depresión Respiratoria Inducida por Fármacos.

FFA: Ácido flufenámico.

GABA: Ácido gamma-aminobutírico.

G_i: Proteína G inhibidora.

GMPC: Monofosfato Cíclico de Guanosina.

GPCRs: Receptores acoplados a proteínas G.

GRD: Grupo Respiratorio Dorsal.

GRPF: Grupo Respiratorio Parafacial.

GRV: Grupo Respiratorio Ventral.

GRVc: Grupo Respiratorio Ventro-caudal.

GRVr: Grupo Respiratorio Ventro-rostral.

G_s: Proteína G estimulante.

GTP: Proteínas G.

IP₃: Inositol 1,4,5-trifosfato.

K⁺: Potasio.

LCRA: Líquido Cefalorraquídeo Artificial.

NA: Núcleo Ambiguo.

Na⁺: Sodio.

NK1R: Receptor para la neurocinina-1.

NMDA: *N*-metil-*D*-aspartato.

NPF: Núcleo Parafacial.

NRA: Núcleo Retroambiguo.

NRL: Núcleo de la Formación Reticular Lateral.

NTS: Núcleo del Tracto Solitario.

O₂: Oxígeno.

OHS: Síndrome de Hipoventilación por Obesidad.

OI: Oliva Inferior.

OSA: Apnea del Sueño Obstructiva.

PKA: Proteína cinasa A.

PO₂: Presión parcial de O₂.

RS: Síndrome de Rett.

SA: Apnea del Sueño.

SAP: Neurotoxina Saporina.

SCI: Lesiones de Espina Dorsal.

SIDS: Síndrome de Muerte Súbita Infantil.

SNC: Sistema Nervioso Central.

SP: Sustancia P.

TRH: Hormona liberadora de tirotrófina.

TTX: Tetrodotoxina.

X: Núcleo dorsal motor del nervio vago.

XII: Núcleo del nervio hipogloso.

Índice

1. Introducción.....	1
2. Anatomía y Fisiología del Sistema Respiratorio.....	5
2.1 Ciclo Respiratorio.....	6
2.2 Centros Respiratorios en el Tallo Cerebral.....	8
2.2.1 Centro Neumotáxico.....	9
2.2.2 Grupo Respiratorio Dorsal (GRD).....	9
2.2.3 Grupo Respiratorio Ventral (GRV).....	10
2.2.3.1 Grupo Respiratorio Ventro-Rostral (GRVr).....	10
2.2.3.2 Grupo Respiratorio Ventro-Caudal (GRVc).....	10
3. Circuito Generador del Ritmo Respiratorio.....	12
3.1 El Complejo pre-Bötzinger (CPB).....	12
3.1.1 Descubrimiento del CPB.....	12
3.1.2 Función y Características del CPB.....	15
3.2 Contrastes Anatómicos de la Generación del Ritmo Respiratorio.....	17
4. Eupnea, Suspiros y Boqueos.....	18
4.1 Eupnea.....	18
4.2 Suspiros (“respiración aumentada”).....	19
4.3 Boqueos.....	20
5. Respuesta Respiratoria a la Hipoxia.....	24
5.1 Hipoxia Aguda, Intermitente y Crónica.....	26
5.1.1 Hipoxia Aguda.....	26
5.1.2 Hipoxia Intermitente.....	27
5.1.3 Hipoxia Crónica.....	28
5.2 Respuesta Bifásica a la Hipoxia.....	29

5.3 Tolerancia a la Hipoxia.....	32
6. Autorresucitación y Generación de Boqueos.....	33
7. Síndrome de Muerte Súbita Infantil (SIDS).....	37
7.1 Factores de Riesgo y Modelos de Estudio.....	39
7.1.1 Posición del Bebé al Dormir.....	39
7.1.2 Temperatura Corporal.....	40
7.1.3 Liberación de Interleucinas.....	41
7.1.4 Opioides.....	41
7.1.5 Exposición a la Nicotina.....	41
7.2 Otros Factores de Riesgo.....	43
7.2.1 Factores Sociales.....	43
7.2.2 Factores Maternos.....	43
7.2.3 Factores Perinatales.....	43
7.3 Teorías y Hallazgos Científicos Recientes.....	44
8. Mecanismos Celulares Implicados en la Generación del Ritmo Respiratorio.....	47
8.1 Modelos de Generación del Ritmo Respiratorio.....	47
8.1.1 Modelo de Red.....	48
8.1.2 Modelo Marcapaso.....	49
8.2 Modelo de Generación de la Eupnea.....	50
8.3 Modelo de Generación de los Boqueos.....	50
9. Reconfiguración Funcional de la Red Neuronal que genera los distintos Ritmos Respiratorios (Eupnea, Suspiros y Boqueos).....	52
10. Neuromodulación del Circuito Generador del Ritmo Respiratorio.....	58
10.1 Segundos Mensajeros.....	60
10.1.1 Monofosfato Cíclico de Adenosina (AMPC).....	61
10.2 Neuropeptidos.....	63
10.2.1 Opioides.....	64

10.3 Forskolina.....	68
10.4 Aminas Biogénicas.....	70
10.4.1 Dopamina.....	70
11. Justificación.....	74
11.1 Planteamiento del Problema.....	75
12. Hipótesis.....	75
13. Objetivos.....	76
13.1 Objetivo General.....	76
13.2 Objetivos Específicos.....	76
14. Método.....	77
14.1 Sujetos.....	77
14.2 Aparatos.....	78
14.3 Material.....	78
14.4 Fármacos.....	79
14.5 Procedimiento.....	80
14.5.1 Obtención de la Rebanada de Tallo Cerebral.....	80
14.5.2 Registro de la Actividad Poblacional del CPB.....	81
14.6 Diseño Experimental.....	82
14.6.1 Parámetros Analizados.....	85
14.6.2 Obtención y Análisis de Datos.....	87
14.6.3 Análisis Estadístico.....	92
15. Resultados.....	93
15.1 Efectos de Naloxona, Forskolina y SKF-38393 en <i>Normoxia</i> (Protocolo Experimental I).....	93
15.1.1 Efectos de Naloxona en Normoxia.....	93
15.1.2 Efectos de Forskolina en Normoxia.....	96

15.1.3 Efectos de SKF-38393 en Normoxia.....	99
15.2 Efectos de Naloxona, Forskolina y SKF-38393 en <i>Hipoxia</i> (Protocolo Experimental 2).....	101
15.2.1 Efectos de Naloxona en Hipoxia.....	101
15.2.2 Efectos de Forskolina en Hipoxia.....	103
15.2.3 Efectos de SKF-38393 en Hipoxia.....	105
15.3 Diferencias de los Efectos de Naloxona, Forskolina y SKF-38393 Normoxia vs. Hipoxia.....	107
15.3.1 Amplitud.....	107
15.3.2 Duración Media.....	108
15.3.3 Tiempo de Subida.....	110
15.3.4 Área de la Ráfaga.....	112
15.3.5 Irregularidad.....	114
15.3.6 Frecuencia.....	115
16. Discusión.....	120
17. Conclusiones.....	133
Apéndice I.....	134
Apéndice II.....	142
18. Referencias.....	154

*"El alma es aire; el aire se mueve y es cognoscente.
El aire que respiramos nos da alma, vida y consciencia".*

Aristóteles

1. Introducción

Por milenios, hemos considerado a la vida como sinónimo de nuestra capacidad para respirar. La vida comienza y termina con la respiración. Incluso la Biblia señala que Dios “sopló en la nariz de Adán el suspiro de la vida”, y fue el hombre un ser viviente... y que después usó parte del aparato respiratorio de Adán -una costilla- para dar vida a Eva (Génesis 2:7).

Una persona puede vivir semanas sin comida y pocos días sin agua, pero únicamente unos minutos sin oxígeno (la reserva de O₂ del cuerpo es únicamente ~1 litro) (Ramirez, J. M., Folkow, L. P. y Blix, A. S., 2007). En reposo, un hombre adulto de 70 kg consume ~250 ml de O₂ por minuto y este consumo se triplica durante movimientos modestos como lo son el caminar (Feldman, J. L. y Del Negro, C. A., 2006).

La respiración persiste desde el nacimiento hasta la muerte. En un periodo de vida humana de 80 años, los movimientos respiratorios se repiten más de 5×10^8 veces. La respiración en reposo permanece relativamente inalterada durante toda la edad adulta saludable, pero las tasas de respiración son excepcionalmente volubles a desafíos agudos como lo son los cambios en la altitud, la postura, el ejercicio y el sueño (Feldman, J. L. y Del Negro, C. A., 2006).

La lista de variables con efectos dramáticos en la respiración es impresionante, incluyendo la temperatura, el ciclo sueño-vigilia, los niveles de concentración de O₂ y

CO₂, la irritación de las vías aéreas, el control consciente, y una variedad de condiciones patológicas. La respiración puede interrumpirse por la tos, el estornudo, el hipo, la deglución o el vómito; también puede suspenderse por la vocalización (Lieske, S. P., Thoby-Brisson, M. y Ramirez, J. M., 2001). Todo esto sugiere que la red respiratoria es particularmente rica en posibilidades de modulación, lo cual es esencial para ajustar la respiración en una manera dependiente de estado para los continuos requerimientos en un organismo conductual.

Además, los humanos tenemos relativamente poca tolerancia a cambios agudos en los niveles de O₂. Niveles bajos de O₂ sanguíneo por más de unos minutos pueden causar daño cerebral irreversible, nos sofocamos si nuestra respiración se detiene por más de 3-4 minutos. Durante 15-20 segundos de anoxia (ausencia de O₂) cerebral, perdemos la consciencia, la conducta dirigida, la actividad electroencefalográfica (EEG) y los potenciales evocados (Ramirez, J. M., Folkow, L. P. y Blix, A. S., 2007).

El patrón de respiración en sí mismo puede tomar varios patrones cualitativamente distintos, incluyendo la respiración eupneica (“normal”), jadeo, suspiros, respiración periódica (durante el sueño), y boqueos (en condiciones de hipoxia) (Lieske, S. P., Thoby-Brisson, M. y Ramirez, J. M., 2001).

Sin embargo, la respiración es una conducta excepcionalmente fiable. Es un acto que tomamos por sentado, ya que a nivel conductual sucede sin nuestra supervisión; respiramos pase lo que pase (Feldman, J. L., Mitchell, G. S. y Nattie, E. E., 2003). No obstante, durante el sueño o la pérdida de conocimiento, la respiración es menos fiable, y trastornos de la respiración relacionados con el sueño son muy comunes, incluso en humanos saludables, como la apnea del sueño (ver Apéndice II) o el síndrome de muerte súbita infantil [SIDS, por sus siglas en inglés (Sudden Infant Death Syndrome)] (Feldman, J. L. y Del Negro, C. A., 2006).

La respiración es una conducta simple y a la vez fundamental que manifiesta el estado psicológico y fisiológico de los seres humanos, desde el suspiro que marca el inicio de la vida hasta el boqueo que marca el final. Desde los llantos de un infante afligido hasta los discursos de oradores dependen de maniobras de la respiración, las cuales, son reforzadas por sus efectos. Similarmente, la frecuencia y la intensidad de suspiros y boqueos, de gruñidos y gemidos, de llantos y chillidos, de carcajadas y risas que marcan el lenguaje oral de cada día, y que transmiten una parte del mensaje emocional que subyace a nuestras palabras, radica en la respiración (Ley, R., 1994).

En el pasado, los psicólogos han visto a la respiración como una variable dependiente que refleja cambios en emociones, cognición y conducta. La respiración también se debería examinar como una variable independiente que afecta los procesos psicológicos; parece que la conexión entre emociones y respiración es una relación recíproca en la cual cambios en uno, llevan a cambios correspondientes en el otro. Por ejemplo, los terapeutas deberían estar conscientes de que síntomas como la somnolencia matutina, la fatiga, y el deterioro de funciones intelectuales puede estar asociado con apneas del sueño, las cuales pueden provocar fuertes ronquidos y sueño sin descanso, así como cambios en la personalidad. O también tomar en cuenta las implicaciones de la hiperventilación (respiración en exceso de los requerimientos metabólicos) en una sesión terapéutica, como puede ser la reducción del suministro de O₂ al cerebro y, por lo tanto, el déficit cognitivo resultante puede disminuir la habilidad de un paciente o un psicólogo para entender o recordar detalles de lo que acontece durante las sesiones terapéuticas (Ley, R., 1994; revisado en Timmons, B. H. y Ley, R., 1994).

No obstante, de todos los fenómenos relacionados con la respiración, el más poderoso y atemorizador es el de la sofocación, como cualquier persona que ha estado a punto de ahogarse atestiguaría, en el que la dispnea (sensación de dificultad para

respirar) se considera un “precursor de sofocación” y un factor esencial en la etiología de los ataques de pánico (revisado en Timmons, B. H. y Ley, R., 1994).

Este aspecto bidireccional, único de la respiración, la separa de otras funciones *vitales*, esto es, la respiración es la única función fisiológica *vital* bajo directo control voluntario y autónomo. Como tal, es una conducta que está sujeta a los principios psicológicos de condicionamiento instrumental (*operante*) y Pavloviano (*clásico*) (Macdonald, S. M., Song, G. y Poon, C. S., 2007), y, por lo tanto, nos proporciona un vínculo único entre psicología y fisiología.

Pero, ¿cuáles son los mecanismos que subyacen a la generación y la modulación de la respiración en los humanos? ¿cuáles perturbaciones de estos mecanismos causan las patologías respiratorias?. Estas preguntas no pueden contestarse directamente usando a los humanos, por razones éticas y técnicas (por ejemplo, limitaciones significativas asociadas con la anatomía y la perfusión impiden el uso de técnicas de imagenología funcional). Debido a estas limitantes, los modelos *in vivo* e *in vitro* en animales no humanos son los utilizados para el estudio de la generación y la modulación de la respiración. Gracias a éstos, podemos mejorar el conocimiento de algunos mecanismos patogénicos y, de esta manera, diseñar estrategias terapéuticas más eficaces que resulten de utilidad para el paciente.

2. Anatomía y Fisiología del Sistema Respiratorio

La función principal del sistema respiratorio es extraer O₂ del aire atmosférico en los pulmones, transportarlo a los tejidos del cuerpo, y evacuar el exceso de dióxido de carbono (CO₂) y vapor de agua (H₂O) expulsándolo de los pulmones de regreso a la atmósfera (ver Figura 1). Este es un acto motor complejo que se lleva a cabo de manera rítmica e involucra varias decenas de músculos, las cuales pertenecen a tres grupos funcionales principales (Hilaire, G. y Pásaro, R., 2003):

- 1) **Diafragma.** Este músculo inspiratorio principal y único para los mamíferos está insertado entre las costillas inferiores y actúa como una bomba moviéndose de arriba a abajo dentro de la caja torácica. Sus contracciones son directamente responsables de mandar aire a los pulmones.
- 2) **Músculos “accesorios”.** Existen varios pares de músculos, como los intercostales internos y externos, escalenos, costales ascensores, y músculos abdominales. Aunque a menudo se les clasifica como músculos respiratorios “accesorios”, juegan un papel importante ya que dan rigidez a la caja torácica y así determinan la eficiencia de las contracciones del diafragma.
- 3) **Músculos de las vías aéreas superiores.** La laringe, la faringe, la lengua y los músculos genioglosos controlan la apertura y cierre rítmico de las vías aéreas superiores. Sus contracciones regulan la tasa a la cual el aire fluye dentro y fuera de los pulmones.

Un acto respiratorio eficiente no se puede lograr sin la contracción coordinada de todos estos músculos respiratorios, y esta coordinación se lleva a cabo a niveles centrales y periféricos. Dichos músculos están comandados por neuronas motoras

(motoneuronas) localizadas en diferentes niveles del Sistema Nervioso Central (SNC). Las motoneuronas frénicas que controlan el diafragma se localizan en el asta ventral de la médula cervical, las motoneuronas abdominales y de la caja torácica se localizan en el asta ventral de los segmentos torácico-lumbares y las motoneuronas de las vías aéreas superiores se localizan al nivel craneal. Todas estas motoneuronas se manejan rítmicamente por un comando central ejercido por los llamados centros respiratorios, una red de interneuronas agrupadas en el tallo cerebral (ver más adelante) (Hilaire, G. y Pásaro, R., 2003).

2.1 Ciclo Respiratorio

En condiciones *in vivo*, se ha establecido que el ciclo respiratorio puede dividirse en tres etapas sucesivas (Richter, D. W., 1982; Hilaire, G. y Pásaro, R., 2003):

- 1) **Etapa I (Inspiración)**. Durante la cual el diafragma y los otros músculos inspiratorios de la caja torácica se contraen (ver Figura 1A);
- 2) **Etapa I-E (corresponde a la transición entre Inspiración y Espiración)**. Durante la cual los músculos inspiratorios dejan de contraerse progresivamente mientras que los músculos espiratorios de la laringe se contraen para controlar el flujo de aire fuera de los pulmones; y
- 3) **Etapa E (Espiración pasiva)**. Durante la cual el diafragma y los otros músculos inspiratorios de la caja torácica se relajan gradualmente (ver Figura 1B).

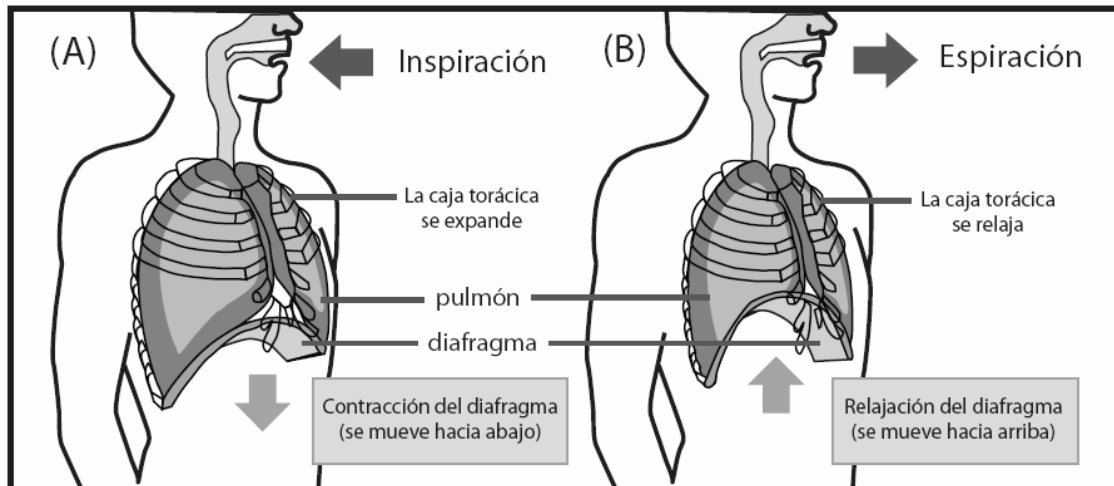


Figura 1. ¿Cómo respiramos? La respiración se produce por un proceso de inspiración y espiración. **A)** Cuando la cavidad torácica se expande durante la inspiración por la contracción del diafragma y de los músculos intercostales externos, los pulmones se expanden y el aire fluye en una tasa dependiente de la resistencia de la vía respiratoria. **B)** La espiración a menudo es pasiva, especialmente en reposo, cuando los pulmones y la caja torácica retroceden a sus posiciones de equilibrio.

En base a los registros de la actividad de neuronas en el tallo cerebral que se activan rítmicamente en fase con la respiración, se han definido seis diferentes tipos de neuronas respiratorias (McCrimmon, D. R. et al., 2000; Hilaire, G. y Pásaro, R., 2003):

- 1) **Neuronas Pre-I.** Las cuales disparan en la transición entre espiración e inspiración;
- 2) **Neuronas Early-I.** Las cuales disparan desde el inicio hasta la mitad de la inspiración;
- 3) **Neuronas I.** Las cuales disparan durante toda la inspiración;
- 4) **Neuronas Late-I.** Las cuales están activas al final de la inspiración;
- 5) **Neuronas Post-I (o Early-E).** Las cuales disparan durante la etapa de transición de la inspiración a la espiración (fase IE); y
- 6) **Neuronas E.** Las cuales disparan durante la espiración.

Siendo predominantes las Neuronas I y las Neuronas E (ver Figura 2) (McCrimmon, D. R. et al., 2000).

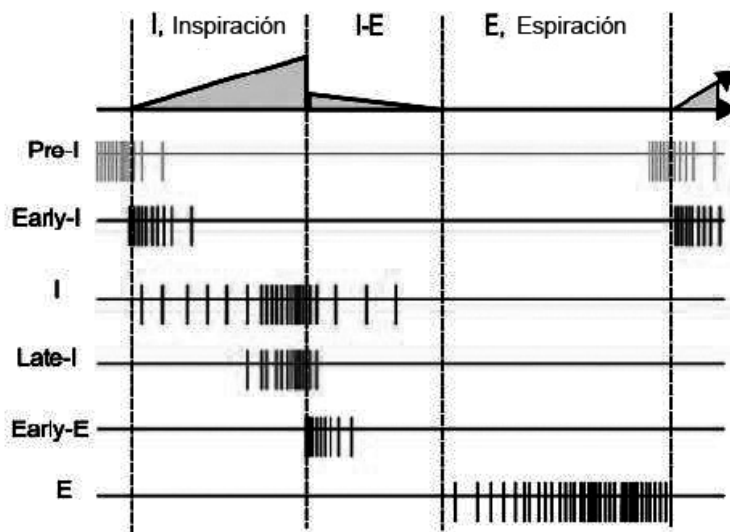


Figura 2. Modelo de la red respiratoria del tallo cerebral del gato adulto. Se muestran los patrones de descarga del nervio frénico (área gris en la parte de arriba) y de neuronas respiratorias del tallo cerebral (trazo en la parte de enmedio) que se usaron para distinguir tres etapas en el ciclo respiratorio [Inspiración (I), transición de inspiración-espирación (I-E), y espiración (E)] y seis tipos de neuronas respiratorias (Pre-I, Early-I, I, Late-I, Early-E y E) (Tomado de Hilaire, G. y Pásaro, R., 2003).

2.2 Centros Respiratorios en el Tallo Cerebral

Como se mencionó anteriormente, la respiración está comandada y regulada por el SNC, específicamente por los llamados “centros respiratorios” en el tallo cerebral (Bianchi, A. L., Denavit-Saubié, M. y Champagnat, J., 1995; Richter, D. W. y Spyer, K. M., 2001; Feldman, J. L., Mitchell, G. S. y Nattie, E. E., 2003; Peña, F. y Garcia, O., 2006). Las neuronas respiratorias, definidas como aquellas que disparan su potencial de acción en fase con el ritmo respiratorio (McCrimmon, D. R. et al., 2000; Hilaire, G. y Pásaro, R., 2003), se concentran en tres regiones medulares distintas descritas a continuación:

2.2.1 Centro Neumotáxico

Esta región consiste del núcleo respiratorio localizado en el puente, como el núcleo parabraquial y el núcleo Kölliker-Fuse, también conocido como el centro neumotáxico (ver Figura 3) (Bianchi, A. L., Denavit-Saubié, M. y Champagnat, J., 1995; Richter, D. W. y Spyer, K. M., 2001; Peña, F. y Garcia, O., 2006). Estas neuronas propiobulbares no son esenciales para la generación del ritmo respiratorio pero lo enlentecen, influyen en la temporalidad de las fases respiratorias y regulan el flujo de entrada de aire a los músculos durante el ejercicio y el sueño (Bianchi, A. L., Denavit-Saubié, M. y Champagnat, J., 1995; Richter, D. W. y Spyer, K. M., 2001; Peña, F. y Garcia, O., 2006).

2.2.2 Grupo Respiratorio Dorsal (GRD)

Esta región respiratoria secundaria se localiza en la parte dorsal de la médula oblonga, en la vecindad ventrolateral del núcleo del tracto solitario (NTS), también conocido como el Grupo Respiratorio Dorsal (GRD) (ver Figura 3). El cual contiene neuronas bulboespinales inspiratorias estrechamente relacionadas con el procesamiento de la información de retroalimentación (Peña, F. y Garcia, O., 2006). Estas neuronas reciben aferencias vagales de adaptación lenta y rápida de receptores pulmonares y quimiorreceptores carótidos (Bianchi, A. L., Denavit-Saubié, M. y Champagnat, J., 1995; Richter, D. W. y Spyer, K. M., 2001; Feldman, J. L., Mitchell, G. S. y Nattie, E. E., 2003; Peña, F. y Garcia, O., 2006).

2.2.3 Grupo Respiratorio Ventral (GRV)

Finalmente, existe un grupo de neuronas heterogéneas (por ejemplo, neuronas espiratorias vs. inspiratorias, propiobulbares vs. bulboespinales o motoneuronas

craneales) en la médula ventrolateral, en la vecindad del núcleo ambiguo (NA), llamado Grupo Respiratorio Ventral (GRV), que a su vez se divide en el Grupo Respiratorio Ventro-rostral (GRVr) y el Grupo Respiratorio Ventro-caudal (GRVc) (ver Figura 3).

2.2.3.1 Grupo Respiratorio Ventro-Rostral (GRVr)

Incluye el complejo Bötzing, el complejo pre-Bötzing (CPB) y el Grupo Respiratorio Parafacial (GRPF) (ver Figura 3). Mientras que el complejo Bötzing contiene un grupo mayor de neuronas espiratorias inhibitorias (Duffin, J., Tian, G. F. y Peever, J. H., 2000), el CPB y el GRPF parecen contener una población heterogénea de neuronas respiratorias. Algunas de éstas tienen propiedades marcapaso que se consideran importantes para la generación del ritmo respiratorio (ver más adelante) (Onimaru, H., Arata, A. y Homma, I., 1988; Smith, J. C. et al., 1991; Rekling, J. C. y Feldman, J. L., 1998; Onimaru, H. y Homma, I., 2003; Peña, F. et al., 2004; Janczewski, W. A. y Feldman, J. L., 2006).

2.2.3.2 Grupo Respiratorio Ventro-Caudal (GRVc)

Está representado por el núcleo retroambiguo (NRA) (ver Figura 3) y contiene, principalmente, neuronas premotoras espiratorias (Shen, L. y Duffin, J., 2002).

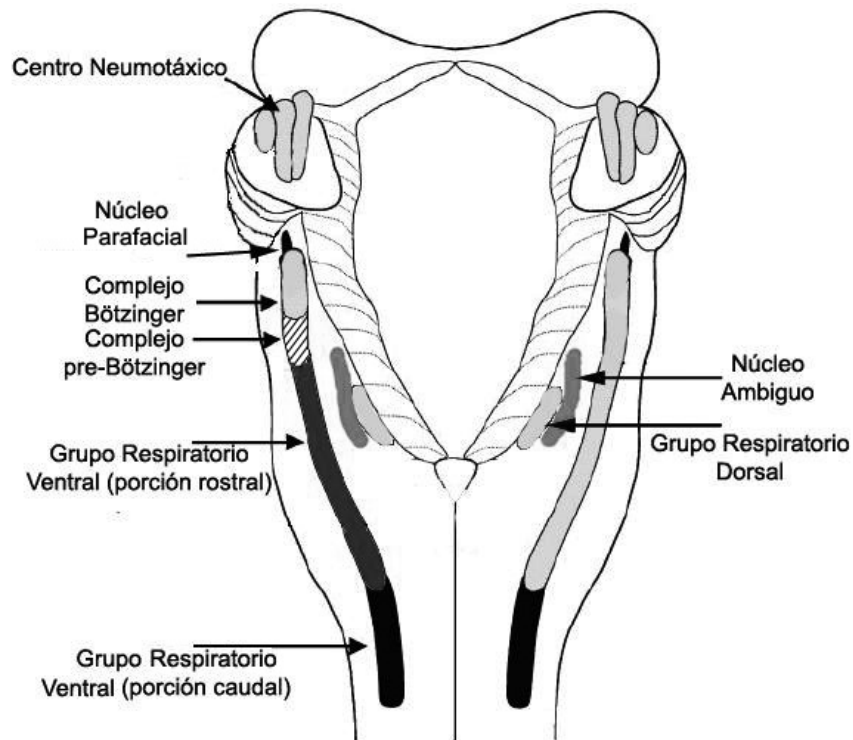


Figura 3. Centros Respiratorios en el tallo cerebral. Vista dorsal del tallo cerebral en donde se muestra la localización del Centro Neumotáxico y de los Grupo Respiratorios Ventral y Dorsal. El área de las líneas diagonales indica la región crítica para la generación del ritmo respiratorio: el Complejo pre-Bötzinger (Adaptada de Rekling, J. C. y Feldman, J. L., 1998).

Como se acaba de mencionar, los mamíferos, incluyendo los seres humanos, pueden mantenerse vivos respirando rítmicamente; sin embargo, no se sabía mucho acerca de cómo se logra realizar esta función hasta la muerte, hasta que algunos datos *in vitro* estuvieron disponibles (ver Apéndice I) donde se identificó el circuito generador del ritmo respiratorio.

3. Circuito Generador del Ritmo Respiratorio

3.1 El Complejo pre-Bötzinger (CPB)

Los movimientos respiratorios en los mamíferos son generados por una red de neuronas localizadas dentro del grupo rostro-ventro lateral del tallo cerebral que producen un patrón rítmico de actividad neuronal. Este “corazón neuronal” que genera el ritmo respiratorio se localiza en el CPB (Smith, J. C. et al., 1991).

3.1.1 Descubrimiento del CPB

El CPB, originalmente identificado en un estudio publicado por Smith, J. C. y colaboradores (1991), es una pequeña región localizada caudalmente al núcleo parafacial (NPF) y al complejo Bötzinger, y rostralmente a la división semicompacta del NA y al núcleo de la formación reticular lateral (NRL) (ver Figura 4).

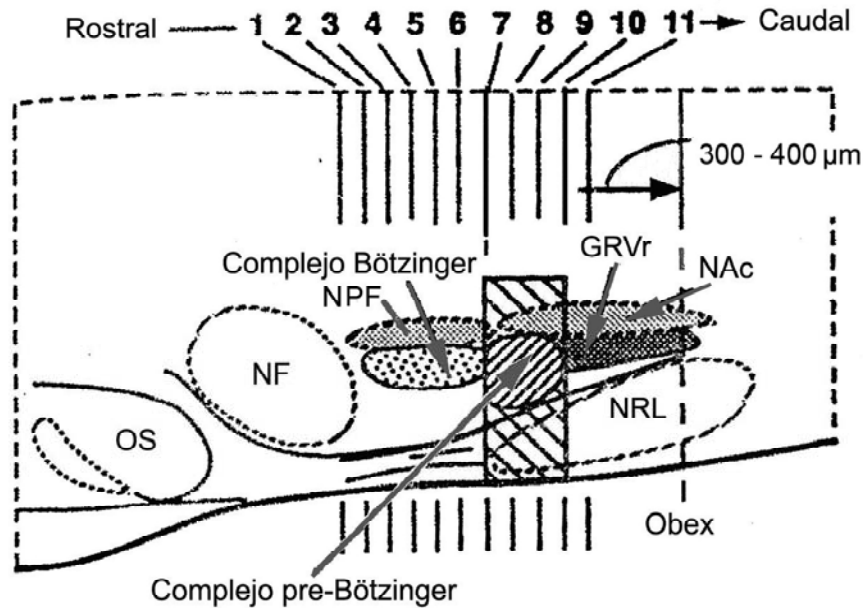


Figura 4. Localización del CPB. Vista sagital del tallo cerebral de rata neonata en la que se muestra al complejo pre-Bötzing junto con las estructuras que lo rodean. El área de la ventanilla rectangular indica la región crítica para la generación del ritmo: el Complejo pre-Bötzing (área sombreada). Abreviaturas: OS (Oliva Superior); NF (Núcleo Facial); NRL (Núcleo Reticular Lateral); NPF (Núcleo Parafacial); GRVr (Grupo Respiratorio Vento-rostral) y NAc (división semi-compacta del Núcleo Ambiguo caudal) (Tomado de Smith, J. C. et al., 1991).

Durante sus investigaciones, Smith, J. C. y colaboradores (1991) utilizaron preparaciones *in vitro* de tallo cerebral y médula espinal de ratas neonatas (preparación *en bloc*) (ver Apéndice I) e hicieron cortes sucesivos en dirección rostrocaudal y caudorostral de 50 a 75 μm de espesor mientras monitoreaban la salida motora en el nervio frénico (fuente de inervación del diafragma). A partir de estos cortes, encontraron un área localizada entre un punto rostral con respecto al óbex (la región extrema rostral del cuarto ventrículo) y caudal respecto al NPF y al complejo Bötzing. Esta zona, de aproximadamente 350 μm de longitud, es capaz de generar una salida motora aún en ausencia del resto de las estructuras que forman parte del tallo cerebral. De esta manera, Smith, J. C. y colaboradores (1991) lograron aislar al CPB en rebanadas transversales de tallo cerebral (350 a 700 μm de espesor). Además, lograron identificar tres clases de neuronas: 1) premotoneuronas bulboespinales que proyectan al

núcleo motor frénico, 2) interneuronas propiobulbares con conexiones directas a las regiones medulares más caudales; y 3) motoneuronas vagales. Las rebanadas contienen no solo al CPB, sino también el núcleo espinal del trigémino [5SP, por sus siglas en inglés (5-Spinal Trigeminal)], el núcleo dorsal motor del nervio vago (X), la oliva inferior (OI), el NA y el núcleo del nervio hipogloso (XII). En estos dos últimos núcleos es posible registrar la salida motora generada por las neuronas del CPB (Smith, J. C. et al., 1991) (ver Figura 5).

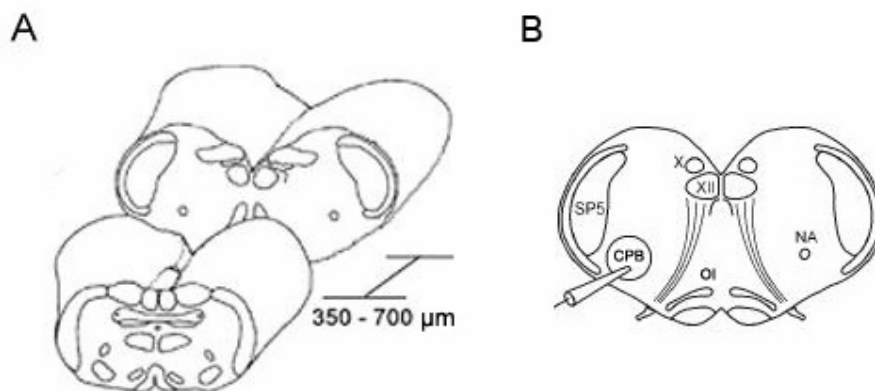


Figura 5. Vista caudo-rostral del tallo cerebral. A) La zona removida en el centro corresponde a la rebanada que contiene al CPB y que se muestra a su derecha. **B)** Representación de rebanada en corte transversal del tallo cerebral de ratón neonato mostrando la localización del CPB sobre el cual se muestra colocado un electrodo de registro para la actividad poblacional neuronal. Se muestran las estructuras vecinas al CPB que aparecen a este nivel del tallo: SP5 (núcleo espinal del trigémino), XII (núcleo del nervio hipogloso), X (núcleo dorsal motor del nervio vago), NA (núcleo ambiguo) y OI (oliva inferior) (Adaptada de Ramirez, J. M. et al., 1997 y de Lieske, S. P. et al., 2000).

Este descubrimiento permitió el desarrollo de preparaciones *in vitro* de rebanadas rítmicas de tallo cerebral-médula espinal de roedores neonatos y jóvenes (Smith, J. C. et al., 1991; Ramirez, J. M., Quellmalz, U. J. y Richter, D. W., 1996), las cuales contienen este complejo y se han convertido en importantes preparaciones experimentales para el análisis de los mecanismos celulares y de red para la generación del ritmo respiratorio. Dada la importancia funcional de esta región, se ha convertido en el mayor foco de investigación en el campo del control neuronal de la respiración.

3.1.2 Función y Características del CPB

El CPB se compone de un grupo de neuronas con propiedades intrínsecas diversas que son esenciales para la generación del ritmo respiratorio de los mamíferos (Rekling, J. C. y Feldman, J. L., 1998; Feldman, J. L., Mitchell, G. S. y Nattie, E. E., 2003). Las neuronas en el CPB son necesarias y suficientes para generar el ritmo respiratorio *in vitro* (Rekling, J. C. y Feldman, J. L., 1998; Smith, J. C. et al., 1991). Experimentos donde se utilizaron registros electrofisiológicos y manipulaciones farmacológicas [por ejemplo, inducción de hipoxia mediante cianuro de sodio en gatos adultos (Solomon, I. C., Edelman, N. H. y Neubauer, J. A., 2000); depresión del ritmo respiratorio mediante morfina en ratas (Takita, K. et al., 2000); modificación del ritmo respiratorio con la neurotoxina saporina (SAP) asociada a sustancia P (SP) (SAP-SP) (Wenninger, J. M. et al., 2004a) y eliminación transitoria del ritmo mediante kainato en conejos (Pantaleo, T., Bongianni, F. y Mutolo, D., 2005), inducen un decremento en la actividad neuronal e influyen en el ritmo respiratorio o lo eliminan por completo] confirmaron que el CPB está fuertemente implicado en la generación del ritmo respiratorio (Smith, J. C. et al., 1991; Ramirez, J. M. et al., 1998a; Solomon, I. C., Edelman, N. H. y Neubauer, J. A., 1999; Gray, P. A. et al., 2001). Además, lesionarlo (*in vivo* e *in vitro*), o eliminarlo, interrumpe la actividad inspiratoria (Hsieh, J. H. et al., 1998; Koshya, N. y Guyenet, P. G., 1996; Ramirez, J. M. et al., 1998a; Solomon, I. C., Edelman, N. H. y Neubauer, J. A., 1999) y provoca la desaparición de la salida motora respiratoria, ya sea transitoria o permanentemente (Smith, J. C. et al., 1991; Ramirez, J. M. et al., 1998a; Wenninger, J. M. et al., 2004b; Pantaleo, T., Bongianni, F. y Mutolo, D., 2005). Por lo tanto, la red oscilatoria contenida en el CPB es “necesaria” para la generación y regulación del ritmo respiratorio. El mismo puede mantenerse en preparaciones de rebanadas de tallo cerebral de roedores neonatos que generan actividad

motora relacionada con la inspiración, lo que lo hace “suficiente” para la generación del ritmo respiratorio (Del Negro, C. A. et al., 2001).

El CPB es una columna bilateralmente simétrica; no obstante, cada lado de esta columna es capaz de generar el ritmo respiratorio independientemente del otro, y hay fuertes conexiones sinápticas que sincronizan la actividad de ambos lados (McCrimmon, D. R. et al., 2000). Otra característica importante del CPB es que posee quimiosensibilidad intrínseca, lo que le permite generar una respuesta a la hipoxia cuando es estimulado directamente (Solomon, I. C., Edelman, N. H. y Neubauer, J. A., 2000; Thoby-Brisson, M. y Ramirez, J. M., 2000; Peña, F. et al., 2004; Tryba, A. K., Peña, F. y Ramirez, J. M., 2006).

Una característica que define al CPB como estructura es que sus células funcionales pueden ser definidas anatómicamente por la subpoblación de neuronas respiratorias propiobulbares dentro de la columna respiratoria ventro-lateral que expresan el receptor para la neurocinina-1 [NK1R, por sus siglas en inglés (NeuroKinin-1 Receptor)] (Gray, P. A. et al., 1999, 2001; Guyenet, P. G. y Wang, H., 2001), por lo que son una población definida y localizable mediante inmunodetección (Gray, P. A. et al., 1999; Guyenet, P. G. y Wang, H., 2001; Pagliardini, S., Ren, J. y Greer, J. J., 2003). Además, las neuronas que expresan NK1R se pueden lesionar específicamente por la SP conjugada a la SAP (SP-SAP) (Gray, P. A. et al., 2001). Estas lesiones dan como resultado un patrón de respiración atáxico, donde las ratas son hipóxicas e hipercápnicas, además de presentar una sensibilidad reducida al CO₂. Estos efectos únicamente ocurrieron con la reducción >80% de neuronas que expresan NK1R en el CPB. Gray, P. A. y colaboradores (2001) concluyeron que “... la respiración normal en mamíferos requiere un CPB intacto, con un papel necesario de neuronas que expresan NK1R...”.

3.2 Contrastes Anatómicos de la Generación del Ritmo Respiratorio

Como se mencionó anteriormente, el circuito neuronal central que subyace a la generación del ritmo respiratorio en mamíferos se localiza en el tallo cerebral en una región llamada CPB (Smith, J. C. et al., 1991). A diferencia del GRPF, u otras áreas también sugeridas de jugar un papel en la respiración, la función vital del CPB en la generación del ritmo respiratorio se demuestra por la evidencia de que la salida respiratoria rítmica del tallo cerebral se elimina cuando el CPB se extirpa (Smith, J. C. et al., 1991; Ramirez, J. M. et al., 1998a; Wenninger, J. M. et al., 2004b). Además, perturbaciones de la función neuronal en y alrededor del CPB interrumpen severamente la respiración en mamíferos adultos (Hsieh, J. H. et al., 1998; Ramirez, J. M. et al., 1998a). Actualmente está bajo investigación si el CPB coopera con el GRPF en la generación del ritmo respiratorio, o cuál es el oscilador primario (Solomon, I. C., Edelman, N. H. y Neubauer, J. A., 1999; Onimaru, H. y Homma, I., 2003; Janczewski, W. A. y Feldman, J. L., 2006). Recientemente, se ha debatido acerca de dos modelos diferentes de generación de ritmo respiratorio: uno propone que el GRPF es el principal oscilador que transmite el ritmo al CPB (apoyador por Onimaru, H. y Homma, I., 2003) y el otro sugiere que, mientras que el CPB es el generador del ritmo inspiratorio, el GRPF genera el ritmo espiratorio (apoyado por Janczewski, W. A. y Feldman, J. L., 2006). Ya sea el CPB, el GRPF, o ambos los responsables, aún existe cierta controversia acerca de los mecanismos celulares implicados en este proceso.

4. Eupnea, Suspiros y Boqueos

El sistema respiratorio de los mamíferos puede generar diferentes patrones de respiración, que incluyen la eupnea, los suspiros y los boqueos. Estos patrones son identificables en todos los mamíferos desde el día de su nacimiento (St John, W. M., 1996). Existen diferencias muy claras que pueden ser medidas experimentalmente y que los hacen distintos entre ellos; estas diferencias *in vivo* han sido utilizadas para caracterizar sus respectivos correlatos *in vitro*, que se pueden diferenciar farmacológicamente (Lieske, S. P. et al., 2000).

4.1 Eupnea

El patrón respiratorio que se observa en reposo y se expresa bajo condiciones fisiológicas normales se denomina eupnea (St John, W. M., 1996). *In vivo*, la eupnea se caracteriza por un patrón de aumento paulatino de la descarga de las neuronas respiratorias (Lieske, S. P. et al., 2000) y por una activación también paulatina de los músculos respiratorios (Bianchi, A. L., Denavit-Saubié, M. y Champagnat, J., 1995; Ramirez, J. M. et al., 1998a). *In vitro*, registros de la actividad poblacional del CPB en roedores revelaron dos patrones distintos de actividad inspiratoria bajo condiciones de oxigenación normal: eupnea y suspiros (ver Figura 6) (ver más abajo). La eupnea se caracterizó por un aumento en la descarga de la actividad poblacional que se presentó en forma de campana; las actividades neuronales durante este patrón de disparo incluían células con actividades pre-inspiratorias, post-inspiratorias o espiratorias. Como se acaba de mencionar, este es el criterio que define eupnea *in vivo* (Lieske, S. P. et al., 2000) y, como la eupnea *in vivo*, este patrón se produjo por una red normóxica o

hiperóxica (Lieske, S. P. et al., 2000). Por lo tanto, Lieske, S. P. y colaboradores (2000) identificaron a este patrón *in vitro* como “eupnea ficticia”.

4.2 Suspiros (“respiración aumentada”)

El patrón respiratorio donde esfuerzos inspiratorios mayores están por encima de la eupnea se denomina suspiros o “respiración aumentada” (St John, W. M., 1996). *In vitro*, la actividad respiratoria registrada en una rebanada de tallo cerebral se caracteriza por ráfagas inspiratorias de forma bifásica (ver Figura 6):

1ra. Fase: Fase inicial indistinguible de la eupnea.

2da. Fase: Fase distinta de mayor amplitud.

La cual es seguida por una apnea breve (pausa de la respiración) que ocurre a bajas frecuencias que como resultado retrasa el disparo eupneico subsecuente, define los suspiros o “respiración aumentada” (Lieske, S. P. et al., 2000). Por lo tanto, Lieske, S. P. y colaboradores (2000) proponen que el patrón *in vitro* representa un “suspiro ficticio”.

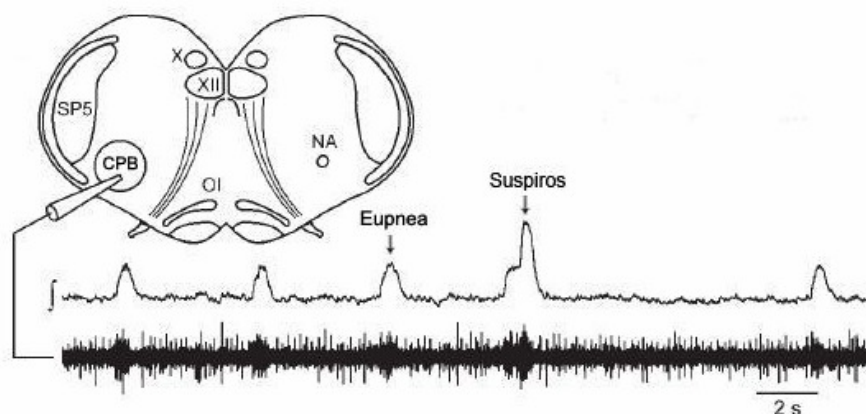


Figura 6. Caracterización de dos patrones de actividad *in vitro* representando una forma ficticia de eupnea y suspiros. Representación esquemática de la rebanada transversal que contiene el CPB, de donde se registra la actividad poblacional (trazo inferior) y la integrada (trazo superior). Nótese la presencia de ráfagas con dos amplitudes distintas: una ráfaga de pequeña amplitud, representando la actividad eupneica, y una ráfaga bifásica con componentes de pequeña y gran amplitud, correspondiente a los suspiros (Tomado de Lieske, S. P. et al., 2000).

4.3 Boqueos

Condiciones hipóxicas o anóxicas llevan a un aumento inicial en la frecuencia de la eupnea y los suspiros, seguida por una depresión y apnea primaria que dura segundos o minutos, y la reaparición de la respiración en un tercer patrón cualitativamente distinto conocido como boqueos (ver Figura 7), que están asociados con una rápida activación de los músculos inspiratorios y una elevación en la tasa cardiaca y en el nivel de activación cortical (St John, W. M., 1990, 1996; Ramirez, J. M. et al., 1998b; Perkin, R. M. y Resnik, D. B., 2002). Se caracterizan por esfuerzos inspiratorios cortos de comienzo más rápido y de menor amplitud que se entremezclan con pausas espiratorias largas (St John, W. M., 1990; Lieske, S. P., Thoby-Brisson, M. y Ramirez, J. M., 2001). Algunos investigadores reportan una transición gradual de la forma de la ráfaga seguida de una apnea (Lieske, S. P. et al., 2000) antes del comienzo de los boqueos, mientras que otros reportan transiciones sutiles sin que intervenga una apnea, refiriéndose al patrón de transición como “pre-boqueos” (ver Figura 7).

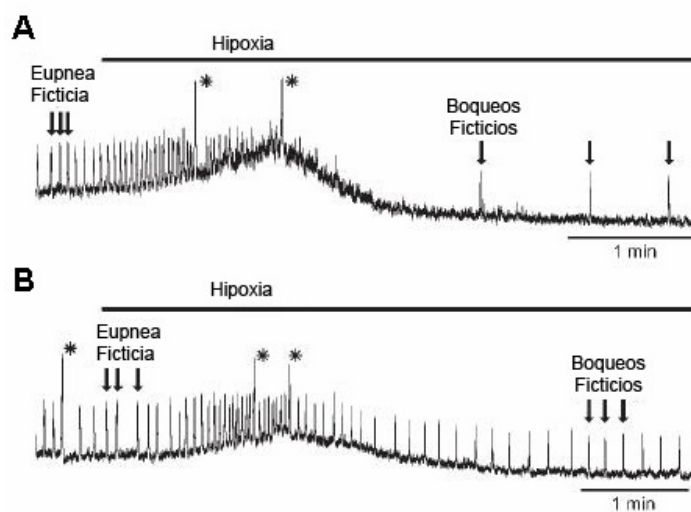


Figura 7. Caracterización de un tercer patrón de actividad *in vitro* representando los boqueos ficticios (A, B). La respuesta anóxica, con (A) y sin (B) apnea (cese de la actividad respiratoria) interviniendo entre la eupnea y los boqueos (indicado por las flechas). Los asteriscos indican suspiros. Nótese el incremento en la frecuencia de la actividad eupneica y de los suspiros durante el inicio de la fase de aceleración (Tomado de Lieske, S. P. et al., 2000).

Usando rebanadas medulares transversales de ratones, se puede comparar la actividad poblacional del GRV durante normoxia e hipoxia. Cuando el O₂ se reemplaza por nitrógeno (anoxia), la actividad respiratoria sufre una transformación muy similar a la respuesta hipóxica *in vivo*, consistiendo de un aumento inicial y una depresión subsecuente. En la fase de depresión, los boqueos se caracterizaron por un cambio en la morfología de la ráfaga poblacional, de forma de campana en normoxia a un patrón de descarga súbita y decremento posterior en hipoxia (Lieske, S. P. et al., 2000) que se refleja en diferencias significativas en el tiempo de subida y la duración de la ráfaga muy similares a los observados *in vivo* (Wang, W., Fung, M. L. y St John, W. M., 1993; Fung, M. L., Wang, W. y St John, W. M., 1994; Lieske, S. P., Thoby-Brisson, M. y Ramirez, J. M., 2001). Esto es, con un decremento en el tiempo de subida de la actividad inspiratoria y una disminución de la duración y frecuencia de la ráfaga sin espiraciones subsecuentes (ver Figura 8) (Fung, M. L., Wang, W. y St John, W. M., 1994; Lieske, S. P. et al., 2000). Basados en estas similitudes, Lieske, S. P. y colaboradores (2000) proponen que la actividad producida durante anoxia prolongada *in vitro* representa “boqueos ficticios”. Esta conclusión se refuerza con la observación de que la respuesta bifásica a la hipoxia que se observa *in vivo* es prácticamente igual *in vitro*: una aceleración inicial de la eupnea y de los suspiros seguida de una depresión que da lugar a la generación de boqueos (Lieske, S. P. et al., 2000; Peña, F. et al., 2004; Tryba, A. K., Peña, F. y Ramirez, J. M., 2006).

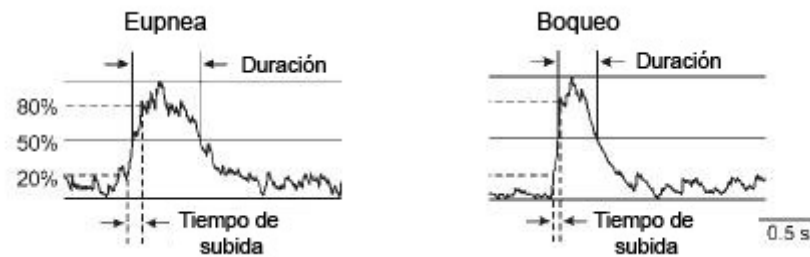


Figura 8. Actividad poblacional integrada durante el disparo de una ráfaga en normoxia (izquierda) y en hipoxia (derecha). La medida de la duración de la ráfaga se indica por líneas sólidas, y la medida del tiempo de subida de la ráfaga se indica por líneas punteadas. Nótese la reducción significativa en ambas variables bajo condiciones de hipoxia, la cual es consistente con la descripción de boqueos *in vivo* (Tomado de Lieske, S. P. et al., 2000).

Además, los boqueos son un mecanismo crítico para la supervivencia, ya que representan el último esfuerzo respiratorio que genera un mecanismo de autorresucitación (ver más adelante) (Deshpande, P. et al., 1999) cuando la eupnea falla (St John, W. M., 1996; Gozal, D. et al., 2002; Peña, F. y Ramirez, J. M., 2005). Si ésta falla, deviene finalmente la apnea terminal (Gozal, D. et al., 2002), la cual se caracteriza por el paro irreversible y, finalmente, la muerte del organismo. La duración de la fase de boqueos varía, puede ser tan breve como uno o dos boqueos a un periodo prolongado de boqueos que dura minutos o incluso horas, dependiendo de la edad del animal o de un fallo cardíaco. De hecho, en cualquier caso en el que se presente la hipoxia, “los boqueos son un requisito natural para la respiración normal” (St John, W. M., 1996). Finalmente, es importante mencionar que, una de las principales hipótesis para explicar el SIDS (ver más adelante) es: los niños que mueren de SIDS tienen una deficiencia en los mecanismos que generan los boqueos, llevando a un fallo en la autorresucitación (Poets, C. F. et al., 1999; Peña, F. y Ramirez, J. M., 2005; Peña, F. y Garcia, O., 2006).

De esta manera, la presencia de diferentes patrones respiratorios (eupnea, suspiros y boqueos) en la rebanada de tallo cerebral resulta un muy buen modelo

experimental para el estudio de los ritmos respiratorios, y plantea problemas interesantes como: ¿cuáles son los mecanismos generadores del ritmo que diferencia la actividad eupneica de boqueos?, ¿cuáles son los mecanismos celulares que transforman la red neuronal de estado eupneico a boqueos durante la hipoxia? y, ¿cuál es el papel de otras áreas relacionadas con la respiración en modular estos dos patrones motores?.

5. Respuesta Respiratoria a la Hipoxia

El O₂ es esencial para la homeostasis y la supervivencia de las células en todos los organismos aeróbicos (Peña, F. y Ramirez, J. M., 2005). Una falta de O₂ puede ser perjudicial y puede, eventualmente, llevar a la muerte del organismo. Mientras que algunas tortugas y peces pueden sobrevivir condiciones anóxicas por varias semanas (Ramirez, J. M., Folkow, L. P. y Blix, A. S., 2007), los mamíferos toleran dos horas de apnea como máximo, y los pájaros, incluso menos. Por lo tanto, no es de sorprender que diversas estrategias han evolucionado para asegurar un suministro de O₂ adecuado y para detectar y responder a cambios en los niveles de O₂. Para responder adecuadamente a los cambios en el estado de oxigenación, los animales requieren mecanismos internos que detecten el O₂ (Ramirez, J. M., Folkow, L. P. y Blix, A. S., 2007). La detección de los niveles de O₂ ocurre a través de neuronas u otras células que incrementan su actividad durante la hipoxia y se mide en la periferia, mientras que el CO₂ se mide en el SNC (Ramirez, J. M., Folkow, L. P. y Blix, A. S., 2007).

También hay neuronas que necesitan ser resistentes a la hipoxia. Algunas de estas neuronas resistentes a la hipoxia se comportan como clásicos quimiosensores a O₂. Estos sensores centrales a O₂ probablemente monitorean los niveles de O₂ cerebrales y,

cuando se activan, coordinan funciones críticas necesarias para la supervivencia de todo el organismo, como lo es la respiración (Neubauer, J. A. y Sunderram, J., 1996; Peña, F. y Ramirez, J. M., 2005).

La hipoxia es un estado en el cual la disponibilidad de O₂ es deficiente en el cerebro y en otros órganos y tejidos del cuerpo. Esta condición puede ser causada por una reducción en la presión parcial de O₂ (PO₂) en el ambiente, por el transporte de O₂ inadecuado o por la incapacidad de los tejidos para usar el O₂ (Neubauer, J. A. y Sunderram, J., 1996; Peña, F. y Ramirez, J. M., 2005; Ramirez, J. M., Folkow, L. P. y Blix, A. S., 2007).

La hipoxia a menudo es un estado del organismo, no del ambiente. La distinción entre hipoxia del organismo y del ambiente no es siempre directa. La hipoxia del organismo puede ocurrir en un ambiente normóxico, por ejemplo, bajo condiciones clínicas o en hibernación. Además, los organismos adaptados que viven en altitudes mayores y en madrigueras subterráneas que son bajas en O₂ pueden crear un ambiente interno que no es hipóxico (Ramirez, J. M., Folkow, L. P. y Blix, A. S., 2007).

Cada año, cientos de miles de humanos se ven afectados por diversas condiciones hipóxicas. Las condiciones hipóxicas se asocian a menudo con cambios ambientales específicos (como aquellos que ocurren durante un ascenso a altitudes mayores) o a diversas condiciones patológicas, como aquellas asociadas con la insuficiencia de flujo sanguíneo a los tejidos (hemorragias cerebrovasculares, oclusiones vasculares, paros cardiacos, isquemias miocárdicas y cirugía coronaria) o trastornos respiratorios (obstrucción de las vías aéreas, apneas del sueño, bronquitis crónica, disfunción y/o enfisema pulmonar, asma, fallo en el control neuronal, apneas recurrentes en bebés prematuros y SIDS) (Peña, F. y Ramirez, J. M., 2005; Ramirez, J. M., Folkow, L. P. y Blix, A. S., 2007).

5.1 Hipoxia Aguda, Intermitente y Crónica

Las respuestas a la hipoxia pueden ser agudas, intermitentes o crónicas y son considerablemente diferentes entre ellas.

5.1.1 Hipoxia Aguda

Las respuestas a la hipoxia pueden ser agudas (durando segundos a minutos) debido a bajadas súbitas en los niveles ambientales de PO_2 o a paros cardiacos súbitos. Por ejemplo, los mamíferos que bucean, así como algunos que hibernan, rutinariamente experimentan hipoxia aguda (Ramirez, J. M., Folkow, L. P. y Blix, A. S., 2007).

Una de las primeras manifestaciones de la hipoxia aguda, que ocurre en segundos, es la pérdida de funciones cerebrales superiores, como aquellas que dan origen a la consciencia y a la conducta dirigida y están asociadas con la pérdida de actividad electroencefalográfica (EEG) y potenciales evocados (Peña, F. y Garcia, O., 2006). El tiempo requerido para causar perturbaciones en las funciones conductuales (usualmente segundos) es mucho más corto que el tiempo requerido para observar cambios histopatológicos (usualmente minutos) (Peña, F. y Ramirez, J. M., 2005). Esto quizás se debe a que aquellas funciones que no son esenciales para la supervivencia inmediata se apagan, almacenando de esta manera energía metabólica; mientras que las funciones que son críticas para la supervivencia inmediata se mantienen en un modo funcional (por ejemplo, la respiración). Esto es, puede ser ventajoso aumentar inicialmente funciones autónomas que realcen el suministro de O_2 y reduzcan el consumo de O_2 .

5.1.2 Hipoxia Intermitente

La hipoxia intermitente se define en términos generales como episodios de hipoxia repetida intercalados con episodios de normoxia (Neubauer, J. A., 2001). Este tipo de patrón hipóxico se observa en la apnea del sueño obstructiva [OSA, por sus siglas en inglés (Obstructive Sleep Apnea)] (ver Apéndice II).

La hipoxia intermitente crónica incrementa significativamente la masa cardiaca del ventrículo derecho, probablemente asociada con la remodelación vascular pulmonar e hipertensión pulmonar (Peña, F. y Ramirez, J. M., 2005). También existen efectos perjudiciales en el desarrollo normal, especialmente en el feto; ya que está bien establecido que la hipoxia intermitente decreta significativamente el crecimiento fetal (Peña, F. y Ramirez, J. M., 2005). Además, tiene consecuencias a largo plazo, incluyendo problemas de hipertensión, cerebrales y coronarios, déficits neurocognitivos y del desarrollo y, neurodegeneración causada por efectos acumulativos de ataques persistentes de hipoxia (Neubauer, J. A., 2001; Peña, F. y Ramirez, J. M., 2005). En modelos animales, la hipoxia intermitente lleva a neurodegeneración, inflamación y aprendizaje espacial dañado.

Relevante para SIDS, tanto la hipoxia intermitente prenatal como postnatal temprana, afecta negativamente los mecanismos generadores de boqueos y la capacidad para autorresucitar se ve marcadamente reducida (Guntheroth, W. G. y Kawabori, I., 1975; Fewell, J. E. et al., 2000; Gozal, D. et al., 2002).

A pesar de los efectos perjudiciales de la hipoxia intermitente, también se han usado protocolos de hipoxia intermitente en humanos debido a sus efectos benéficos. Por ejemplo, se ha mostrado que el entrenamiento de hipoxia intermitente tiene un efecto anti-aritmico significativo en isquemia miocárdica aguda en animales conscientes; previene arterioesclerosis experimental en conejos; es un estímulo efectivo

para eritropoietina (una hormona que estimula la formación de glóbulos rojos) producida en humanos y ratas y, en la red respiratoria, produce un incremento a largo plazo en la respiración normóxica (Peña, F. y Ramirez, J. M., 2005).

5.1.3 Hipoxia Crónica

Las respuestas a la hipoxia también pueden ser crónicas (durando horas a días). Por ejemplo, los mamíferos que viven en altitudes mayores, así como los que viven en madrigueras, rutinariamente están expuestos a hipoxia crónica (Peña, F. y Ramirez, J. M., 2005; Ramirez, J. M., Folkow, L. P. y Blix, A. S., 2007).

La hipoxia crónica puede ocurrir bajo ciertas condiciones ambientales como resultado de flujo sanguíneo insuficiente (hemorragia cerebrovascular, oclusión vascular o bypass coronario) o disfunción cerebral (obstrucción de las vías aéreas, tumores cerebrales, disfunción pulmonar o fallo de control neuronal). Las características temporales de la hipoxia crónica (por ejemplo, hipoxia intermitente vs. continua) influye en cómo las neuronas y las redes neuronales se adaptan a la hipoxia crónica (Peña, F. y Ramirez, J. M., 2005; Ramirez, J. M., Folkow, L. P. y Blix, A. S., 2007).

Durante la hipoxia prolongada, la conservación de O₂ se convierte más importante que el tratar de realzar el suministro de O₂, el cual puede permanecer ausente por un periodo más largo (Peña, F. y Ramirez, J. M., 2005; Ramirez, J. M., Folkow, L. P. y Blix, A. S., 2007).

Resumiendo, el modo en el cual un organismo responde a la hipoxia depende del tipo de condiciones hipóxicas (aguda vs. crónica, intermitente vs. continua) así como de la salud y edad del organismo –nada más por nombrar algunos factores-. Por lo tanto, para generar estas respuestas adaptativas, las funciones neuronales deben ser reguladas

de una manera heterogénea (Peña, F. y Ramirez, J. M., 2005; Ramirez, J. M., Folkow, L. P. y Blix, A. S., 2007).

5.2 Respuesta Bifásica a la Hipoxia

Aunque los cambios inducidos por la hipoxia se han estudiado en muchas neuronas y redes, no hay muchas redes neuronales en las cuales es posible relacionar cambios hipóxicos a nivel celular con cambios al nivel de la red funcional. La respuesta del sistema respiratorio de los mamíferos a la hipoxia es una excepción, ya que su respuesta se puede estudiar en preparaciones *in vivo* e *in vitro* (Peña, F. y Ramirez, J. M., 2005).

La respuesta a la hipoxia del cerebro mamífero es extremadamente heterogénea. De hecho, una de las respuestas hipóxicas iniciales producidas en la mayoría de las redes neuronales es una profunda depresión de la transmisión sináptica observada *in vivo* (Richter, D. W. et al., 1991) e *in vitro* (en el CPB) (Ramirez, J. M. et al., 1998b; Lieske, S. P. et al., 2000; Peña, F. y Ramirez, J. M., 2005). Esta depresión general puede reducir el número total de neuronas activas en cualquier red neuronal y puede actuar directamente dentro del CPB en neuronas de tipo marcapaso (ver más adelante) (Peña, F. y Garcia, O., 2006).

Los efectos de la hipoxia sobre distintas funciones cerebrales en general o sobre algunos circuitos neuronales en particular no están muy bien establecidos. Principalmente porque los efectos de la disminución en la presión de O₂ varían de una estructura cerebral a otra (Haddad, G. G. y Jiang, C., 1993; Pisani, A., Calabresi, P. y Bernardi, G., 1997; Telgkamp, P. y Ramirez, J. M., 1999; Xu, L., Sapolsky, R. M. y Giffard, R. G., 2001).

Como mencionamos anteriormente, la red neuronal que controla la respiración en los mamíferos responde a la hipoxia de manera bifásica (Bureau, M. A. et al., 1984; Haddad, G. G. y Mellins, R. B., 1984; Neubauer, J. A., Melton, J. E. y Edelman, N. H., 1990; Richter, D. W. et al., 1991; England, S. J. et al., 1995; Martin, R. J. et al., 1998; Bodineau, L., Cayetanot, F. y Frugiere, A., 2000; Maxova, H. y Vizek, M., 2001). De hecho, la respuesta bifásica a la hipoxia puede demostrarse de manera más convincente en la actividad rítmica respiratoria generada espontáneamente en la preparación de rebanada transversal de tallo cerebral de ratones en todas las etapas postnatales (día postnatal (P) 0-22) (Ramirez, J. M., Quellmalz, U. J. y Richter, D. W., 1996; Ramirez, J.M. et al., 1998b; Telgkamp, P. y Ramirez, J. M., 1999; Lieske, S. P. et al., 2000; Thoby-Brisson, M. y Ramirez, J. M., 2000; Peña, F. et al., 2004), la cual tiene muchas similitudes a la respuesta del sistema intacto bajo condiciones *in vivo* (Richter, D. W. et al., 1991; England, S. J. et al., 1995; Ramirez, J. M. et al., 1998b). La primera fase consiste de una *aceleración*, caracterizada por un incremento inicial en la frecuencia y la amplitud de la eupnea y de los suspiros, que sirve como un mecanismo importante para incrementar el suministro de O₂. Si las condiciones hipóxicas continúan, entonces la aceleración es seguida por la fase de *depresión*. Se cree que esta fase de depresión almacena energía metabólica durante situaciones donde los niveles de O₂ son bajos; durante la cual la frecuencia y la amplitud del ritmo respiratorio decrementa de manera inicial para dar paso a la generación de un nuevo ritmo respiratorio llamado boqueo (ver Figura 9). Si la hipoxia continúa de manera ininterrumpida, los boqueos desaparecen y deviene la apnea hipóxica final (cese irreversible de la respiración). De hecho el último ritmo respiratorio que se presenta antes de la muerte es el boqueo.

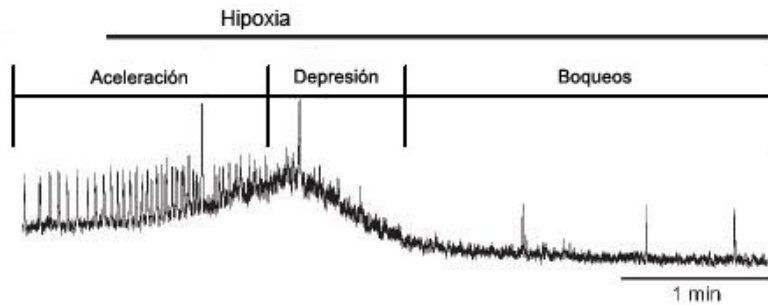


Figura 9. Respuesta bifásica a la hipoxia de la rebanada de tallo cerebral. La primera fase consiste de una *aceleración*, caracterizada por el incremento inicial de la frecuencia de la actividad eupneica y de los suspiros; si las condiciones hipóxicas continúan, entonces la aceleración es seguida por la fase de *depresión*, durante la cual la frecuencia y amplitud del ritmo respiratorio decremente de manera inicial para dar paso a la generación de boqueos (Tomado de Lieske, S. P. et al., 2000).

Aunque la respuesta bifásica a la hipoxia es generalmente estereotipada y reproducible, existe alguna heterogeneidad entre diferentes núcleos respiratorios y animales de edades diferentes.

Generalmente, los mamíferos recién nacidos son más resistentes a la hipoxia que los mamíferos adultos (Peña, F. y Ramirez, J. M., 2005). En 1953, Hicks, S. P. reportó que los roedores recién nacidos podían resistir a la hipoxia por casi una hora sin daño. Similar a otras redes respiratorias de mamíferos, la red respiratoria de neonatos es muy resistente a la hipoxia, lo cual se explica mejor por un metabolismo anaeróbico eficiente (Ballanyi, K., Volker, A. y Richter, D. W., 1994; Ramirez, J. M., Quellmalz, U. J. y Richter, D. W., 1996). Adicionalmente, el ritmo respiratorio generado en preparaciones *in vitro* persiste por varios minutos e incluso horas bajo condiciones de hipoxia en recién nacidos (Ballanyi, K., Volker, A. y Richter, D. W., 1994; Ramirez, J. M., Quellmalz, U. J. y Richter, D. W., 1996; Ballanyi, K., Onimaru, H. y Homma, I., 1999). Sin embargo, se ha observado que en las rebanadas de tallo cerebral provenientes de neonatos mayores a 7 días se genera la apnea hipóxica en condiciones de hipoxia prolongada (Ramirez, J. M., Quellmalz, U. J. A. y Wilken, B., 1997).

La capacidad glicolítica puede ser un importante determinante de la supervivencia neuronal en la hipoxia prolongada y puede explicar parcialmente las diferencias en la tolerancia a la hipoxia entre edades y subtipos de neuronas (Peña, F. y Ramirez, J. M., 2005).

5.3 Tolerancia a la Hipoxia

Un organismo responde a la hipoxia de una manera adaptativa. Sin embargo, esta respuesta no puede ser única ni estereotipada (Peña, F. y Ramirez, J. M., 2005). Todos los mamíferos desarrollan mecanismos efectivos para poder sobrellevar la disponibilidad de O₂ reducido (Ramirez, J. M., Folkow, L. P. y Blix, A. S., 2007). Estos animales logran la tolerancia a la hipoxia crónica y aguda por medio del metabolismo. El concepto es que un animal asume un estado hipometabólico para reducir sus requerimientos de O₂ y así evitar los efectos perjudiciales de la hipoxia, incluyendo necrosis y apoptosis. Este estado hipometabólico involucra probablemente todos los sistemas de órganos y, por lo tanto, requiere una ajustada coordinación de varios procesos ocurriendo concurrentemente. A través de la respuesta hipóxica, el organismo activa o desactiva diversos mecanismos continuamente, dependiendo si una cierta función se mantiene, altera o interrumpe. Algunas células permanecen activas metabólicamente, mientras que otras se apagan o dependen de metabolismo anaeróbico que puede ser el responsable del incremento en la tolerancia a la hipoxia de mamíferos neonatos (Peña, F. y Ramirez, J. M., 2005; Ramirez, J. M., Folkow, L. P. y Blix, A. S., 2007). Esta inhibición celular es regulada temporalmente y durante la exposición a la hipoxia, las redes celulares activas continúan controlando funciones vitales.

Metabólicamente, los humanos que residen en altitudes mayores tienen una capacidad aeróbica máxima y un trabajo glicolítico más bajo que los humanos residentes al nivel del mar, pero la capacidad de trabajo se ve mucho menos afectada por la hipoxia aguda en residentes de tierras altas que en residentes de tierras bajas. Entonces, los humanos que residen en altitudes mayores acumulan menos lactato durante el ejercicio y tienen mejor resistencia bajo condiciones de trabajo submáximas comparada con los humanos residentes en tierras bajas. Respecto al SNC, algunos residentes de altitudes mayores tienen o generan un hipometabolismo sutil como un mecanismo de defensa contra la hipoxia (Ramirez, J. M., Folkow, L. P. y Blix, A. S., 2007).

6. Autorresucitación y Generación de Boqueos

La habilidad de los animales para alterar el patrón respiratorio de eupnea a boqueos se considera crítico para la supervivencia. En hipoxia extrema o anoxia, los animales típicamente exhiben una respuesta bifásica con actividad respiratoria primero incrementada y después declina a apnea. Esta apnea primaria se interrumpe por los boqueos. Si a los animales se les permite respirar aire u O_2 una vez que los boqueos han comenzado, ocurre la recuperación espontánea de la apnea hipóxica, es decir, el reestablecimiento de la eupnea, la cual asegura la supervivencia en la mayoría, pero no en todos los animales. Esta habilidad de los boqueos de revertir un episodio amenazante de vida se ha denominado “autorresucitación” (Adolph, E. F., 1969; Guntheroth, W. G. y Kawabori, I., 1975; Fung, M. L., Wang, W. y St John, W. M., 1994; St John, W. M., 1990, 1996; Deshpande, P. et al., 1999; Fewell, J. E. et al., 2000; Gozal, D. et al., 2002).

El proceso de recuperación de la hipoxia por medio de los boqueos primero se denominó “resucitación por uno mismo” en el año de 1969 por Adolph, E. F. y después “autorresucitación” en el año de 1975 por Guntheroth, W. G. y Kawabori, I.

Referente a los boqueos, Lumsden, T. (1923) presagió su importancia en la autorresucitación: “Mi punto de vista es que los boqueos son reliquias o restos mortales de algunos procesos respiratorios primitivos, transitorios e intermedios entre la respiración branquial y la respiración pulmonar, como cuando un pez boquea cuando se le saca del agua. Aún he visto muchos ejemplos en los que los boqueos han sido suficientes para revivir a los animales cuyos centros respiratorios superiores han fallado temporalmente; así que no me sorprendió que la facultad haya persistido en la lucha evolutiva” (Lumsden, T., 1923, pág. 364).

Además, se ha hecho énfasis de la importancia de los boqueos en la autorresucitación durante la apnea en infantes y que episodios repetidos de apnea pueden llevar al fallo de la autorresucitación. Por lo tanto, se sugiere que el fallo en la autorresucitación puede ser el evento crítico que vincula la apnea prolongada para causar la muerte en ciertos casos de SIDS (Guntheroth, W. G. y Kawabori, I., 1975; Fung, M. L., Wang, W. y St John, W. M., 1994; St John, W. M., 1990, 1996; Deshpande, P. et al., 1999; Poets, C. F. et al., 1999; Fewell, J. E. et al., 2000; Gozal, D. et al., 2002).

Cuando la autorresucitación falla, la cual resulta de la integración de muchas funciones fisiológicas, es de suponer que uno o más de los diversos sistemas de órganos que participan han fallado (Guntheroth, W. G. y Kawabori, I., 1975; Deshpande, P. et al., 1999). El retiro de O₂ atmosférico inicialmente estimula la actividad respiratoria, cardíaca y motora. Después, con hipoxemia severa (PO₂ arterial <10 Torr) ocurre una reducción abrupta en el consumo de actividad y energía por todos los órganos mayores,

particularmente en el cerebro, el corazón, y los músculos respiratorios al comienzo de la apnea hipóxica, bradicardia y el coma (Deshpande, P. et al., 1999). Posteriormente, toma lugar una transición de metabolismo oxidativo a anaeróbico, no únicamente en estos órganos, sino también en el cuerpo como un todo. Carbohidratos, almacenados como glucógeno, se convierten en la fuente principal de combustible, y el consumo reducido de energía por el corazón y otros órganos, cuando se combina con suficiente almacenaje de glucógeno, incrementa la duración de la supervivencia durante la anoxia (Deshpande, P. et al., 1999).

Sin embargo, la supervivencia máxima requiere la reoxigenación de la sangre. Aunque los boqueos, los cuales dependen de metabolismo anaeróbico, pueden persistir por un tiempo limitado en la ausencia de perfusión cerebral, se requiere suficiente circulación pulmonar y sistémica para transportar sangre oxigenada al corazón y al cerebro para la recuperación de funciones normales. Esta conclusión está apoyada por las observaciones a menudo repetidas de que la autorresucitación exitosa, o para el caso, resucitación artificial por ventilación mecánica, requiere un pequeño pero definido nivel de función cardíaca como se refleja en la presión sanguínea sistólica (Deshpande, P. et al., 1999). Así, en la autorresucitación exitosa, las funciones respiratorias y cardiovasculares están coordinadas e interdependientes. Por lo tanto, aunque hay numerosos casos teóricos de fallo de autorresucitación, dos causas primarias son: 1) el fallo circulatorio resultante de inadecuado almacenaje de glucógeno en el hígado y/o en el corazón para suministrar una adecuada perfusión a los tejidos y, 2) el fallo de los boqueos para inflar los pulmones (Deshpande, P. et al., 1999).

Gershan, W. M., Jacobi, M. S. y Thach, B. T. (1992) definieron los eventos cardiorrespiratorios que ocurren durante autorresucitaciones exitosas de apneas

hipóxicas en ratones. Estos eventos cardiorrespiratorios consistieron de tres etapas secuenciales:

Etapa I: Boqueos con bradicardia marcada e introducción de aire en los pulmones por medio de los boqueos.

Etapa II: Resucitación cardiaca con un rápido incremento en la tasa cardiaca a más de 60% de basal y transporte de O₂ de los pulmones al corazón.

Etapa III: Resucitación respiratoria con un incremento en la tasa respiratoria a más de 60% de basal y respuesta del corazón al incrementar la tasa cardiaca y salida cardiaca; y finalmente, respuesta del sistema nervioso para reoxigenación y perfusión incrementada.

Además, el número de autorresucitaciones exitosas decrementa conforme avanza la edad postnatal (Fewell, J. E. et al., 2000). Esto es, la edad postnatal influye significativamente en la duración y número total de boqueos durante una exposición única a hipoxia (Fewell, J. E. et al., 2000; Gozal, D. et al., 2002), así como en la habilidad de las ratas de autorresucitar de apneas primaria durante exposiciones repetidas a hipoxia. Mientras la edad postnatal incrementa, el tiempo del último boqueo decrementa así como el número de autorresucitaciones exitosas (Fewell, J. E. et al., 2000; Gozal, D. et al., 2002). Por días 9-10 de edad postnatal, el número de autorresucitaciones exitosas alcanza su mínimo y no cambia significativamente después de esta edad. Antes del fallo de la autorresucitación, todas las autorresucitaciones exitosas exhiben los mismos patrones cardiorrespiratorios. Inicialmente, un periodo de hiperpnea, el cual precede la apnea primaria y la bradicardia; después, los boqueos son seguidos por un incremento en la tasa cardiaca y, finalmente, por la restauración del patrón respiratorio normal (Fewell, J. E. et al., 2000). Sin embargo, la secuencia de eventos que lleva al fallo de la autorresucitación parece ser diferente en ratones recién

nacidos vs. ratones más grandes (Fewell, J. E. et al., 2000), ya que mientras la maduración en ratones y otras especies progresa, el consumo de energía basal de los tejidos del cerebro incrementa marcadamente y, concomitantemente, la susceptibilidad del cerebro a daños temporales o permanentes incrementa (Deshpande, P. et al., 1999). Como consecuencia, se requieren mecanismos que faciliten rápidamente la autorresucitación para que el cerebro adulto evite lesiones. Por lo tanto, el tiempo necesario para realizar una autorresucitación exitosa decrementa durante la maduración (Deshpande, P. et al., 1999).

Debido a lo mencionado anteriormente, se puede especular que el éxito de los boqueos en la autorresucitación puede depender de las especies y de la madurez del sujeto (Fewell, J. E. et al., 2000).

7. Síndrome de Muerte Súbita Infantil (SIDS)

Dentro de los distintos desordenes clínicos de la respiración, el SIDS es la principal causa de mortalidad postnatal en los países desarrollados (Anderson, R. N. y Smith, B. L., 2003).

El SIDS o comúnmente conocido como muerte de cuna, se define como “la muerte súbita de un infante, menor del año de edad, que permanece inexplicable”. El diagnóstico de la muerte de cuna es de “exclusión”, es decir, se diagnostica después de una minuciosa investigación del caso, incluyendo un análisis exhaustivo del cadáver, la ejecución de una autopsia, la examinación de la escena de la muerte, y una revisión de la historia clínica que no arrojan síntomas de ninguna enfermedad ni señales de maltrato (Willinger, M., James, L. S. y Catz, C., 1991).

Se piensa que la muerte súbita infantil ocurre mientras el bebé duerme o durante la transición del dormir al despertar, principalmente entre las dos semanas y ocho meses de edad, con el 90% de los casos ocurriendo durante los primeros seis meses de vida (Willinger, M., James, L. S. y Catz, C., 1991), con mayor frecuencia entre los dos y cuatro meses de edad y es poco común durante el primer mes (Guntheroth, W. G. y Spiers, P. S., 2002).

El SIDS es multifactorial y sus causas precisas no se conocen. Esto se debe, parcialmente, a que es excepcionalmente difícil obtener datos de los cambios patofisiológicos que ocurren inmediatamente antes de la muerte (Poets, C. F. et al., 1999). Sin embargo, hay un consenso casi generalizado en que la causa última de la muerte del infante es su inhabilidad de responder ante la hipoxia (Guntheroth, W. G. y Spiers, P. S., 2002). Esto es, una deficiencia en la generación de boqueos y, por lo tanto, de autoresucitación, parece ser el factor más importante en la aparición de este síndrome.

7.1 Factores de Riesgo y Modelos de Estudio

Actualmente no hay un modo conocido para prevenir el SIDS, pero hay cosas que los padres pueden hacer para reducir el riesgo de una muerte por el SIDS. Se sabe que ciertas influencias ambientales y conductuales (llamados factores de riesgo) pueden hacer a un infante más susceptible a esta enfermedad -aunque no son necesariamente la causa-. Hasta ahora, se han identificado varios factores de riesgo de naturaleza muy diversa, de los que se mencionarán algunos a continuación:

7.1.1 Posición del Bebé al Dormir

Uno de los principales factores de riesgo aceptados hasta el momento es la posición en la que el infante duerme, ya que la obstrucción de las vías aéreas es más frecuente si lo hace boca abajo (Mitchell, E. A. et al., 1999; Côté, A. et al., 2000; Paluszynska, D. A., Harris, K. A. y Thach, B. T., 2004). No obstante, el número de muertes ha declinado gracias a campañas educativas, especialmente aquellas que promueven la colocación del infante en posición supina (boca arriba) antes de dormir (incluso durante las siestas). Con el objetivo de evitar que la cara del bebé quede cubierta durante el sueño, se aconseja que la cuna esté libre de almohadas, almohadones, colchas, edredones, ropa enrollada, muñecas y juguetes. El colchón debe ser firme y se debe vestir al bebé con ropa de dormir adecuada con el propósito de arroparlo exclusivamente con una sábana fina alrededor de la base del colchón de la cuna, alcanzando únicamente el pecho del bebé y que sus brazos queden fuera de la sábana. Se deben evitar camas de adultos, camas de agua, sillones u otras superficies blandas para dormir (Mitchell, E. A., Scragg, L. y Clements, M., 1996).

7.1.2 Temperatura Corporal

Un segundo factor es la temperatura corporal del neonato durante el sueño. Las víctimas del SIDS exhiben típicamente una elevada temperatura corporal al momento de la muerte, lo cual puede deberse a la cantidad de ropa o cobijas, la temperatura del cuarto, y la estación del año (Fleming, P. J. et al., 1990; Poets, C. F. et al., 1999). Esta condición, llamada hipertermia, puede derivar en apnea y resultar en la muerte si no es controlada por los mecanismos de modulación de la respiración (Eshel, G. et al., 1990). La investigación básica a este respecto ha contribuido con una cantidad considerable de información. Tryba, A. K. y Ramirez, J. M. publicaron, en el 2004, un trabajo en el que

se analiza el papel de la hipertermia en respuesta a la hipoxia en la red respiratoria del ratón neonato (Tryba, A. K. y Ramirez, J. M., 2004). Estos autores encontraron que las condiciones de hipertermia reducen significativamente la amplitud y la duración de las ráfagas producidas por el CPB y que la apnea suele ocurrir cuando la temperatura de la rebanada baja (Tryba, A. K. y Ramirez, J. M., 2004). Además, probaron que las neuronas marcapaso en el CPB cesan su actividad cuando se exponen a temperaturas superiores a los 40°C (Tryba, A. K. y Ramirez, J. M., 2004), por lo que es posible que la temperatura corporal se encuentre fuera del control del sistema nervioso del neonato si es demasiado elevada. Además, en el 2004, Kahraman, L. y Thach, B. T. llegaron a la conclusión de que ni la hipoxia ni la hipertermia, por separado, son mortales en ratones neonatos, pero la combinación de ambas es letal; esto se debe principalmente a un decremento en el número y la duración de los boqueos (Kahraman, L. y Thach, B. T., 2004).

7.1.3 Liberación de Interleucinas

Se sabe que la liberación de interleucinas (fenómeno que ocurre durante la respuesta del sistema inmune a una infección), especialmente la interleucina 1 β , puede ser una fuente de riesgo, pues prolonga la apnea al interferir con el proceso de autorresucitación (Stoltenberg, L. et al., 1994), por lo que un infante, si se encuentra expuesto a una infección, es más vulnerable a un episodio hipóxico.

7.1.4 Opioides

Se cree que los péptidos opioidérgicos endógenos pueden estar involucrados en el SIDS (Guntheroth, W. G. y Kawabori, I., 1975; Bianchi, A. L., Denavit-Saubié, M. y Champagnat, J., 1995; Deshpande, P. et al., 1999), ya que las concentraciones de

opioides endógenos y los niveles de β -endorfinas están significativamente elevados en infantes que mueren de SIDS (Guntheroth, W. G. y Kawabori, I., 1975; Greer, J. J., Carter, J. E. y al-Zubaidy, Z., 1995; Deshpande, P. et al., 1999).

7.1.5 Exposición a la Nicotina

Por último, la exposición a la nicotina durante y después del embarazo se ha identificado como una de las causas más probables de la muerte súbita infantil. Los efectos de la nicotina sobre el feto son variados y van desde el bajo peso al nacimiento hasta consecuencias a nivel neuroquímico. Ahora se sabe que la nicotina está asociada al retardo asimétrico en el crecimiento del feto (en esta condición, la cabeza crece más rápido que el resto del cuerpo) y que dicho retardo puede incrementar la vulnerabilidad del neonato ante episodios de hipoxia (Cooke, R. W., 1998). Por otro lado, se ha comprobado también que la nicotina altera la expresión de los receptores colinérgicos y catecolaminérgicos en el tallo cerebral (Pauly, J. R. et al., 1991; Slotkin, T. A. et al., 1999) que resulta en una reducción de la población neuronal y de la diferenciación prematura de dichas células (McFarland, B. J., Seidler, F. J. y Slotkin, T. A., 1991). En el 2001, Shao, X. M. y Feldman, J. L. estudiaron los efectos de la nicotina sobre el control del ritmo respiratorio en el CPB. Los investigadores demostraron que la nicotina incrementa la frecuencia respiratoria y regula el patrón de la respiración mediante la modulación de la neurotransmisión excitadora en el CPB (Shao, X. M. y Feldman, J. L., 2001).

De acuerdo con otro estudio reciente, la exposición prenatal a la nicotina retarda los cambios en el patrón respiratorio que se dan con el desarrollo postnatal en el ratón neonato (Robinson, D. M. et al., 2002). Los autores proponen que la presencia de nicotina durante la gestación inhibe la liberación de catecolaminas que coordina la

respuesta a la hipoxia, lo que reduce la capacidad del infante para autorresucitar e incrementa la incidencia de las apneas (Robinson, D. M. et al., 2002). Además de su acción sobre el SNC, la nicotina es capaz de potenciar el efecto atenuante que tiene la liberación de interleucinas sobre la respuesta a la hipoxia. Esto ha sido comprobado en lechones (Frøen, J. F. et al., 2000). Por último, la nicotina también incrementa la bradicardia (depresión del ritmo cardiaco) que acompaña a los episodios de apnea en los neonatos (Slotkin, T. A. et al., 1997; Huang, Z. G. et al., 2005).

7.2 Otros Factores de Riesgo

7.2.1 Factores Sociales

Estudios recientes demuestran que la muerte súbita infantil es mucho más frecuente en las familias con bajo nivel educacional, bajos ingresos económicos y en las cuales varias personas comparten un mismo cuarto para dormir (Leach, C. E. et al., 1999).

7.2.2 Factores Maternos

Otros factores de riesgo, llamados factores de riesgo maternos, están asociados con como la salud y conducta de la madre afecta al bebé antes y después del nacimiento. Estos factores de riesgo maternos incluyen: tener menos de 20 años de edad al momento del primer embarazo, un intervalo corto entre embarazos, cuidado prenatal tardío o la ausencia de éste, antecedentes de muerte intrauterina o postnatal, fumar durante y/o después del embarazo, anomalías de la placenta, baja ganancia de peso durante el embarazo, anemia, abuso de sustancias, historia de enfermedades de transmisión sexual

e infecciones del tracto urinario (Hoffman, H. J. y Hillman, L. S., 1992; Leach, C. E. et al., 1999).

7.2.3 Factores Perinatales

Los factores perinatales que aumentan el riesgo de sufrir una muerte súbita infantil son: bajo peso al nacimiento, edad gestacional y retraso del crecimiento intrauterino (Hoffman, H. J. y Hillman, L. S., 1992; Oyen, N. et al., 1997; Leach, C. E. et al., 1999).

7.3 Teorías y Hallazgos Científicos Recientes

Algunos investigadores creen que ciertos infantes son propensos a la muerte de cuna porque presentan defectos en las regiones cerebrales que se encargan de la ritmogénesis respiratoria (falta de madurez del tallo cerebral), aunque estos defectos no han sido identificados aún. A partir de la hipótesis de que los infantes que sucumben ante la muerte de cuna presentan malformaciones o defectos en el tallo cerebral, se han elaborado algunos modelos e hipótesis al respecto. Estos modelos coinciden en establecer tres factores de riesgo generales para el SIDS. Sólo el más reciente, propuesto en 1994, hace énfasis en las lesiones en el tallo cerebral (Filiano, J. J. y Kinney, H. C., 1994).

La hipótesis de triple riesgo postula que los infantes poseen vulnerabilidades que los ponen en riesgo de sufrir una muerte súbita (Guntheroth, W. G. y Spiers, P. S., 2002):

- 1) **Infante vulnerable:** El primer elemento clave del modelo de triple riesgo representa a un infante con un defecto o anomalía subyacente, que hace al

bebé vulnerable. En este modelo, ciertos factores patofisiológicos (por ejemplo, defectos en las partes del cerebro que controlan la respiración o la tasa cardiaca, y que ocurren durante la vida temprana) explican la vulnerabilidad a la muerte súbita del infante.

- 2) **Periodo crítico de desarrollo:** El segundo elemento en el modelo de triple riesgo se refiere a los primeros seis meses de vida del infante. Durante este periodo crítico de desarrollo, ocurren rápidas fases de crecimiento y toman lugar cambios en el control homeostático. Estos cambios pueden ser evidentes (por ejemplo, patrones de sueño y de despertar), o pueden ser más sutiles (por ejemplo, variaciones en la respiración, tasa cardiaca, presión sanguínea y temperatura corporal). Puede ser que algunos de estos cambios desestabilizan los sistemas internos del infante.
- 3) **Estresores externos:** El tercer elemento de este modelo involucra factores estresantes externos (como los mencionados anteriormente) o una infección respiratoria que la mayoría de los bebés puede experimentar y sobrevivir, pero que un infante vulnerable quizás no sea capaz de superar. Estos factores estresantes externos no causan muertes infantiles, pero en un infante vulnerable “puede inclinar la balanza en contra de las posibilidades de sobrevivir” (Filiano, J. J. y Kinney, H. C., 1994).

De acuerdo con este modelo, los tres elementos deben interactuar para que una muerte súbita infantil ocurra –la vulnerabilidad del bebé es indetectable hasta que el infante entra en el periodo crítico de desarrollo y es expuesto a estresores externos-. No obstante, este modelo está basado en datos clínicos, que incluyen la distribución por

edades de los decesos por muerte súbita infantil y las características de los cadáveres encontrados durante la autopsia.

Debido a que la hipoxia puede tener efectos detectables sobre el tallo cerebral, estos datos son confusos y no ofrecen información concluyente sobre las causas del síndrome (Guntheroth, W. G. y Spiers, P. S., 2002).

Independientemente de los datos manejados en la práctica clínica, las respuestas que los neonatos exhiben ante las apneas obstructivas están bien descritas y su fallo se ha investigado. La autorresucitación por boqueos es algo común en infantes moribundos menores de un año de edad (Sridhar, R. et al., 2003). No obstante, se ha observado que la mayoría de los niños que son víctimas de la muerte de cuna suelen tener mecanismos de autorresucitación (boqueos, etc.) defectuosos (Sridhar, R. et al., 2003). También se sabe que la ocurrencia de episodios de hipoxia durante la vida prenatal puede afectar los mecanismos de supervivencia (Gozal, D. et al., 2002), lo que podría predisponer a un bebé ante factores de riesgo. Normalmente, los infantes responden a las apneas obstructivas mediante comportamientos estereotipados como el movimiento brusco de las extremidades (que puede remover la obstrucción de las vías aéreas si se trata, por ejemplo, de cobijas), los boqueos o el despertar brusco (Lijowska, A. S. et al., 1997). Sin embargo, se ha reportado que, en comparación con niños normales, los infantes que mueren a causa de este síndrome tienen episodios de apneas obstructivas más frecuentes y numerosas (Kato, I. et al., 2001). Estos episodios pueden determinar la efectividad de los reflejos de autorresucitación (Gozal, D. et al., 2002), de modo que los niños que mueren por el SIDS exhiben patrones de autorresucitación con características y eficacia diferentes a los presentados por niños normales (Sridhar, R. et al., 2003).

Algunos autores creen que la predisposición a la muerte de cuna podría tener una raíz genética. Así, si un infante está genéticamente predispuesto, una combinación

de factores de riesgo como los descritos anteriormente (por ejemplo, una infección leve, la postura boca abajo al dormir y un ambiente cálido) podría desencadenar un círculo vicioso que, al incluir la hipertermia, llevaría finalmente a la muerte (Opdal, S. H. y Rognum, T. O., 2004).

Como se ha visto, los componentes del SNC implicados en la prevención de la muerte durante episodios de hipoxia (en este caso, el CPB, implicado en las apneas de sueño y en el SIDS), son susceptibles al fallo por causas muy diversas.

8. Mecanismos Celulares implicados en la Generación del Ritmo Respiratorio

Se ha encontrado evidencia de que tanto las propiedades intrínsecas de la membrana como las interacciones sinápticas contribuyen a la generación del ritmo respiratorio. Sin embargo, se ha generado una controversia acerca del papel específico de ambos mecanismos en la generación del ritmo respiratorio. Por un lado, se ha propuesto que la generación del ritmo respiratorio recae primordialmente en la interacción sináptica inhibitoria (Ogilvie, M. D. et al., 1992) o excitadora (Reckling, J. C. y Feldman, J. L., 1998). Por otro lado, se ha planteado que la actividad rítmica se produce por la acción coordinada de las neuronas marcapaso del CPB, definiendo como marcapaso aquellas neuronas que son capaces de generar actividad rítmica de manera intrínseca en ausencia de transmisión sináptica (Smith, J. C. et al., 2000). La evidencia experimental muestra que tanto las interacciones sinápticas como la actividad de las neuronas marcapaso pueden participar de manera alternada y complementaria en la

generación de la actividad rítmica, dependiendo del estado en que se encuentre el circuito.

8.1 Modelos de Generación del Ritmo Respiratorio

Desde su descubrimiento, se sabe que el CPB contiene neuronas marcapaso con propiedades dependientes de voltaje (Smith, J. C. et al., 1991). Este tipo de neuronas se descubrieron inicialmente en pequeñas redes neuronales de invertebrados; posteriormente, se encontraron en la mayoría de las redes neuronales en los mamíferos y se ha postulado que están implicadas en varias funciones cerebrales, incluyendo a la cognición (Arshavsky, Y. I., 2003).

Una vez descubierto el CPB, Smith, J. C. y colaboradores (1991) propusieron que debido a cambios en la red neuronal del CPB durante el desarrollo, la generación del ritmo respiratorio en los adultos debería residir en un híbrido constituido por neuronas marcapaso y en una red neuronal (Smith, J. C. et al., 1991, 2000; Elsen, F. P. y Ramirez, J. M., 1998; Pierrefiche, O. et al. 1998), en la que las marcapaso darían la secuencia de los eventos y la red regularía sus características (McCrimmon, D. R. et al., 2000; Smith, J. C. et al., 2000).

Inicialmente, la generación del ritmo respiratorio se explicaba considerando dos modelos, un modelo de red, en el cual son necesarias interacciones sinápticas inhibitoras para la generación del ritmo y, un modelo marcapaso, en el cual neuronas con propiedades marcapaso subyacen la ritmicidad. A continuación describiremos brevemente cada modelo.

8.1.1 Modelo de Red

Este modelo se apoya principalmente en experimentos *in vivo* y sugiere que las interacciones sinápticas (principalmente inhibitoras) entre neuronas en el centro generador respiratorio constituyen la base para la generación del ritmo respiratorio (Bianchi, A. L., Denavit-Saubié, M. y Champagnat, J., 1995; Onimaru, H. y Homma, I., 2003). Experimentos *in vitro* han mostrado claramente que la transmisión sináptica glutamatérgica es esencial para la generación del ritmo (Butera, R. J. Jr., Rinzel, J. y Smith, J. C., 1999; Koshiya, N. y Smith, J. C., 1999; Del Negro, C. A., Morgado-Valle, C. y Feldman, J. L., 2002; Peña, F. et al., 2004) y que no es necesaria la transmisión sináptica inhibitora para la generación del ritmo, pero influye fuertemente en su patrón de ritmicidad (Feldman, J. L. y Smith, J. C., 1989; Onimaru, H., Arata, A. y Homma, I., 1990; Shao, X. M. y Feldman, J. L., 1997; Tryba, A. K., Peña, F. y Ramirez, J. M., 2003).

8.1.2 Modelo Marcapaso

Por otro lado, este modelo se apoya principalmente por hallazgos *in vitro* y propone que un grupo de neuronas sincronizadas con propiedades marcapaso endógenas suministra la oscilación básica (Koshiya, N. y Smith, J. C., 1999; Onimaru, H. y Homma, I., 2005). Hoy en día, la evidencia apunta hacia la hipótesis de que el ritmo respiratorio surge del acoplamiento de propiedades membranales sinápticas e intrínsecas que requieren (Feldman, J. L. y Smith, J. C., 1989; Peña, F. y Ramirez, J. M., 2002; Tryba, A. K., Peña, F. y Ramirez, J. M., 2003; Peña, F. et al., 2004) o no (Del Negro, C. A., Morgado-Valle, C. y Feldman, J. L., 2002; Feldman, J. L. y Del Negro, C. A., 2006) neuronas marcapaso. Las neuronas respiratorias de tipo marcapaso se identificaron en preparaciones *in vitro* (Onimaru, H., Arata, A. y Homma, I., 1990; Shao, X. M. y

Feldman, J. L., 1997; Gray, P. A. et al., 1999; Koshiya, N. y Smith, J. C., 1999) y se reveló que existen al menos dos tipos de neuronas marcapaso que son afectadas diferencialmente por condiciones hipóxicas (Thoby-Brisson, M. y Ramirez, J. M., 2000; Peña, F. et al., 2004). Un primer tipo requiere la actividad de una corriente persistente de sodio y son insensibles al bloqueo de canales de calcio con cadmio [CI-marcapaso, por sus siglas en inglés (Cadmium Insensitive)]. El segundo tipo es sensible al bloqueo de corriente catiónica no específica activada por calcio [CAN, por sus siglas en inglés (Calcium-Activated Nonspecific Cationic Current)], al cadmio [CS-marcapaso, por sus siglas en inglés (Cadmium Sensitive)], al ácido flufenámico [FFA, por sus siglas en inglés (Flufenamic Acid)] y a la tetrodotoxina [TTX, por sus siglas en inglés (Tetrodotoxin)] (Funk, G. D. y Feldman, J. L., 1995; Peña, F. et al., 2004).

8.2 Modelo de Generación de la Eupnea

Usando una aproximación farmacológica, Tryba, A. K., Peña, F. y Ramirez, J. M. (2006) mostraron que ambos grupos de neuronas marcapaso (CI y CS) son responsables de la actividad eupneica en la preparación de rebanada de tallo cerebral. Las CI se caracterizan por un disparo persistente en presencia de cadmio que es bloqueado por riluzole, bloqueador de corriente persistente de sodio. Mientras que las CS se caracterizan por un disparo que es bloqueado por cadmio así como por FFA, antagonista de la corriente CAN. La actividad eupneica ficticia *in vitro* en la preparación de rebanada de tallo cerebral se bloquea por la aplicación combinada de riluzole y FFA (Peña, F. et al., 2004) pero no por riluzole (Del Negro, C. A., Morgado-Valle, C. y Feldman, J. L., 2002; Peña, F. et al., 2004), sugiriendo que ambos tipos de neuronas marcapaso son necesarias para la generación del ritmo eupneico.

8.3 Modelo de Generación de los Boqueos

Durante la hipoxia, los boqueos ficticios, a diferencia de la actividad eupneica ficticia, se eliminan con riluzole (Peña, F. et al., 2004), sugiriendo que dependen de la corriente persistente de sodio y, por lo tanto, que dependen únicamente de neuronas marcapaso-CI; este último hallazgo se ha confirmado recientemente *in vivo* (Paton, J. F. et al., 2006; Peña, F. y Aguilera, M. A., 2007). Las neuronas marcapaso-CI requieren de la activación endógena de receptores a serotonina 5-HT_{2A} para poder llevar a cabo su actividad (Peña, F. y Ramirez, J. M., 2002; Peña, F. et al., 2004). Por lo tanto, Tryba, A. K., Peña, F. y Ramirez, J. M. (2006) examinaron la hipótesis que la activación de receptores 5-HT_{2A} es crítica para la generación de boqueos. Bloqueando la activación endógena de receptores a serotonina 5-HT_{2A} por el antagonista piperidina o ketanserina (Peña, F. y Ramirez, J. M., 2002; Peña, F. et al., 2004), eliminaron la actividad de neuronas marcapaso-CI y los boqueos ficticios, sugiriendo que la activación endógena de receptores a serotonina 5-HT_{2A} y la actividad de neuronas marcapaso-CI es esencial para la generación de los boqueos ficticios *in vitro*.

Estos datos apoyan la hipótesis de que dos tipos de marcapaso subyacen la eupnea ficticia, mientras que únicamente un mecanismo es crítico para los boqueos.

Además, Tryba, A. K., Peña, F. y Ramirez, J. M. (2006) creen que estas neuronas podrían ser las responsables del fallo de los mecanismos de autorresuscitación cuando se encuentran en un ambiente neuroquímico con bajas concentraciones de serotonina [5-HT, por sus siglas en inglés (5-HydroxyTryptamine)] (Peña, F. et al., 2004). Esto es muy interesante, ya que nuevas caracterizaciones han mostrado que los grupos de marcapasos difieren no únicamente en sus mecanismos de disparo

intrínsecos, sino también en su sensibilidad a distintos neuromoduladores (Butera, R. J. Jr., Rinzel, J. y Smith, J. C., 1999; Smith, J. C. et al., 2000; Thoby-Brisson, M. y Ramirez, J. M., 2000; Del Negro, C. A. et al., 2005) y a la hipoxia (Hilaire, G. y Duron, B., 1999; Smith, J. C. et al., 2000; Peña, F. et al., 2004; Del Negro, C. A. et al., 2005; Tryba, A. K., Peña, F. y Ramirez, J. M., 2006).

Este hallazgo abre la posibilidad de usar aproximaciones farmacológicas para fijar y regular diferencialmente la actividad de subconjuntos de neuronas respiratorias implicadas en la generación del ritmo respiratorio con el fin de tratar condiciones patológicas, como el SIDS (ver más adelante).

9. Reconfiguración Funcional de la Red Neuronal que genera los distintos Ritmos Respiratorios (Eupnea, Suspiros y Boqueos)

La presencia de distintos patrones de respiración (eupnea, suspiros y boqueos) en una rebanada medular transversal plantea problemas interesantes: ¿las diferentes formas de respiración se derivan de una o múltiples redes neuronales? ¿cuáles son los mecanismos celulares que transforman la red neuronal de un estado de eupnea a uno de boqueos?.

Si, de hecho, los boqueos son “una reliquia o restos mortales de algunos mecanismos respiratorios previos”, los cuales sirven como reservas y/o respaldos cuando la eupnea falla, entonces la identificación y la eliminación del centro de los boqueos no debería eliminar la eupnea (St John, W. M., 1996). Sin embargo, los experimentos llevados a cabo *in vivo* han arrojado resultados muy confusos. Lesiones del circuito respiratorio han eliminado la eupnea en algunos casos (Ramirez, J. M. et al.,

1998a) y los boqueos en otros (Fung, M. L., Wang, W. y St John, W. M., 1994). Estos experimentos basados en la generación de lesiones, se apoyan en el supuesto de que los diferentes ritmos respiratorios son generados por circuitos respiratorios fijos y separados, lo cual implica que es posible lesionar uno sin afectar el otro. Esta suposición es incorrecta, ya que hay varios ejemplos en los cuales múltiples patrones motores se producen por un proceso de reconfiguración funcional de red (Lieske, S. P. et al., 2000).

Estudios recientes *in vivo* e *in vitro* sugieren que la red respiratoria mamífera es reconfigurada, con las mismas neuronas participando en la generación de la respiración eupneica y de los boqueos (Lieske, S. P. et al., 2000; Lindsey, B. G., 2001).

Recientemente, Lieske, S. P. y colaboradores (2000) demostraron que el CPB es capaz de generar por sí mismo distintos ritmos respiratorios dependiendo de la disponibilidad de O₂ (Lieske, et al., 2000; Peña, et al., 2004). Analizando la actividad respiratoria ficticia generada *in vitro* por preparaciones de rebanadas transversales que contienen el CPB (Smith, J. C. et al., 1991; Ramirez, J.M., Quellmalz, U. J. A. y Wilken, B., 1997), mostraron mediante registros intracelulares dentro del GRV, que estas rebanadas expresan no sólo uno sino tres patrones motores distintos con similitudes notables a la eupnea (respiración “normal”), suspiro (respiración “aumentada”) y boqueo *in vivo*. Estos patrones motores se generaron por una red individual y se superpusieron al nivel celular. Para investigar la extensión espacial de red(es) que subyacen a la eupnea, a los suspiros y a los boqueos, Lieske, S. P. y colaboradores (2000) mapearon la amplitud de la actividad poblacional integrada en pasos estereotáxicos 100- μ m sobre la superficie de la rebanada. El sitio de máxima actividad fue el mismo para los tres patrones y fue consistente con descripciones anatómicas del GRV (ver Figura 10) (Ellenberger, H. H., 1999). También fue común

una extensión de la actividad rítmica dorsal y medial a este pico en los tres patrones. Esta evidencia sugiere que en vez de pensar en circuitos respiratorios separados, es muy probable que el mismo circuito sufra un proceso de reconfiguración funcional de la misma red neuronal para generar los distintos ritmos.

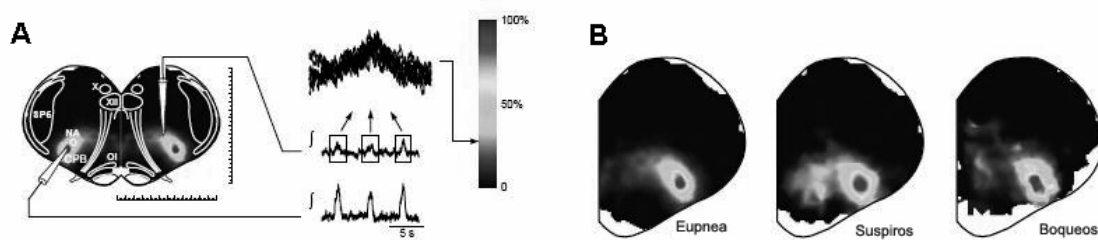


Figura 10. Mapa estereotáxico de distribución de la actividad poblacional rítmica durante la eupnea, los suspiros y los boqueos. **A)** El electrodo (derecha) se movió estereotáxicamente $100\ \mu\text{m}$ sobre la superficie de la rebanada. Un electrodo de referencia colocado en el CPB contralateral registró la actividad poblacional integrada, que proporcionó un tiempo de referencia para promediar. La amplitud de la ráfaga promediada está representada por el esquema de grises mostrado. **B)** Los mapas compuestos indican la distribución de la actividad eupneica, de los suspiros y de los boqueos en el plano transversal. Nótese que el pico de actividad de los distintos ritmos respiratorios es máximo en el CPB (Tomado de Lieske, S. P. et al., 2000).

Pero, ¿a qué se refiere el término reconfiguración funcional de una red neuronal?. Se indica una reconfiguración funcional de red neuronal si al menos algunas neuronas generadoras de ritmo se activan durante actividades múltiples; esto está demostrado para una variedad de redes neuronales de invertebrados (Meyrand, P., Simmers, J. y Moulins, M., 1991; Ramirez, J. M., 1998).

Con el fin de conservar el funcionamiento íntegro, la mayoría de las redes neuronales mantienen actividad persistente todo el tiempo; no todas las neuronas pueden apagarse, especialmente no al mismo tiempo (Ramirez, J. M., Folkow, L. P. y Blix, A. S., 2007). Este es especialmente el caso para las redes que controlan funciones autónomas; como la digestión, la respiración y el control cardiovascular (Meyrand, P., Simmers, J. y Moulins, M., 1991; Lieske, S. P. et al., 2000; Ramirez, J. M., Folkow, L.

P. y Blix, A. S., 2007). Algunas neuronas se apagarán, almacenando de esta manera energía metabólica y así evitar excitotoxicidad y muerte celular, mientras otras permanecerán activas para preservar la función neuronal.

La relación de neuronas activas vs. inactivas puede reflejar la importancia de una red neuronal dada. Algunas redes se pueden apagar sin tener efectos perjudiciales para el organismo, mientras que otras redes mantienen un alto porcentaje de neuronas activas, ya que el organismo no puede permitir el apagado completo de esta red (Ramirez, J. M., Folkow, L. P. y Blix, A. S., 2007).

Sin embargo, la situación no es tan simple. Ocurren reconfiguraciones notables incluso en aquellas redes que son críticas para la supervivencia y que controlan funciones cerebrales superiores (Meyrand, P., Simmers, J. y Moulins, M., 1991; Lieske, S. P. et al., 2000; Ramirez, J. M., Folkow, L. P. y Blix, A. S., 2007).

La red respiratoria mamífera es un buen ejemplo de una red que durante la hipoxia mantiene actividad que resulta de un “apagado” selectivo de ciertos elementos neuronales (Meyrand, P., Simmers, J. y Moulins, M., 1991; Lieske, S. P. et al., 2000; Ramirez, J. M., Folkow, L. P. y Blix, A. S., 2007).

Inicialmente se sugirió que una reducción de la transmisión sináptica inhibitoria producida por la hipoxia, podría ser la causante de la reconfiguración funcional del circuito para generar los boqueos (Lieske, S. P. et al., 2000). Al hacer un análisis minucioso del efecto de la hipoxia sobre otros grupos neuronales, encontramos que la gran mayoría de las neuronas respiratorias son inhibidas y que un grupo de neuronas marcapaso resistentes a la hipoxia, y que dependen de la actividad de una corriente persistente de sodio, se vuelven indispensables para la generación de los boqueos en la hipoxia, mientras que su actividad no es necesaria, en condiciones de normoxia, para la

generación de la eupnea (Ballanyi, K., Volker, A. y Richter, D. W., 1994; Thoby-Brisson, M. y Ramirez, J. M., 2000; Peña, F. et al., 2004).

Esto sugiere que los procesos neuronales que participan en la generación de un ritmo pueden cambiar, en distintas condiciones medioambientales, para dar lugar a la generación de otros ritmos y que en el proceso de reconfiguración funcional del circuito respiratorio que lleva a la generación de boqueos, participan cambios en la transmisión sináptica y en la dependencia a ciertas propiedades intrínsecas neuronales.

Como se mencionó anteriormente, en el estado normóxico (ver Figura 11, panel izquierdo), la red respiratoria contiene neuronas que pueden disparar intrínsecamente (llamadas neuronas marcapaso) y neuronas que normalmente no disparan (neuronas no marcapaso), (denotado por I en la Figura 11). Las neuronas marcapaso son de dos distintos tipos: 1) neuronas que disparan basadas en mecanismos dependientes de Ca^{2+} involucrando probablemente la corriente CAN (CS) (denotado por Ca en la Figura 11) y, 2) neuronas marcapaso que dependen de la corriente persistente de Na^+ (CI) (denotado por Na en la Figura 11) (Peña, F. et al., 2004; Ramirez, J. M., Folkow, L. P. y Blix, A. S., 2007). En el estado hipóxico, las neuronas no marcapaso se hiperpolarizan y las neuronas marcapaso dependientes de Ca^{2+} dejan de disparar, mientras que las neuronas marcapaso dependientes de Na^+ continúan disparando (Thoby-Brisson, M. y Ramirez, J. M., 2000; Peña, F. et al., 2004; Ramirez, J. M., Tryba, A. K. y Peña, F., 2004; Ramirez, J. M., Folkow, L. P. y Blix, A. S., 2007) (ver Figura 11, panel derecho). El apagado de ráfagas dependientes de Ca^{2+} puede ser neuroprotectivo, ya que la activación de mecanismos de Ca^{2+} puede promover necrosis y apoptosis. El apagado de neuronas no marcapaso y de neuronas marcapaso dependientes de Ca^{2+} es hipometabólico, ya que estas neuronas constituyen la mayoría de las neuronas respiratorias (ver Figura 11, panel derecho). Esta respuesta hipóxica diferencial resulta

en una reconfiguración funcional que puede transformar la salida respiratoria de respiración normal a boqueos en hipoxia (ver Figura 11) (Lieske, S. P. et al., 2000; Peña, F. et al., 2004; Ramirez, J. M., Folkow, L. P. y Blix, A. S., 2007). El cambio en la conformación de la red respiratoria podría alterar a su vez la modulación de la misma si la distribución de receptores a los neuromoduladores no es homogénea.

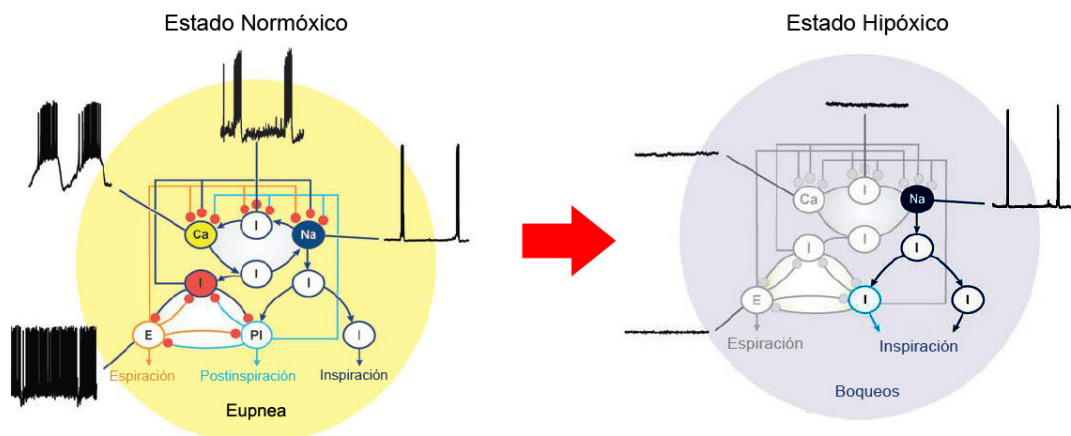


Figura 11. Modelo hipotético ilustrando la reconfiguración funcional de la red respiratoria durante la transición de respiración normal (panel izquierdo) a boqueos (panel derecho). En el estado normóxico, la red controla diferentes fases de la respiración: espiración, postinspiración e inspiración. La red depende de la actividad de neuronas no marcapaso (I), neuronas espiratorias (E), neuronas postinspiratorias (PI), neuronas marcapaso dependientes de Ca^{2+} (Ca) (CS), y neuronas marcapaso dependientes de Na^+ (Na) (CI), así como interacciones sinápticas inhibitorias (círculos rojos) y excitatorias (flechas azul oscuro). Se muestran ejemplos de trazos representativos de cuatro neuronas respiratorias [neuronas marcapaso dependientes de E, Ca^{2+} (Ca), I y Na^+ (Na)]. En el estado hipóxico, la red respiratoria asume una configuración nueva y muy diferente, donde la mayoría de las neuronas dejan de disparar, y la red respiratoria se maneja por las neuronas marcapaso dependientes de Na^+ (Na) (CI). La salida de la red consiste únicamente de la inspiración, que caracteriza la actividad de los boqueos. Se muestran trazos representativos de las mismas cuatro neuronas respiratorias en el estado hipóxico (Datos tomados de Lieske, S. P. et al., 2000; Peña, F. et al., 2004; Ramirez, J. M., Folkow, L. P. y Blix, A. S., 2007).

En resumen, se propone que el sistema nervioso de los mamíferos se adapta a la hipoxia a través de una reconfiguración funcional de red, que se logra al satisfacer la triple tarea de la tolerancia a la hipoxia: hipometabolismo, neuroprotección e integridad funcional (Ramirez, J. M., Folkow, L. P. y Blix, A. S., 2007).

Además, se cree que esta reconfiguración funcional neuronal lleva a una reconfiguración funcional conductual. En los mamíferos, las mismas neuronas en el GRV son activadas durante conductas respiratorias y no respiratorias (Ramirez, J. M., 1998). El patrón de activación de las neuronas respiratorias cambia considerablemente durante estas conductas no respiratorias, sugiriendo que la red respiratoria es reconfigurada (Ramirez, J. M., 1998). El cambio entre patrones motores diferentes en estas redes se logra por los efectos de neuromoduladores, los cuales pueden reorganizar dramáticamente interacciones sinápticas y/o cambiar las dependencias de voltaje de conductancias activas. Por lo tanto, se considera necesario tratar la noción de red neuronal como un arreglo puramente funcional, determinado por neuronas interconectadas por neuromoduladores (Marder, E., 1994).

10. Neuromodulación del Circuito Generador del Ritmo Respiratorio

Usamos el término *neuromodulador* para aquellas sustancias liberadas por terminales axónicas en las redes respiratorias pero cuyas células están fuera del generador del patrón central [CPG, por sus siglas en inglés (Central Pattern Generator)]; entendiendo por CPG a las conductas motoras rítmicas que son generadas dentro del SNC por circuitos neuronales llamados generadores de patrones centrales (por ejemplo, el CPB) (Meyrand, P., Simmers, J. y Moulins, M., 1991; Bianchi, A. L., Denavit-Saubié, M. y Champagnat, J., 1995).

Los neuromoduladores no son esenciales para la generación del ritmo, sin embargo, pueden ejercer una acción poderosa en el CPG respiratorio. Sus efectos en la respiración pueden deberse a una interacción con la neurotransmisión rápida en un

grupo de células respiratorias. También pueden causar cambios en el estado general de la excitabilidad neuronal que modifica la transmisión relacionada con la respiración. Como consecuencia, estos neuromoduladores no tienen un efecto claro en la respiración global; su efecto respiratorio depende del tipo de receptor activado y en el mecanismo(s) respiratorio(s) que es controlado por este tipo de receptor. Por ejemplo, un neuromodulador puede estimular la respiración por su efecto en los cuerpos carótidos y lo deprime por su efecto en las neuronas respiratorias centrales (Bianchi, A. L., Denavit-Saubié, M. y Champagnat, J., 1995).

Recientemente, registros intracelulares en neuronas del GRV (y en rebanadas transversales que contienen subdivisiones del GRV) han revelado que las neuronas respiratorias neonatas poseen un grupo complejo de conductancias reguladas por transmisores o conductancias iónicas dependientes de voltaje que están implicadas en la generación y modulación del ritmo respiratorio (Ballanyi, K., Onimaru, H. y Homma, I., 1999).

Las interacciones de la red neuronal respiratoria dependen principalmente de la activación de receptores a glutamato, glicina y ácido gamma-aminobutírico [GABA, por sus siglas en inglés (Gamma-AminoButyric Acid)]. Esta red respiratoria también se ve influida por neuromoduladores, como 5-HT, noradrenalina y dopamina (DA) (Bianchi, A. L., Denavit-Saubié, M. y Champagnat, J., 1995; Hilaire, G. y Duron, B., 1999; Haji, A., Takeda, R. y Okazaki, M., 2000; Gray, P.A. et al., 2001; Hilaire, G. y Pásaro, R., 2003). Estas moléculas pueden influir en varios niveles de la red respiratoria. Por ejemplo, afectan la excitabilidad neuronal activando vías de segundos mensajeros. Específicamente, alteraciones en la actividad de la proteína cinasa A y C produce cambios sustanciales en conductancias dependientes de voltaje y opera por ligandos en neuronas respiratorias *in vivo*, que determinan oscilaciones del potencial de membrana y

de descargas de ráfagas rítmicas (Champagnat, J. y Richter, D. W., 1993; Lalley, P. M. et al., 1997; Richter, D. W. et al., 1997; Haji, A., Takeda, R. y Okazaki, M., 2000). También modulan la amplitud de la salida motora respiratoria.

Los efectos de estas moléculas en el ritmo respiratorio son mediados por el CPB, ya que estudios inmunohistológicos han confirmado la presencia de receptores a estos neuromoduladores en el CPB, que incluso pueden modular la respuesta respiratoria a la hipoxia. Esto sugiere que anomalías en estos sistemas moduladores pueden provocar trastornos respiratorios (Haji, A., Takeda, R. y Okazaki, M., 2000).

10.1 Segundos Mensajeros

Los segundos mensajeros son sustancias producidas dentro de una célula después de la unión de la hormona o el transmisor a los receptores externos. En las neuronas se produce un segundo mensajero cuando un neurotransmisor (primer mensajero) se une a un miembro de una gran familia de receptores, que contienen siete dominios que atraviesan la membrana (por ejemplo, el receptor β -adrenérgico, el receptor muscarínico de la acetilcolina, los receptores de los neuropéptidos y muchos otros), iniciando una cascada de interacciones moleculares que implican a las proteínas que se unen al GTP (proteínas G), que estimula la síntesis enzimática o la liberación del segundo mensajero (por ejemplo, del monofosfato cíclico de adenosina [AMPc, por sus siglas en inglés (cyclic Adenosine Monophosphate)] mediante la adenilato ciclasa, del monofosfato cíclico de guanosina [GMPc, por sus siglas en inglés (cyclic Guanosine Monophosphate)] mediante la guanilciclasa, del inositol trifosfato [IP₃, por sus siglas en inglés (Inositol TriPhosphate)] y el diacilglicerol [DAG, por sus siglas en inglés (DiAcylGlycerol)] mediante la fosfolipasa C y del ácido araquidónico mediante la

fosfolipasa A₂). Estos segundos mensajeros pueden actuar de diversos modos; por ejemplo: el AMPc, el GMPc y el IP₃ pueden actuar directamente ligándose a un canal iónico, o indirectamente por fosforilación de las proteínas a través de cinasas específicas tales como la proteína cinasa dependiente del AMPc [PKA, por sus siglas en inglés (Protein Kinase A)], y la proteína cinasa C dependiente del GMPc (revisado en Kandel, E. R., Schwartz, J. H. y Jessell, T. M., 2000).

10.1.1 Monofosfato Cíclico de Adenosina (AMPc)

El AMPc, probablemente el segundo mensajero más conocido, es un nucleótido sintetizado por la enzima adenilato ciclasa que desencadena la fosforilación de las proteínas por las cinasas dependientes del AMPc. También puede actuar uniéndose directamente a ciertos canales iónicos (revisado en Kandel, E. R., Schwartz, J. H. y Jessell, T. M., 2000). Además, está establecido que el AMPc desempeña un papel crucial como segundo mensajero en la modulación de funciones neuronales.

Se ha demostrado que la excitabilidad de las neuronas respiratorias está fuertemente determinada por la concentración celular de AMPc, que puede modificar la función de varios receptores y causar regulación a la alza o a la baja de varios canales iónicos (Smith, D. O. et al., 1995; Ballanyi, K., Onimaru, H. y Homma, I., 1999; Mironov, S. L., Langohr, K. y Richter, D. W., 1999). Por ejemplo, se ha implicado una conductancia catiónica no específica dependiente de AMPc en el disparo de neuronas respiratorias de caracol *in vivo* (Partridge, L. D., Swandulla, D. y Muller, T. H., 1990; Richter, D. W., Ballanyi, K. y Schwarzacher, S., 1992). Además, se demostró previamente con registros extracelulares, que las ráfagas de actividad de los nervios espinales relacionados con la respiración y de las neuronas del GRV, en la preparación de tallo cerebral-médula espinal, son alteradas por agentes que afectan el AMPc (Arata,

A., Onimaru, H. y Homma, I., 1993; Ballanyi, K. et al., 1997). Smith, D. O. y colaboradores (1995) no detectaron efectos de fármacos que elevan el AMPc, como la forskolina, db-AMPc y 8-Br-AMPc en la actividad rítmica *in vitro* en preparaciones de tallo cerebral, mientras que Arata, A., Onimaru, H. y Homma, I. (1993) reportaron una aceleración de la frecuencia respiratoria debida a dichos fármacos. En el mismo estudio, fue particularmente evidente el efecto estimulador de fármacos que elevan el AMPc en preparaciones con una tasa de disparo baja, mientras que se reveló que no hubo efecto o incluso una acción ligeramente inhibitoria en preparaciones con alta frecuencia. Puede ser que bajo las condiciones experimentales del estudio de Smith, D. O. y colaboradores (1995), los niveles celulares de AMPc ya estaban lo suficientemente altos para producir la estimulación máxima de la red respiratoria. Arata, A., Onimaru, H. y Homma, I. (1993) también demostraron que la forskolina revierte la depresión de la frecuencia del ritmo respiratorio *in vitro* provocado por clonidina, que se sabe disminuye el AMPc vía activación de adrenoreceptores α_2 (Uhlen, S. y Wikberg, J. E., 1988).

La suposición de una acción estimuladora del AMPc en la red respiratoria cobra mayor fuerza con el hallazgo de que fármacos que elevan el AMPc también antagonizan la depresión respiratoria (e incluso la apnea *in vitro*) evocada por opioides o prostaglandinas (Ballanyi, K. et al., 1997; Meyer, T., Hoch, B. y Ballanyi, K., 1998, 1999), ya sea estimulando directamente la adenilato ciclasa con forskolina o indirectamente activando receptores a DA D₁ (Smith, D. O. et al., 1995; Ballanyi, K. et al., 1997), así como previniendo la baja del AMPc con isobutilmetilxantina (IBMX). Estos fármacos restauraron completamente las descargas respiratorias en raíces cervicales y las actividades respiratorias rítmicas de las neuronas del GRV (Ballanyi, K. et al., 1997). También se demostró que los agentes que elevan el AMPc tienen un efecto excitador directo en la generación del ritmo respiratorio en la tasa de disparo intrínseca

de neuronas pre-inspiratorias (Pre-I) en preparaciones de tallo cerebral-médula espinal de ratas recién nacidas (Arata, A., Onimaru, H. y Homma, I., 1993; Mironov, S. L., Langohr, K. y Richter, D. W., 1999). En estudios *in vivo*, la elevación de AMPc incrementa la excitabilidad de neuronas espiratorias vía activación de la PKA (Smith, D. O. et al., 1995; Ballanyi, K. et al., 1997; Lalley, P. M. et al., 1997). Los autores discutieron que la PKA puede mediar el efecto estimulante de una multitud de posibles blancos por medio de la fosforilación.

Cualquiera que sea el mecanismo que resulte ser el responsable principal del incremento general en la excitabilidad de las neuronas respiratorias después de la elevación de AMPc (y también por el bloqueo del ritmo respiratorio cuando los niveles de AMPc bajan a un nivel crítico), queda claro que el AMPc es de fundamental importancia para la generación y mantenimiento de un ritmo respiratorio estable (Arata, A., Onimaru, H. y Homma, I., 1993; Ballanyi, K. et al., 1997; Meyer, T., Hoch, B. y Ballanyi, K., 1998, 1999).

10.2 Neuropéptidos

Los neuropéptidos ejercen una multitud de acciones moduladoras en la respiración, como se ha demostrado en una extensa cantidad de estudios (Murakoshi, T., Suzue, T. y Tamai, S., 1985; Yamamoto, Y. et al., 1988; Yamamoto, Y., Onimaru, H. y Homma, I., 1992; Greer, J. J., Carter, J. E. y al-Zubaidy, Z., 1995; Greer, J. J., al-Zubaidy, Z. y Carter, J. E., 1996; Johnson, S. M., Smith, J. C. y Feldman, J. L., 1996). Se ha mostrado que los opioides (Florez, J., Mediavilla, A. y Pazos, A., 1980; Morin-Surun, M. P. et al., 1984; Shook, J. E., Watkins, W. D. y Camporesi, E. M., 1990) y la somatostatina (Harfstrand, A. et al., 1985; Yamamoto, Y. et al., 1988; Chen, Z. B. et al.,

1991) actúan como potentes depresores de la respiración, mientras que se encontró que la SP (Chen, Z. B. et al., 1991) y la hormona liberadora de tirotrófina [TRH, por sus siglas en inglés (Thyrotrophin Releasing Hormone)] (Hedner, J. et al., 1981) estimulan la respiración. Los estudios “clásicos” de Suzue, T. (1984) han establecido que estas moléculas modulan la actividad respiratoria *in vitro* en la preparación de tallo cerebral-médula espinal de la misma manera que en la red respiratoria del animal intacto (Suzue, T., 1984; Murakoshi, T., Suzue, T. y Tamai, S., 1985).

10.2.1 Opioides

Los péptidos opioides son los péptidos más importantes implicados en la modulación de la respiración en el tallo cerebral. Por ejemplo, se ha demostrado que los opioides son depresores respiratorios muy potentes (Morin-Surun, M. P. et al., 1984; Shook, J. E., Watkins, W. D. y Camporesi, E. M., 1990; Bianchi, A. L., Denavit-Saubié, M. y Champagnat, J., 1995; Greer, J. J., Carter, J. E. y al-Zubaidy, Z., 1995; Ballanyi, K. et al., 1997; Haji, A., Takeda, R. y Okazaki, M., 2000; Morin-Surun, M. P. et al., 2001). El término “opioides” usualmente se refiere a los péptidos que se unen estereoespecíficamente a receptores a opioides. Aunque fármacos no péptidos son llamados “opiáceos”, ahora “opioides” comprenden ambos, péptidos y no péptidos (Shook, J. E., Watkins, W. D. y Camporesi, E. M., 1990; Haji, A., Takeda, R. y Okazaki, M., 2000).

Los péptidos opioides se dividen en tres familias: β -endorfinas, encefalinas y dinorfinas (Greer, J. J., Carter, J. E. y al-Zubaidy, Z., 1995) que activan los receptores a opioides μ , κ y δ . En la rata, los receptores μ y κ están presentes al nacimiento, mientras que los receptores δ aparecen durante la segunda semana postnatal (Shook, J. E., Watkins, W. D. y Camporesi, E. M., 1990; Greer, J. J., Carter, J. E. y al-Zubaidy, Z.,

1995; Haji, A., Takeda, R. y Okazaki, M., 2000). La activación de estos receptores ampliamente distribuidos en la espina dorsal, médula oblonga, puente y CPB, puede modular potencialmente el ritmo respiratorio y/o la salida motora (Greer, J. J., Carter, J. E. y al-Zubaidy, Z., 1995; Gray, P. A. et al., 1999; Morin-Surun, M. P. et al., 2001). Esto es apoyado por diferentes estudios descritos a continuación.

La aplicación iontoforética de agonistas opioidérgicos en la médula ventrolateral deprime la actividad de neuronas respiratorias en estudios *in vivo* e *in vitro* (Morin-Surun, M. P. et al., 1984; Shook, J. E., Watkins, W. D. y Camporesi, E. M., 1990; Bianchi, A. L., Denavit-Saubié, M. y Champagnat, J., 1995; Ballanyi, K. et al., 1997; Haji, A., Takeda, R. y Okazaki, M., 2000; Morin-Surun, M. P. et al., 2001), manifestado como un decremento en el volumen tidal y en la frecuencia respiratoria. Se cree que esto ocurre por una posible interacción entre los opioides y los aminoácidos excitadores como glutamato (Florez, J., Mediavilla, A. y Pazos, A., 1980; Bianchi, A. L., Denavit-Saubié, M. y Champagnat, J., 1995; Haji, A., Takeda, R. y Okazaki, M., 2000). Todos estos efectos se revierten por la administración del antagonista opioidérgico naloxona. Se cree que la liberación de opioides puede contribuir a la depresión respiratoria durante la hipoxia (Shook, J. E., Watkins, W. D. y Camporesi, E. M., 1990; Ballanyi, K. et al., 1997).

Particularmente, los receptores a opioides tipo μ están implicados en la reducción de la frecuencia respiratoria, mientras que los receptores a opioides de tipo κ están implicados en la reducción de la frecuencia y la amplitud respiratoria; finalmente, los receptores a opioides de tipo δ no participan en la depresión respiratoria de ratones recién nacidos (Takita, K. et al., 1997). Los efectos de los agonistas μ opioidérgicos sobre el ritmo respiratorio se agudizan conforme avanza el desarrollo (Greer, J. J.,

Carter, J. E. y al-Zubaidy, Z., 1995; Ballanyi, K. et al., 1997; Gray, P. A. et al., 1999; Morin-Surun, M. P. et al., 2001; Tanabe, A., Fuji, T. y Onimaru, H., 2005).

También parece existir una diferenciación de los efectos de los opioides dependiendo del sitio en la sinapsis en donde actúan. Por ejemplo, estudios previos de otras partes del SNC han mostrado que acciones inhibitoras de la activación de receptores μ son mediadas vía mecanismos reguladores por proteínas G a membranas pre y/o postsinápticas. Presinápticamente, los opioides que actúan en receptores μ pueden disminuir la liberación de neurotransmisores dependientes de Ca^{2+} directamente, ya sea interfiriendo con los mecanismos celulares que subyacen la exocitosis vesicular o inhibiendo los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, e indirectamente, activando los canales de K^+ y, por lo tanto, originando el umbral y acortando la duración de los potenciales de acción (Schroeder, J. E. et al., 1991; Greer, J. J., Carter, J. E. y al-Zubaidy, Z., 1995). Postsinápticamente, los agonistas a receptores μ han mostrado activar al menos dos tipos diferentes de conductancias de potasio membranales, una de las cuales es un rectificador entrante (Williams, J. T., North, R. A. y Tokimasa, T., 1988; Wimpey, T. L. y Chavkin, C., 1991; Greer, J. J., Carter, J. E. y al-Zubaidy, Z., 1995).

Los opioides también pueden modular la ventilación por vías quimiorreceptoras, ya sea quimiorreceptores arteriales que median la respuesta respiratoria a la hipoxia o quimiorreceptores centrales que median la respuesta a la hipercapnia (Morin-Surun, M. P. et al., 2001).

De manera interesante, el grupo de Ballanyi K. y colaboradores (1997), encontró que esta depresión respiratoria inducida por opioides en la preparación de tallo cerebral-médula espinal no sólo es antagonizada por antagonistas selectivos a receptores opioidérgicos, como la naloxona, sino también por fármacos que elevan el AMPc, como

el rolipram, la forskolina o cafeína, incluyendo el agonista a receptores a DA D₁, 6-cloro-APB (Ballanyi, K. et al., 1997; Lalley, P. M. et al., 1997; Meyer, T., Hoch, B. y Ballanyi, K., 1999; Kasaba, T., Takeshita, M. y Takasaki, M., 1997; Haji, A., Takeda, R. y Okazaki, M., 2000; Lalley, P. M., 2004). Estos resultados sugieren que la depresión respiratoria inducida por opioides se debe a la inhibición de la adenilato ciclasa y, por lo tanto, a la caída de los niveles de AMPc en células que son responsables de la generación del ritmo respiratorio (Johnson, S. M., Smith, J. C. y Feldman, J. L., 1996; Ballanyi, K. et al., 1997; Xie, C. W. y Lewis, D. V., 1997; Haji, A., Takeda, R. y Okazaki, M., 2000; Morin-Surun, M. P. et al., 2001).

Además, se ha mostrado en diferentes tipos de células que la activación de receptores opioidérgicos que están acoplados a proteínas G inducen cambios en varios sistemas de señalización de segundos mensajeros. Esto incluye elevación de calcio intracelular, cambio de estimulación de IP₃, movilización de ácido araquidónico y decremento de AMPc (Gray, P. A. et al., 1999; Takita, K. et al., 2000). Como consecuencia, es de suponerse una función potencial del IP₃, del AMPc y de metabolitos del ácido araquidónico en el control de la respiración (Richter, D. W. et al., 1997; Takita, K. et al., 2000).

Por lo tanto, un entendimiento de los mecanismos neuronales que subyacen la acción de los opioides tiene potenciales implicaciones importantes para el diagnóstico y tratamiento de trastornos de respiración neonatal, así como para el diseño y administración de fármacos analgésicos opioidérgicos (Greer, J. J., Carter, J. E. y al-Zubaidy, Z., 1995).

10.3 Forskolina

La forskolina es un activador de la adenilato ciclasa (Seamon, K. B., Padgett, W. y Daly, J. W., 1981; Daly, J. W., Padgett, W. y Seamon, K. B., 1982; Arata, A., Onimaru, H. y Homma, I., 1993; Lalley, P. M. et al., 1997; Xie, C. W. y Lewis, D. V., 1997; Insel, P. A. y Ostrom, R. S., 2003). Los investigadores han empleado la forskolina como medio para incrementar los niveles de AMPc en preparaciones de membranas, células y tejidos. En el caso de preparaciones de tallo cerebral-médula espinal de ratas recién nacidas, la elevación de la concentración de AMPc intracelular por forskolina refuerza el ritmo respiratorio, prolongando su aumento y retrasando el desarrollo de la depresión respiratoria inducida por opioides (Arata, A., Onimaru, H. y Homma, I., 1993; Mironov, S. L., Langohr, K. y Richter, D. W., 1999; Takita, K. et al., 2000). Estos hallazgos también corroboran los resultados obtenidos en el gato *in vivo* por Lalley, P. M. y colaboradores (1997), que demostraron la modulación de patrones de descarga de neuronas respiratorias por la PKA.

La forskolina no activa únicamente la adenilato ciclasa (Xie, C. W. y Lewis, D. V., 1997), también interactúa con ciertos tipos de proteínas, incluyendo transportadores de glucosa y canales iónicos; estudios con derivados de forskolina demostraron que tales interacciones dependen de diferentes patrones estructurales que aquellos observados para la activación de la actividad de la adenilato ciclasa (Insel, P. A. y Ostrom, R. S., 2003).

Se han revisado detalles experimentales concernientes al uso de forskolina marcada (radioactiva) para identificar a la adenilato ciclasa (Laurenza, A. y Seamon, K. B., 1991; Sievert, M. K. et al., 2002). Los sitios de mayor afinidad parecen resultar no de la unión de la forskolina a la adenilato ciclasa, sino de la interacción de la adenilato

ciclase con la proteína G estimulante [G_s , por sus siglas en inglés (G protein-stimulatory)]; lo cual da como resultado una mayor actividad de la primera (Daly, J. W., Padgett, W. y Seamon, K. B., 1982; Insel, P. A. y Ostrom, R. S., 2003).

Esto tiene implicaciones importantes para el uso de forskolina, especialmente en estudios con células intactas (Insel, P. A. y Ostrom, R. S., 2003).

- 1) La respuesta de las células a la forskolina puede implicar activación de receptores acoplados a proteínas G [GPCRs, por sus siglas en inglés (G Protein Coupled Receptors)], como receptores a nucleótidos y prostaglandinas que involucran la activación de G_s . Así, la generación celular de AMPc en respuesta a la forskolina puede incluir una contribución por activación de GPCR aunque no se añada un agonista GPCR.
- 2) La activación de G_s por GPCRs contribuye a la generación de AMPc estimulada por forskolina en células debido a la potenciación de la actividad del complejo adenilato ciclase-forskolina- G_s . Aunque la evidencia de esta idea se ha obtenido en distintos sistemas experimentales, muchos investigadores que observan incrementos en el AMPc en respuesta a la forskolina asumen incorrectamente que tales incrementos significan la activación de la adenilato ciclase. La base estructural de esta potenciación forskolina- G_s es evidente por estudios cristalográficos de adenilato ciclase. La unidad funcional de la adenilato ciclase se forma por dos dominios (denominados C1 y C2) (Dessauer, C. W. et al., 1998; Insel, P. A. y Ostrom, R. S., 2003). El dominio C1 contiene los sitios de unión catalíticos y es donde se une la proteína G inhibidora [G_i , por sus siglas en inglés (G protein-inhibitory)], mientras que el dominio C2 tiene el sitio en donde se une la G_s así como el “pseudocatalítico” al cual se une la forskolina. Por lo tanto, no es de sorprender que la interacción G_s -adenilato ciclase favorezca la

catálisis del sustrato en el sitio activo y la unión de la forskolina al sitio pseudocatalítico (Dessauer, C. W. et al., 1998; Insel, P. A. y Ostrom, R. S., 2003).

Aunque la forskolina se ha usado alrededor de 20 años, permanece como un agente importante en estudios de las bases moleculares de la acción de los fármacos, ya que ha probado ser una herramienta efectiva para aumentar los niveles celulares de AMPc.

10.4 Aminas Biogénicas

Las funciones de la red respiratoria son moduladas por aminas biogénicas como 5-HT, adrenalina, noradrenalina o DA (Bianchi, A. L., Denavit-Saubié, M. y Champagnat, J., 1995).

10.4.1 Dopamina

La DA es la principal catecolamina neurotransmisora en el cerebro de los mamíferos. Está implicada en control cardiovascular, actividad locomotora, recuperación de la memoria y reforzamiento (Missale, C. et al., 1998; Fuji, M., Umezawa, K. y Arata, A., 2004), entre otras.

Los receptores a DA se pueden agrupar en dos clases principales. La clase D₁ consiste de receptores D₁ y D₅, y la clase D₂ consiste de receptores D₂, D₃ y D₄ (Missale, C. et al., 1998; Price, C. J., Kim, P. y Raymond, L. A., 1999). Los receptores de tipo D₁ están acoplados positivamente a la activación de la adenilato ciclasa y aumentan las respuestas mediadas por los receptores glutamatérgicos NMDA (*N*-metil-

D-aspartato) y AMPA (Ácido alfa amino-3 hidro-5 metil-4 isoxazol propiónico) que están correlacionados temporalmente con la fosforilación incrementada de estos receptores por la PKA. Aunque la PKA parece estar implicada, pueden ocurrir consecuencias alternativas de la aplicación de DA. Por ejemplo, la DA actuando en el receptor D₁ también puede incrementar la actividad de la fosfolipasa C (Felder, C. C., Jose, P. A. y Axelrod, J., 1989; Smith, D. O. et al., 1995; Missale, C. et al., 1998; Price, C. J., Kim, P. y Raymond, L. A., 1999). Mientras que los receptores de tipo D₂ están acoplados negativamente a la actividad de la adenilato ciclasa e inhiben las respuestas de los receptores NMDA (Arata, A., Onimaru, H. y Homma, I., 1993; Missale, C. et al., 1998; Price, C. J., Kim, P. y Raymond, L. A., 1999; Fuji, M., Umezawa, K. y Arata, A., 2004).

La modulación dopaminérgica de la respiración se describió por primera vez hace casi 30 años por Lundberg, D., Bresse, G. R. y Mueller, R. A. (1979). Ellos reportaron que el agonista no selectivo a receptores dopaminérgicos apomorfin produce un incremento en la frecuencia respiratoria y en la respiración por minuto en ratas anestesiadas con halotano. A partir de estudios siguientes usando el mismo agonista, Lundberg, D., Mueller, R. A. y Breese, G. R. (1982) describieron los sitios de acción de la DA en el sistema respiratorio, uno situado periféricamente que implica los cuerpos carótidos y otro situado en sitios indefinidos en el SNC.

Las catecolaminas pueden tener efectos respiratorios opuestos dependiendo del sitio en donde actúen (Bianchi, A. L., Denavit-Saubié, M. y Champagnat, J., 1995). Los grupos catecolaminérgicos dorsales A2 y C2 están localizados medialmente al GRD, y los grupos ventrolaterales A1 y C1 se superponen con el GRV. Estas regiones respiratorias son ricas en terminales que almacenan noradrenalina o adrenalina. Algunas

de estas neuronas catecolaminérgicas pueden interactuar sinápticamente con neuronas respiratorias (Haji, A., Takeda, R. y Okazaki, M., 2000).

Aunque muchos experimentos basados en la aplicación de antagonistas a DA *in vivo* (Fuji, M., Umezawa, K. y Arata, A., 2004) y aplicación de DA en preparaciones en bloque *in vitro* (Murakoshi, T., Suzue, T. y Tamai, S., 1985; Fuji, M., Umezawa, K. y Arata, A., 2004) sugieren que la DA está implicada en el control central de la respiración así como en condiciones hipóxicas, el mecanismo de control respiratorio dopaminérgico a nivel celular de la red no está bien descrito (Haji, A., Takeda, R. y Okazaki, M., 2000).

Recientemente, se demostró que el agonista selectivo a receptores D₁ 6-cloro-APB administrado sistémicamente revierte la depresión de la red respiratoria inducida por opioides *in vivo* e *in vitro* (Lalley, P. M., 2004, 2005b) y este efecto se bloquea con un antagonista a receptores D₁ (Lalley, P. M., 2004), sugiriendo que los receptores D₁ participan en modular la depresión de la red respiratoria inducida por opioides (Lalley, P. M., 2005a,b). Por lo tanto, los agonistas D₁ pueden ser útiles adjuntos terapéuticos en pacientes que requieren opioides para el alivio del dolor pero que son particularmente susceptibles a la depresión respiratoria que producen (Lalley, P. M., 2004).

Además, se sugiere que el sistema dopaminérgico produce una inhibición tónica de las respuestas respiratorias hipóxicas que son mediadas por receptores D₂ (Haji, A., Takeda, R. y Okazaki, M., 2000).

Por lo tanto, se asume que los sistemas catecolaminérgicos pueden ejercer un control neuronal respiratorio bajo dichas condiciones hipóxicas (Haji, A., Takeda, R. y Okazaki, M., 2000).

11. Justificación

El circuito generador del ritmo respiratorio, el CPB, puede mantenerse en una rebanada de tallo cerebral, en la cual continúa generando su actividad rítmica, permitiendo utilizar la amplia gama de técnicas electrofisiológicas en el estudio a nivel celular de los mecanismos que subyacen a la generación de esta función en distintas condiciones medioambientales. Utilizando el modelo de rebanadas de tallo cerebral se pueden estudiar diversos sistemas de neurotransmisión y de señalización intracelular (como el del AMPc), que están presentes en el CPB. Además, usando esta aproximación es posible extenderse a varios niveles de integración, desde el nivel celular-molecular hasta el nivel de sistema-red-conductual. En términos más globales, este circuito también permite estudiar mecanismos de reconfiguración funcional de un circuito neuronal en mamíferos y la generación de distintos ritmos respiratorios.

Específicamente, el estudio de la generación de los boqueos es un tema de interés básico en las neurociencias en términos del estudio de los mecanismos involucrados en la reconfiguración funcional de un circuito neuronal en mamíferos, pero además tiene gran relevancia desde el punto de vista clínico debido a que los boqueos están directamente relacionados al proceso de autorresucitación y de esta manera son primordiales para la supervivencia en condiciones de hipoxia severa (Adolph, E. F., 1969; Guntheroth, W. G. y Kawabori, I., 1975; Fung, M. L., Wang, W. y St John, W. M., 1994; St John, W. M., 1990, 1996; Deshpande, P. et al., 1999; Fewell, J. E. et al., 2000; Gozal, D. et al., 2002).

Más aún, desde 1972, French, J. W., Morgan, B. C. y Guntheroth, W. G. (French, J. W., Morgan, B. C. y Guntheroth, W. G., 1972) sugirieron que el SIDS está asociado con la inhabilidad de ciertos neonatos para generar boqueos y llevar a cabo la

autorresucitación. Esto nos permitirá explorar algunas estrategias para la protección de la actividad rítmica en la hipoxia con miras a encontrar blancos terapéuticos (en este caso fármacos) que pudieran fomentar la generación de boqueos y evitar la aparición de la apnea hipóxica.

11.1 Planteamiento del Problema

Existe bastante evidencia que respalda el papel fundamental del AMPc en la generación y mantenimiento de un ritmo respiratorio estable. Se ha sugerido que los fármacos que elevan la concentración de AMPc tienen una acción estimuladora en la red respiratoria, sin embargo, falta por aclarar si el efecto estimulador de estos fármacos, como la naloxona, la forskolina y el SKF-38393, depende de los niveles de oxigenación en el que se encuentra el circuito o si depende de la reconfiguración funcional del mismo, es decir, si la neuromodulación del circuito cambia debido a su reconfiguración funcional durante la hipoxia. Por esta razón nos planteamos la siguiente hipótesis:

12. Hipótesis

Las diferentes formas de respiración (eupnea, suspiros y boqueos) son neuromoduladas diferencialmente debido a la reconfiguración funcional del circuito.

13. Objetivos

13.1 Objetivo General

Determinar si hay diferencias en el efecto de la naloxona, la forskolina y el SKF-38393 sobre los ritmos respiratorios generados por el CPB *in vitro*.

13.2 Objetivos Específicos

- Determinar el efecto de la naloxona, la forskolina y el SKF-38393 sobre la eupnea ficticia en condiciones de normoxia.
- Determinar el efecto de la naloxona, la forskolina y el SKF-38393 sobre los boqueos ficticios en condiciones de hipoxia.
- Comparar los efectos de la naloxona, la forskolina y el SKF-38393 sobre los ritmos respiratorios en normoxia (eupnea ficticia) y en hipoxia (boqueos ficticios).

14. Método

14.1 Sujetos

Se utilizaron 72 ratones neonatos sin destetar de la cepa Swiss-Webster de 7 a 10 días de edad postnatal (P7-P10). Cada ratón, nacido por parto vaginal espontáneo, se mantuvo con su madre y hermanos hasta el momento del experimento. Las madres se alimentaron con dieta estándar (Purina, México) y agua *ad libitum*.

Los animales se sometieron a ciclos de 12 horas de luz blanca artificial, con lámparas de neón, y 12 horas de oscuridad (ciclo luz-oscuridad 12/12) y se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (20-25°C) regulada con un termostato electrónico. Aunque estas temperaturas están por debajo de la zona termoneutral de los ratones recién nacidos (Taylor, P. M., 1960), cada cría tuvo la oportunidad de seleccionar su temperatura ambiental al acurrucarse con sus hermanos y/o su madre (termoregulación conductual).

La manipulación de los animales se condujo por medio de procedimientos que implican el cuidado del animal en acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) y el Comité Ético del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados. Se realizaron todos los esfuerzos para minimizar el número de animales usados y su sufrimiento.

14.2 Aparatos

- Vibratomo 1000 Plus Sectioning System (The Vibratome Company, St. Louis, MO, USA).
- Bomba peristáltica RAININ Modelo RP-1 (Rainin Instrument, LLC, Oakland, CA, USA).
- Cámara de registro.
- Estirador de pipetas Sutter Modelo 97-B (Sutter Instrument Company, Novato, CA, USA).
- Amplificadores Grass Modelo 7P5B (Grass-Telefactor, An Astro-Med, Inc., West Warwick, RI, USA).
- Integradores Grass Modelo 7P3B (Grass-Telefactor, An Astro-Med, Inc., West Warwick, RI, USA).

14.3 Material

- Líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) (solución de Krebs) que contiene (en mM): 119 de NaCl, 30 D-glucosa, 25 de NaHCO₃, 3 de KCl, 1 de MgCl₂ y 1.5 de CaCl₂, a un pH de 7.4. El pH se mantuvo por gaseo constante con gas carbógeno (95% de O₂ y 5% de CO₂).
- Mezcla de gas carbógeno que contiene 95% de O₂ y 5% de CO₂.
- Mezcla de gas nitrógeno que contiene 95% de N₂ y 5% de CO₂.
- Agar.
- Navajas para disección.
- Capilares de borosilicato.

14.4 Fármacos

Para incrementar los niveles de AMPc se utilizaron los siguientes fármacos:

- Forskolina (activador de la adenilato ciclasa), a dos concentraciones diferentes*: 3 y 10 μ M.
- Hidrocloruro de Naloxona (antagonista opioidérgico), a dos concentraciones diferentes*: 1 y 5 μ M.
- Hidrocloruro de (\pm)-SKF-38393 (agonista a receptores dopaminérgicos D₁), a dos concentraciones diferentes*: 4 y 10 μ M.

La forskolina se diluyó en dimetilsulfoxido (DMSO) y el hidrocloruro de naloxona y el (\pm)-SKF-38393 en agua desionizada. Se obtuvieron de la casa comercial Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; con excepción del hidrocloruro de naloxona, el cual se obtuvo de la casa comercial Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA.

14.5 Procedimiento

14.5.1 Obtención de la Rebanada de Tallo Cerebral

Para la realización de estos experimentos se trabajó con rebanadas transversales de tallo cerebral que contienen el CPB y que pueden generar de manera espontánea el ritmo respiratorio *in vitro*. Para ello se utilizaron ratones neonatos de la cepa Swiss-Webster de 7 a 10 días de edad postnatal (P7-P10). Cada animal se anestesió con éter en una campana de extracción, se decapitó al nivel espinal C₃/C₄ y el tallo cerebral se aisló

* Se determinaron estas concentraciones de acuerdo con investigaciones previas donde utilizaron preparaciones *in vitro* (Greer, J. J., Carter, J. E. y al-Zubaidy, Z., 1995; Smith, D. O. et al., 1995; Takita, K. et al., 2000; Tanabe, A., Fuji, T. y Onimaru, H., 2005).

y colocó en LCRA (solución de Krebs modificada) frío ($\sim 4^{\circ}\text{C}$), que contiene (en mM): 119 de NaCl, 30 D-glucosa, 25 de NaHCO_3 , 3 de KCl, 1 de MgCl_2 y 1.5 de CaCl_2 , a un pH de 7.4 mantenido por gaseo constante de gas carbógeno (95% de O_2 y 5% de CO_2). El tallo cerebral se colocó sobre un bloque de agar (al 4%), con un ángulo de 15° con respecto al plano de la navaja y con la parte rostral hacia arriba. Mediante el uso del Vibratomo 1000 Plus Sectioning System (The Vibratome Company, St. Louis, MO, USA) se cortaron rebanadas transversales de 200-250 μm serialmente en dirección rostro-caudal hasta alcanzar el margen rostral del CPB. Esta región se encuentra caudal al núcleo facial y puede ser localizada por otra serie de estructuras que en nuestro caso funcionaron como referencia, tales como la OI, el NTS, el XII y el NA. En este sitio se realizó un corte de altura variable que dependió de la edad del animal. El grosor necesario para una rebanada de tallo cerebral de un animal de 1 día de edad postnatal (P-1) es de 480 μm y, con cada día de edad consecutivo, se añaden 10 μm al corte. Finalmente, se realizó un último corte de 700 μm ; ésta última rebanada rítmica contiene al CPB.

14.5.2 Registro de la Actividad Poblacional del CPB

La rebanada obtenida se colocó inmediatamente después en una cámara de registro perfundida con un flujo constante de LCRA (solución de Krebs modificada) saturada con gas carbógeno (95% de O_2 y 5 % de CO_2), mediante una bomba peristáltica RAININ (modelo RP-1, Rainin Instrument, LLC, Oakland, CA, USA), a una velocidad de 20 ml/min y a temperatura de $28\text{-}31^{\circ}\text{C}^*$. Después de estabilizar la rebanada durante 10 minutos, la concentración de KCl del LCRA (solución de Krebs

* Esta temperatura se adoptó porque la amplitud del ritmo era mayor y se mantenía mejor; a mayores temperaturas, el ritmo tendía a deteriorarse probablemente porque el consumo de O_2 y de glucosa se incrementaba (Suzue, T., 1984).

modificada), se aumentó gradualmente de 3 a 8 mM en un lapso de 20 minutos, con la finalidad de aumentar la excitabilidad y, por lo tanto, de inducir el ritmo respiratorio en la rebanada. Para obtener el ritmo respiratorio *in vitro*, se llevaron a cabo registros de la actividad de campo (poblacional) del CPB en experimentos individuales mediante microelectrodos extracelulares de succión, cuya señal se amplificó 5000-10000 veces y se filtró (ancho de banda=3-3000 Hz) con amplificadores Grass modelo 7P5B (Grass-Telefactor, An Astro-Med, Inc., West Warwick, RI, USA). Este registro además se rectificó e integró electrónicamente con integradores Grass modelo 7P3B (Grass-Telefactor, An Astro-Med, Inc., West Warwick, RI, USA) y se grabó mediante el programa informático AxoTape (versión 2.0; Axon Instruments, Union City, CA, USA). Dependiendo del protocolo experimental seguido (ver más abajo), la preparación se sometió a diferentes condiciones de oxigenación.

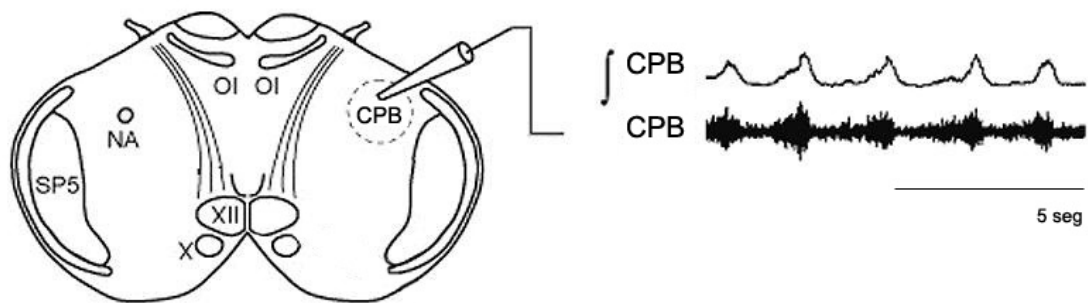


Figura 12. Representación de rebanada de tallo cerebral de ratón de 700 μm de grosor que muestra la localización del Complejo Pre-Bötzinger (CPB) y sus estructuras vecinas: SP5 (núcleo espinal del trigémino), XII (núcleo del nervio hipogloso), X (núcleo dorsal motor del nervio vago), NA (núcleo ambiguo) y OI (oliva inferior). Se colocó un electrodo de registro extracelular en la superficie del CPB para registrar la actividad poblacional. A la derecha se presenta el trazo representativo de un registro, con la actividad poblacional integrada en la parte superior y la actividad poblacional pura debajo de ella (Adaptada de Ramirez, J. M. et al., 1997 y de Lieske, S. P. et al., 2000).

14.6 Diseño Experimental

En la presente investigación, el efecto de los fármacos que elevan la concentración de AMPc en la red respiratoria se examinó administrando Naloxona (1 y 5 μ M), Forskolina (3 y 10 μ M) y/o SKF-38393 (4 y 10 μ M) en rebanadas individuales (n=6 para cada grupo). Se analizaron los resultados desde dos perspectivas: 1) Sus efectos en condiciones de normoxia y; 2) Sus efectos en condiciones de hipoxia, es decir, en su capacidad de generar boqueos. A continuación se presenta una tabla donde se muestra el diseño experimental seguido en esta investigación y, posteriormente, la descripción del mismo.

GRUPO	PROTOCOLO	FÁRMACOS	CONCENTRACIONES	
Grupo Experimental 1	Fármaco en Normoxia	Naloxona	1 μ M n = 6	5 μ M n = 6
		Forskolina	3 μ M n = 6	10 μ M n = 6
		SKF-38393	4 μ M n = 6	10 μ M n = 6
Grupo Experimental 2	Fármaco en Hipoxia	Naloxona	1 μ M n = 6	5 μ M n = 6
		Forskolina	3 μ M n = 6	10 μ M n = 6
		SKF-38393	4 μ M n = 6	10 μ M n = 6

Tabla 1. Diseño Experimental.

1. Grupo Experimental 1

Fármaco en Normoxia

1. La preparación se sometió a condiciones de normoxia [oxigenación normal (95% de O₂ y 5 % de CO₂)] durante 10 minutos como registro control (eupnea y suspiros);

2. Finalmente, el fármaco se añadió en la solución que bañaba a la rebanada (LCRA) durante 10 minutos.

Esto con el propósito de evaluar y comparar los parámetros cuantificados (ver más abajo) en condiciones control (normoxia) y en presencia del fármaco (normoxia + fármaco), es decir, antes y después del tratamiento (ver Figura 13).

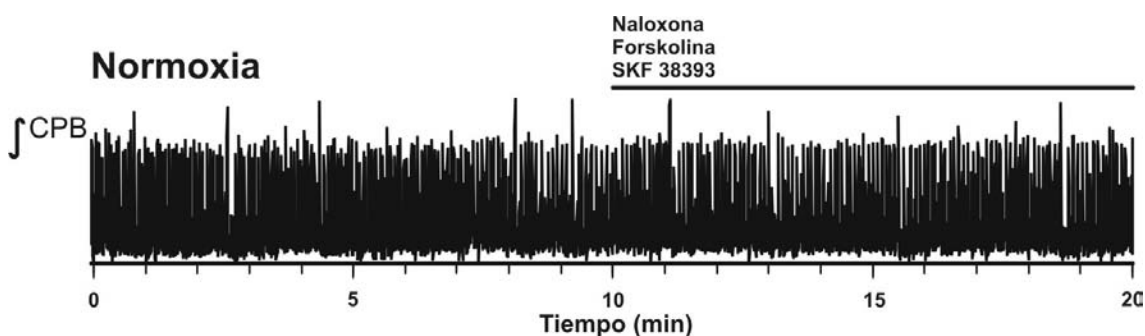


Figura 13. Grupo Experimental 1. Se muestra un registro individual (JCPB, P7) en condiciones de normoxia en el que se indica el protocolo seguido para este grupo. 1) Se realizó el registro en condiciones basales durante 10 min (registro control). 2) Finalmente, el fármaco se añadió en el LCRA durante 10 min. Se aplicaron tres fármacos diferentes en dos concentraciones diferentes [Naloxona (1 y 5 μM), Forskolina (3 y 10 μM) y/o SKF-38393 (4 y 10 μM)]. Cada experimento se realizó en rebanadas individuales y consistió de una n=6 para cada grupo.

2. Grupo Experimental 2

Fármaco en Hipoxia

1. La preparación se sometió a condiciones de normoxia [oxigenación normal (95% de O_2 y 5 % de CO_2)] durante 10 minutos como registro necesario que antecede a la hipoxia;
2. Posteriormente, se indujo la hipoxia simplemente intercambiando la mezcla de gas carbógeno (95% de O_2 y 5 % de CO_2) por una mezcla en la que todo

el oxígeno se sustituyó por el gaseo con mezcla de nitrógeno (95% de N₂ y 25% de CO₂) durante 10 minutos como registro control (boqueos);

- Finalmente, el fármaco se añadió en la solución que bañaba a la rebanada (LCRA) durante 10 minutos.

Esto con el propósito de evaluar y comparar los parámetros cuantificados (ver más abajo) en condiciones control (hipoxia) y en presencia del fármaco (hipoxia + fármaco), es decir, antes y después del tratamiento (ver Figura 14).

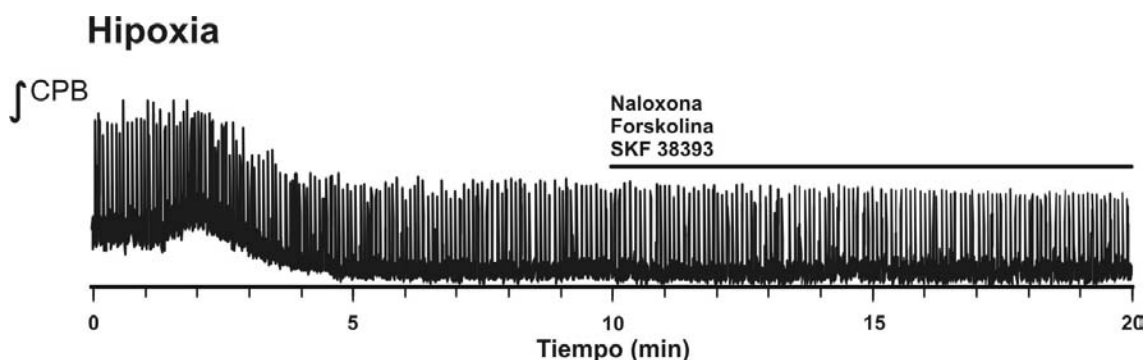


Figura 14. Grupo Experimental 2. Se muestra un registro individual (∫CPB, P7) en condiciones de hipoxia en el que se indica el protocolo seguido para este grupo. 1) Se realizó el registro en condiciones basales durante 10 min (registro control), el cual, como se puede observar, incluye la fase de aceleración y depresión que caracterizan a la hipoxia. 2) Finalmente, el fármaco se añadió en el LCRA durante 10 min. Se aplicaron tres fármacos diferentes en dos concentraciones diferentes [Naloxona (1 y 5 μM), Forskolina (3 y 10 μM) y/o SKF-38393 (4 y 10 μM)]. Cada experimento se realizó en rebanadas individuales y consistió de una n=6 para cada grupo.

14.6.1 Parámetros Analizados

Se tomaron los últimos 2 minutos representativos de cada etapa (ver más abajo) para analizar las siguientes características de cada ráfaga poblacional:

- 1) **Amplitud:** la distancia que hay entre la línea basal y el ápice de una ráfaga.
En este trabajo la amplitud se muestra en microvoltios (μV) (ver Figura 15).
- 2) **Duración media:** el tiempo que transcurre entre los dos sitios ubicados en el punto medio de la pendiente de subida (ver Figura 15).
- 3) **Tiempo de subida 10% a 90%:** el tiempo (en milisegundos) que transcurre en el registro entre dos puntos situados en el 10 y 90% de la amplitud máxima de cada ráfaga, respectivamente (ver Figura 15).
- 4) **Área de la ráfaga:** el área que hay debajo de la ráfaga, es decir, el área que abarca la ráfaga (ver Figura 15).
- 5) **Irregularidad:** la diferencia de tiempo que existe entre la ocurrencia de tres eventos consecutivos (ver Figura 15).
- 6) **Frecuencia:** el número de veces que se repite un evento dado en una escala de tiempo definida. La frecuencia se expresa en hertz (Hz) (ver Figura 15).

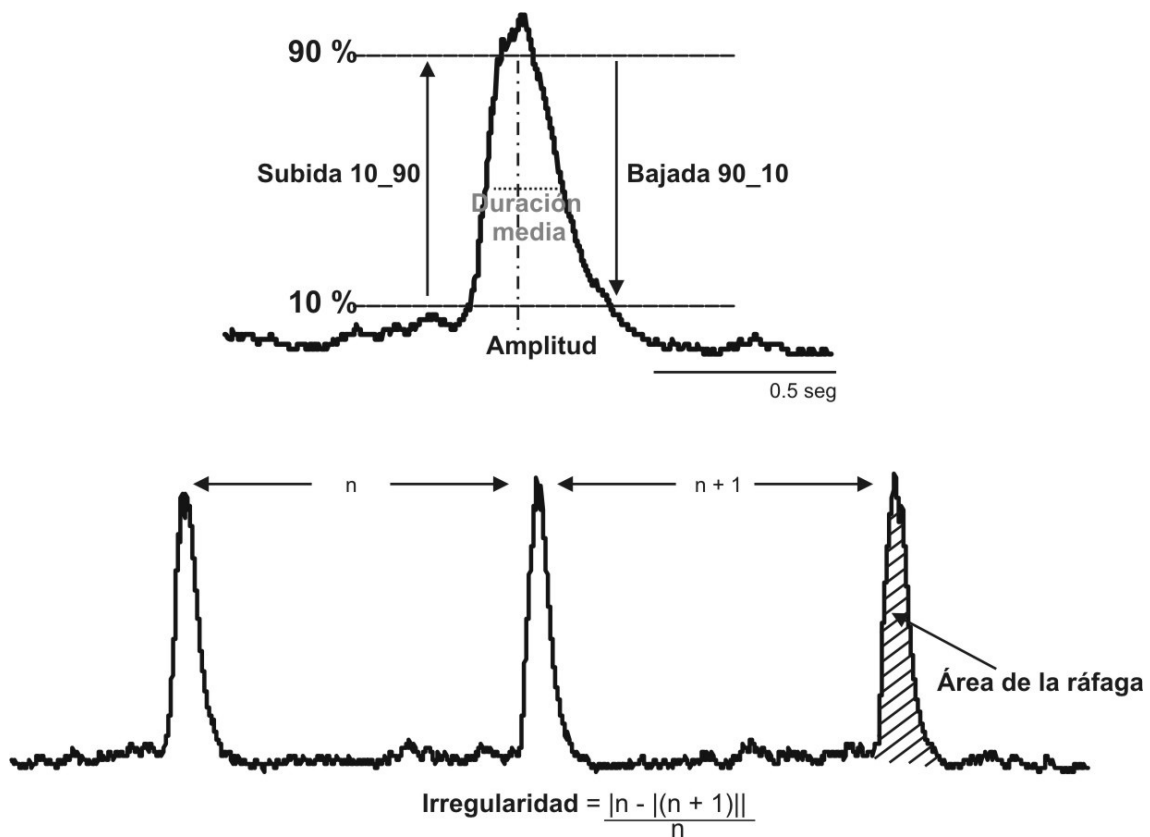


Figura 15. Parámetros analizados. Se ilustran los parámetros medidos en cada ráfaga poblacional de la eupnea y de los boqueos.

14.6.2 Obtención y Análisis de Datos

Como se mencionó anteriormente, los registros se almacenaron en línea en computadora con el uso de tarjetas de grabación convertidoras analógico-digital de National Instruments Corporation (National Instruments Corporation, Austin, TX, USA) y se grabaron mediante el programa informático AxoTap (versión 2.0; Axon Instruments, Union City, CA, USA).

Los registros obtenidos se analizaron en una computadora personal mediante el programa informático Igor Pro versión 4.0.5.1 (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA).

Con el propósito de llevar a cabo el análisis estadístico de cada parámetro cuantificado, se normalizaron los datos de la siguiente manera:

1. En el caso del **Grupo Experimental 1 (Fármaco en Normoxia)**:

- a) De los 10 minutos del registro control, tomamos los últimos 5 minutos (minuto 5 a 10). El promedio de estos 5 minutos se igualó a 1 (ver Figura 16 a).
- b) Las medidas de los valores control se calcularon del promedio de las ráfagas registradas durante los 2 últimos minutos representativos (minuto 8 a 10) del registro control (antes de la aplicación del fármaco) y se igualaron respecto a la media de los 5 minutos del registro control (ver Figura 16 b).
- c) De igual modo, las medidas de los valores del fármaco se calcularon del promedio de las ráfagas registradas durante los 2 últimos minutos representativos (minuto 18 a 20) del registro en presencia del fármaco (control + fármaco) y se igualaron respecto a la media de los 5 minutos del registro control (ver Figura 16 c).

2. En el caso del **Grupo Experimental 2 (Fármaco en Hipoxia)**:

- a) De los 10 minutos del registro control, a diferencia del Grupo Experimental 1 (Fármaco en Normoxia), tomamos los últimos 4 minutos (minuto 6 a 10), debido a que nuestro interés se encuentra específicamente en la etapa de boqueos y el periodo de estabilización se alcanza hasta el minuto 6. El promedio de estos 4 minutos se igualó a 1 (ver Figura 17 a).

- b) Las medidas de los valores control se calcularon del promedio de las ráfagas registradas durante los 2 últimos minutos representativos (minuto 8 a 10) del registro control (antes de la aplicación del fármaco) y se igualaron respecto a la media de los 4 minutos del registro control (ver Figura 17 b).
- c) De igual modo, las medidas de los valores del fármaco se calcularon del promedio de las ráfagas registradas durante los 2 últimos minutos representativos (minuto 18 a 20) del registro en presencia del fármaco (control + fármaco) y se igualaron respecto a la media de los 4 minutos del registro control (ver Figura 17 c).

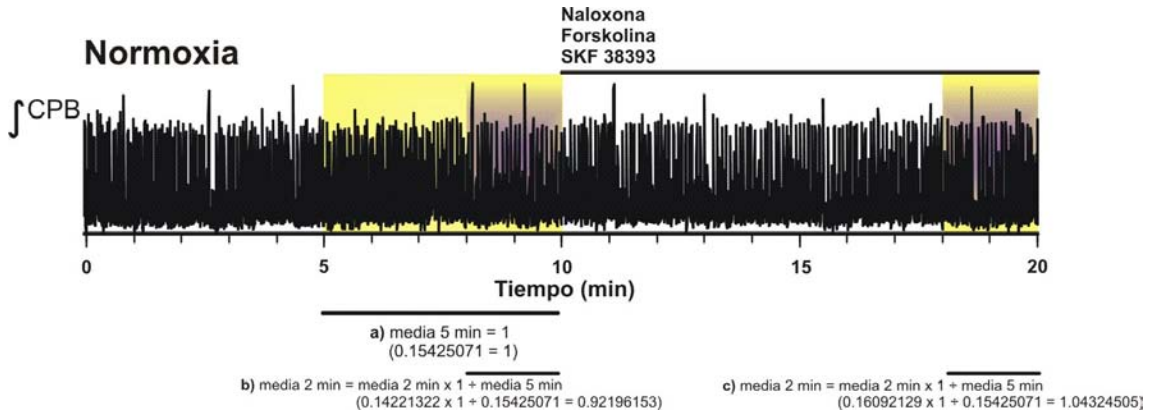


Figura 16. Normalización de los datos. Grupo Experimental 1 Fármaco en Normoxia. Se muestra un registro individual (\int CPB, P7) en condiciones de normoxia en el que se indica las etapas en que se dividió cada registro para su análisis. **a)** De los 10 minutos del registro control, tomamos los últimos 5 minutos como representativos del registro control (minuto 5 a 10). El promedio de estos 5 minutos se igualó a 1 como lo muestra el ejemplo debajo de la barra (área sombreada amarilla); **b)** De estos 5 minutos del registro control tomamos los últimos 2 minutos como representativos (minuto 8 a 10). El promedio de estos 2 minutos se igualó respecto a la media de los 5 minutos del registro control como lo muestra el ejemplo debajo de la barra (área sombreada amarillo con morado); **c)** De igual modo, en el caso del fármaco, tomamos los últimos 2 minutos del registro como representativos (minuto 18 a 20). El promedio de estos dos minutos se igualó respecto a la media de los 5 minutos del registro control como lo muestra el ejemplo debajo de la barra (área sombreada amarillo con morado). Se aplicaron tres fármacos diferentes en dos concentraciones diferentes [Naloxona (1 y 5 μ M), Forskolina (3 y 10 μ M) y/o SKF-38393 (4 y 10 μ M)]. Cada experimento se realizó en rebanadas individuales y consistió de una n=6 para cada grupo.

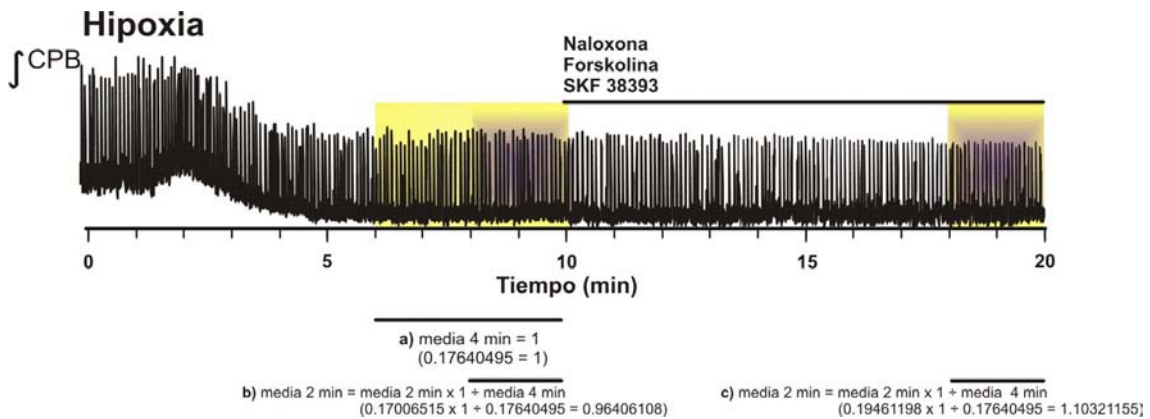


Figura 17. Normalización de los datos. Grupo Experimental 2 Fármaco en Hipoxia. Se muestra un registro individual (\int CPB, P7) en condiciones de hipoxia en el que se indica las etapas en que se dividió cada registro para su análisis. **a)** De los 10 minutos del registro control, tomamos los últimos 4 minutos como representativos del registro control (minuto 6 a 10), debido a que, como se puede observar, el periodo de estabilización se alcanza hasta el minuto 6. El promedio de estos 4 minutos se igualó a 1 como lo muestra el ejemplo debajo de la barra (área sombreada amarilla); **b)** De estos 4 minutos del registro control tomamos los últimos 2 minutos como representativos (minuto 8 a 10). El promedio de estos 2 minutos se igualó respecto a la media de los 4 minutos del registro control como lo muestra el ejemplo debajo de la barra (área sombreada amarillo con morado); **c)** De igual modo, en el caso del fármaco, tomamos los últimos 2 minutos del registro como representativos (minuto 18 a 20). El promedio de estos dos minutos se igualó respecto a la media de los 4 minutos del registro control como lo muestra el ejemplo debajo de la barra (área sombreada amarillo con morado). Se aplicaron tres fármacos diferentes en dos concentraciones diferentes [Naloxona (1 y 5 μ M), Forskolina (3 y 10 μ M) y/o SKF-38393 (4 y 10 μ M)]. Cada experimento se realizó en rebanadas individuales y consistió de una n=6 para cada grupo.

3. Finalmente, como uno de nuestros objetivos era comparar los efectos de los fármacos en condiciones de normoxia e hipoxia, tomamos las diferencias de: control vs. fármaco (en condiciones de normoxia) *VS.* control vs. fármaco (en condiciones de hipoxia). Esto para cada fármaco y para cada una de sus concentraciones.
 - d) Una vez calculadas y normalizadas las medidas de los valores control tanto en condiciones de normoxia como en condiciones de hipoxia (ver Figura 18 b) y de los valores del fármaco tanto en condiciones de normoxia como en condiciones de hipoxia (ver Figura 18 c) como se acaba de mencionar, procedimos a calcular las diferencias entre éstos (antes y después del tratamiento) en ambas condiciones experimentales (normoxia e hipoxia) (ver Figura 18 d).

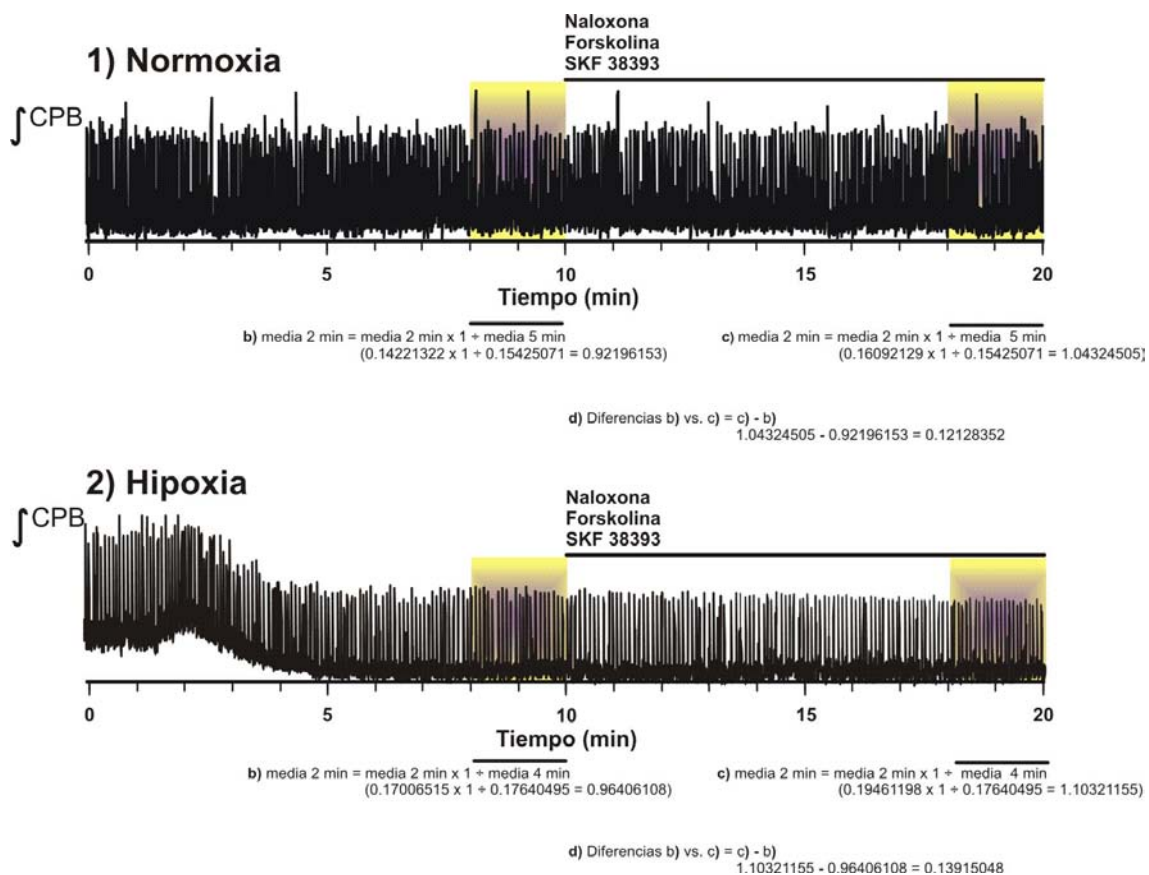


Figura 18. Normalización de los datos. Grupo Experimental 1 (Fármaco en Normoxia) vs. Grupo Experimental 2 (Fármaco en Hipoxia). Se muestran dos registros individuales (∫CPB, P7) en condiciones de normoxia (1) e hipoxia (2) en los que se indica las etapas en que se dividió cada registro para su análisis. **b)** Se muestra el promedio de los últimos 2 minutos representativos del registro control (minuto 8 a 10) en ambas condiciones experimentales (normoxia e hipoxia) normalizados (como se demostró anteriormente) como lo muestra el ejemplo debajo de la barra (área sombreada amarillo con morado); **c)** De igual modo, en el caso del fármaco, se muestra el promedio de los últimos 2 minutos representativos del registro en presencia de fármaco (minuto 18 a 20) en ambas condiciones experimentales (normoxia e hipoxia) normalizados (como se demostró anteriormente) como lo muestra el ejemplo debajo de la barra (área sombreada amarillo con morado); **d)** Finalmente, se muestran las diferencias b) vs. c) en ambas condiciones experimentales (normoxia e hipoxia). Se aplicaron tres fármacos diferentes en dos concentraciones diferentes [Naloxona (1 y 5 μ M), Forskolina (3 y 10 μ M) y/o SKF-38393 (4 y 10 μ M)]. Cada experimento se realizó en rebanadas individuales y consistió de una n=6 para cada grupo.

14.6.3 Análisis Estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo en el paquete estadístico SigmaStat versión 3.11 [Systat Software Inc. (SSI), San Jose, CA, USA]. Se utilizó el Análisis de Varianza No Paramétrico en Rangos de Una Vía Kruskal-Wallis seguido de la prueba *post hoc* de comparaciones múltiples Student-Newman Keuls. Esto con el propósito de determinar si la Naloxona, la Forskolina y/o el SKF-38393 en sus dos concentraciones, afectaron los parámetros medidos, tanto en condiciones de normoxia como en condiciones de hipoxia. Para comparar los parámetros en condiciones control y en presencia de los fármacos (así como para comparar los efectos de las dos concentraciones), es decir, antes y después del tratamiento, los factores fueron: control *vs.* fármaco (normoxia) y control *vs.* fármaco (hipoxia); finalmente, para comparar los parámetros en condiciones de normoxia *vs.* condiciones de hipoxia, los factores fueron: diferencias control-fármaco (en condiciones de normoxia) *VS.* diferencias control-fármaco (en condiciones de hipoxia). Esto para cada parámetro evaluado y para cada uno de los fármacos en sus dos concentraciones diferentes.

Todos los resultados se presentan como medias \pm error estándar de la media (S.E.M). En todos los casos se utilizó un valor de $P < 0.05$ para determinar que existen diferencias estadísticamente significativas entre los datos comparados. Este estudio se basó en 72 registros poblacionales en 72 rebanadas.

15. Resultados

En las figuras 19 a 21 se muestran los resultados del Protocolo Experimental 1 (*Fármaco en Normoxia*); mientras que en las figuras 22 a 24 se muestran los resultados del Protocolo Experimental 2 (*Fármaco en Hipoxia*)*. Finalmente, en las figuras 25 a 30 se muestran los resultados de las diferencias de los efectos de los fármacos en normoxia vs. hipoxia.

15.1 Efectos de Naloxona, Forskolina y SKF-38393 en *Normoxia* (Protocolo Experimental 1)

15.1.1 Efectos de Naloxona en Normoxia

Como se puede observar en la figura 19, únicamente encontramos un efecto estadísticamente significativo de la naloxona en la amplitud y en la frecuencia del ritmo respiratorio en normoxia.

La naloxona 5 μM (1.064 ± 0.0248) ejerce un aumento estadísticamente significativo en la amplitud del ritmo respiratorio en normoxia comparado con su control (0.997 ± 0.00728 , $P < 0.05$). Además, al comparar las dos concentraciones, encontramos que el efecto de la naloxona 5 μM (1.064 ± 0.0248) en normoxia es significativamente diferente al de la naloxona 1 μM (0.974 ± 0.0194 , $P < 0.05$) en normoxia.

* Cabe aclarar que ya que cada uno de los registros control fueron normalizados a 1, en base al promedio de los mismos [ver Obtención y Análisis de Datos (14.6.2)], se muestra el control como 1 para todos los casos con el propósito de facilitar la interpretación de los datos.

En el caso de la frecuencia del ritmo respiratorio en normoxia, se puede observar que ambas concentraciones ejercen un efecto estadísticamente significativo. La naloxona 1 μM (1.098 ± 0.0211) produce un aumento estadísticamente significativo en la frecuencia del ritmo respiratorio en normoxia comparado con su control (0.988 ± 0.0160 , $P < 0.05$), así como la naloxona 5 μM (1.087 ± 0.0252) también produce un aumento estadísticamente significativo en la frecuencia del ritmo respiratorio en normoxia comparado con su control (1.012 ± 0.00558 , $P < 0.05$). Sin embargo, al comparar las dos concentraciones, encontramos que no hay diferencias estadísticamente significativas entre ellas.

Efectos de Naloxona en Normoxia

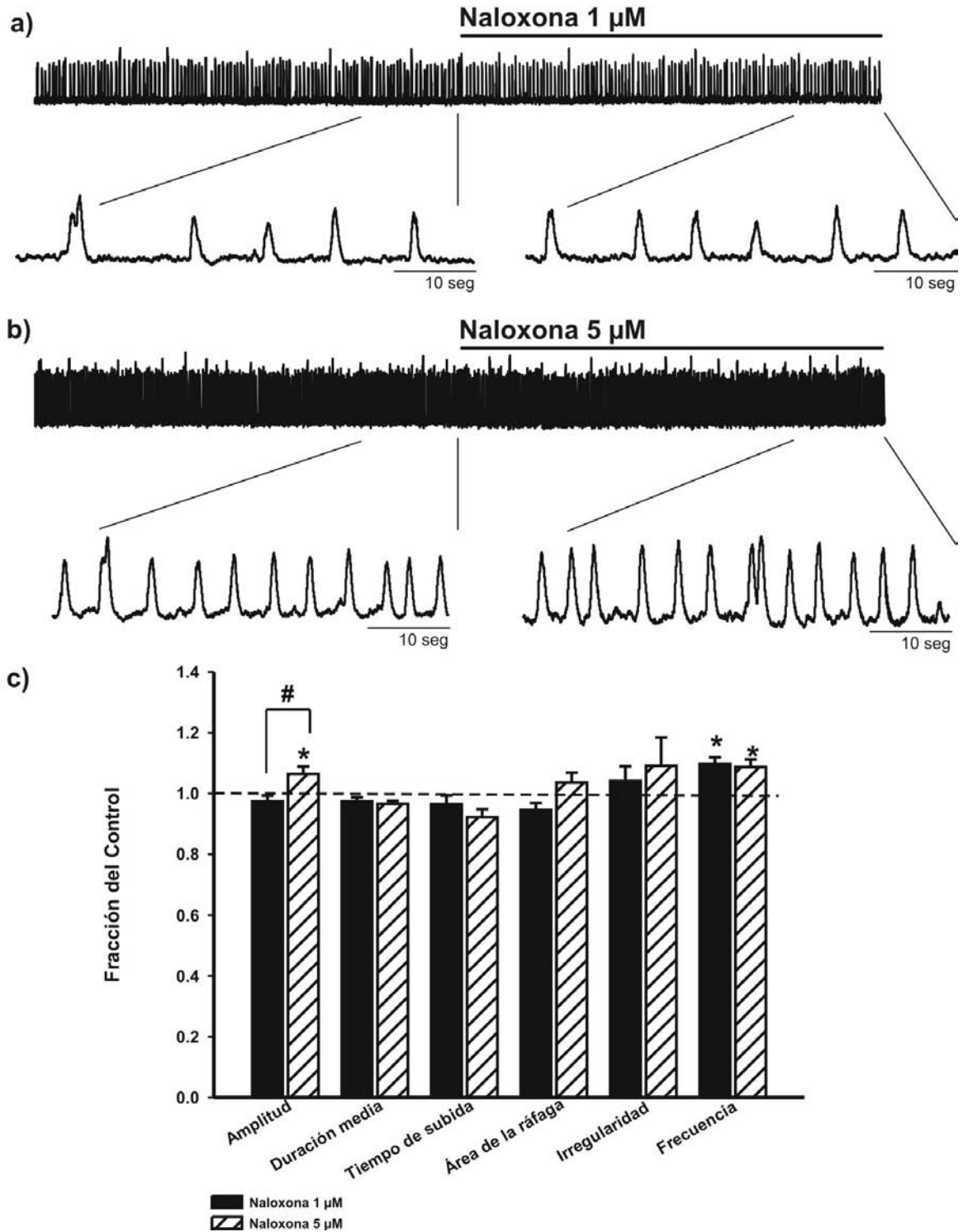


Figura 19. Efectos de Naloxona en Normoxia. Comparación de los efectos de naloxona 1 y 5 μM en los distintos parámetros medidos (c). Se muestra un registro representativo de los efectos de naloxona 1 μM (a) y 5 μM (b) en normoxia. Debajo de cada registro se comparan 50 seg. de ráfagas ampliadas (de los últimos 2 minutos) de la eupnea ficticia (control) contra las mismas pero en presencia de la naloxona, respectivamente. Los registros y las ráfagas se muestran a la misma escala con propósitos de comparación. * $P < 0.05$ comparado contra su propio control (línea punteada); # $P < 0.05$ comparado entre concentraciones.

15.1.2 Efectos de Forskolina en Normoxia

Como se puede observar en la figura 20, la forskolina 10 μM (0.819 ± 0.0307) ejerce una depresión estadísticamente significativa en la amplitud del ritmo respiratorio en normoxia comparado con su control (0.997 ± 0.00392 , $P < 0.05$). Además, al comparar las dos concentraciones, encontramos que el efecto de la forskolina 10 μM (0.819 ± 0.0307) en normoxia es significativamente diferente al de la forskolina 3 μM (0.953 ± 0.0335 , $P < 0.05$) en normoxia.

En el caso de la duración media del ritmo respiratorio en normoxia, se puede observar que únicamente la forskolina 3 μM (0.857 ± 0.0404) ejerce una depresión estadísticamente significativa en la duración media del ritmo respiratorio en normoxia comparado con su control (1.011 ± 0.00830 , $P < 0.05$).

Cuando evaluamos y comparamos el efecto de la forskolina 3 y 10 μM en el tiempo de subida del ritmo respiratorio en normoxia, observamos que ninguna concentración ejerce un efecto estadísticamente significativo comparado con su control. Sin embargo, al comparar las dos concentraciones, encontramos que el efecto de la forskolina 10 μM (1.193 ± 0.0836) en normoxia es significativamente diferente al de la forskolina 3 μM (0.897 ± 0.0572 , $P < 0.05$) en normoxia.

En el caso del área de la ráfaga del ritmo respiratorio en normoxia, se puede observar que ambas concentraciones tienen un efecto estadísticamente significativo. La forskolina 3 μM (0.749 ± 0.0550) ejerce una depresión estadísticamente significativa en el área de la ráfaga del ritmo respiratorio en normoxia comparado con su control (1.008 ± 0.0125 , $P < 0.05$); así como la forskolina 10 μM (0.656 ± 0.0543) también produce una depresión estadísticamente significativa en el área de la ráfaga del ritmo respiratorio en normoxia comparado con su control (1.013 ± 0.0121 , $P < 0.05$). Sin embargo, al

comparar las dos concentraciones, encontramos que no hay diferencias estadísticamente significativas entre ellas.

Respecto a la irregularidad del ritmo respiratorio en normoxia, encontramos que éste fue el único parámetro evaluado donde no existieron efectos estadísticamente significativos de la forskolina en ninguna de sus dos concentraciones.

Finalmente, en el caso de la frecuencia del ritmo respiratorio en normoxia, se puede observar que ambas concentraciones tienen un efecto estadísticamente significativo. La forskolina 3 μM (1.446 ± 0.0990) ejerce un aumento estadísticamente significativo en la frecuencia del ritmo respiratorio en normoxia comparado con su control (1.022 ± 0.0152 , $P < 0.05$), así como la forskolina 10 μM (1.661 ± 0.134) también produce un aumento estadísticamente significativo en la frecuencia del ritmo respiratorio en normoxia comparado con su control (1.029 ± 0.00781 , $P < 0.05$). Sin embargo, al comparar las dos concentraciones, encontramos que no hay diferencias estadísticamente significativas entre ellas.

Efectos de Forskolina en Normoxia

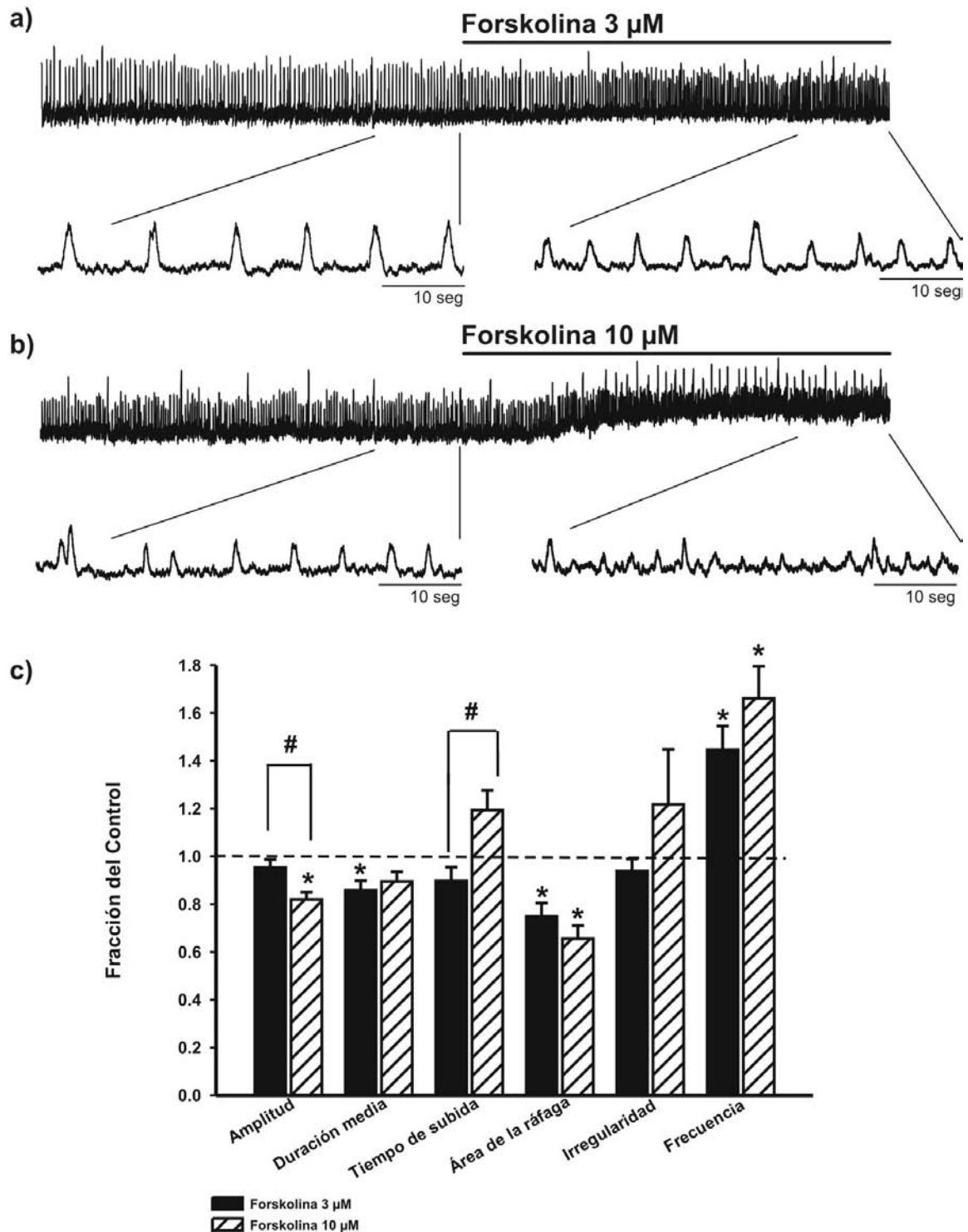


Figura 20. Efectos de Forskolina en Normoxia. Comparación de los efectos de forskolina 3 y 10 μM en los distintos parámetros medidos (c). Se muestra un registro representativo de los efectos de forskolina 3 μM (a) y 10 μM (b) en normoxia. Debajo de cada registro se comparan 50 seg. de ráfagas ampliadas (de los últimos 2 minutos) de la eupnea ficticia (control) contra las mismas pero en presencia de la forskolina, respectivamente. Los registros y las ráfagas se muestran a la misma escala con propósitos de comparación. * $P < 0.05$ comparado contra su propio control (línea punteada); # $P < 0.05$ comparado entre concentraciones.

15.1.3 Efectos de SKF-38393 en Normoxia

Como se puede observar en la figura 21, únicamente encontramos un efecto estadísticamente significativo del SKF-38393 en la amplitud y en la irregularidad del ritmo respiratorio en normoxia.

Ambas concentraciones ejercen un efecto estadísticamente significativo en la amplitud del ritmo respiratorio en normoxia. El SKF-38393 4 μM (1.095 ± 0.0496) produce un aumento estadísticamente significativo en la amplitud del ritmo respiratorio en normoxia comparado con su control (1.005 ± 0.00549 , $P < 0.05$), así como el SKF-38393 10 μM (1.105 ± 0.0316) también produce un aumento estadísticamente significativo en la amplitud del ritmo respiratorio en normoxia comparado con su control (0.996 ± 0.00421 , $P < 0.05$). Sin embargo, al comparar las dos concentraciones, encontramos que no hay diferencias estadísticamente significativas entre ellas.

Finalmente, observamos que, como en el caso de la amplitud, ambas concentraciones ejercen un efecto estadísticamente significativo en la irregularidad del ritmo respiratorio en normoxia. El SKF-38393 4 μM (2.625 ± 0.598) produce un aumento estadísticamente significativo en la irregularidad del ritmo respiratorio en normoxia comparado con su control (0.913 ± 0.0421 , $P < 0.05$); así como el SKF-38393 10 μM (1.674 ± 0.211) también produce un aumento estadísticamente significativo en la irregularidad del ritmo respiratorio en normoxia comparado con su control (1.016 ± 0.0239 , $P < 0.05$). Sin embargo, al comparar las dos concentraciones, encontramos que no hay diferencias estadísticamente significativas entre ellas.

Efectos de SKF-38393 en Normoxia

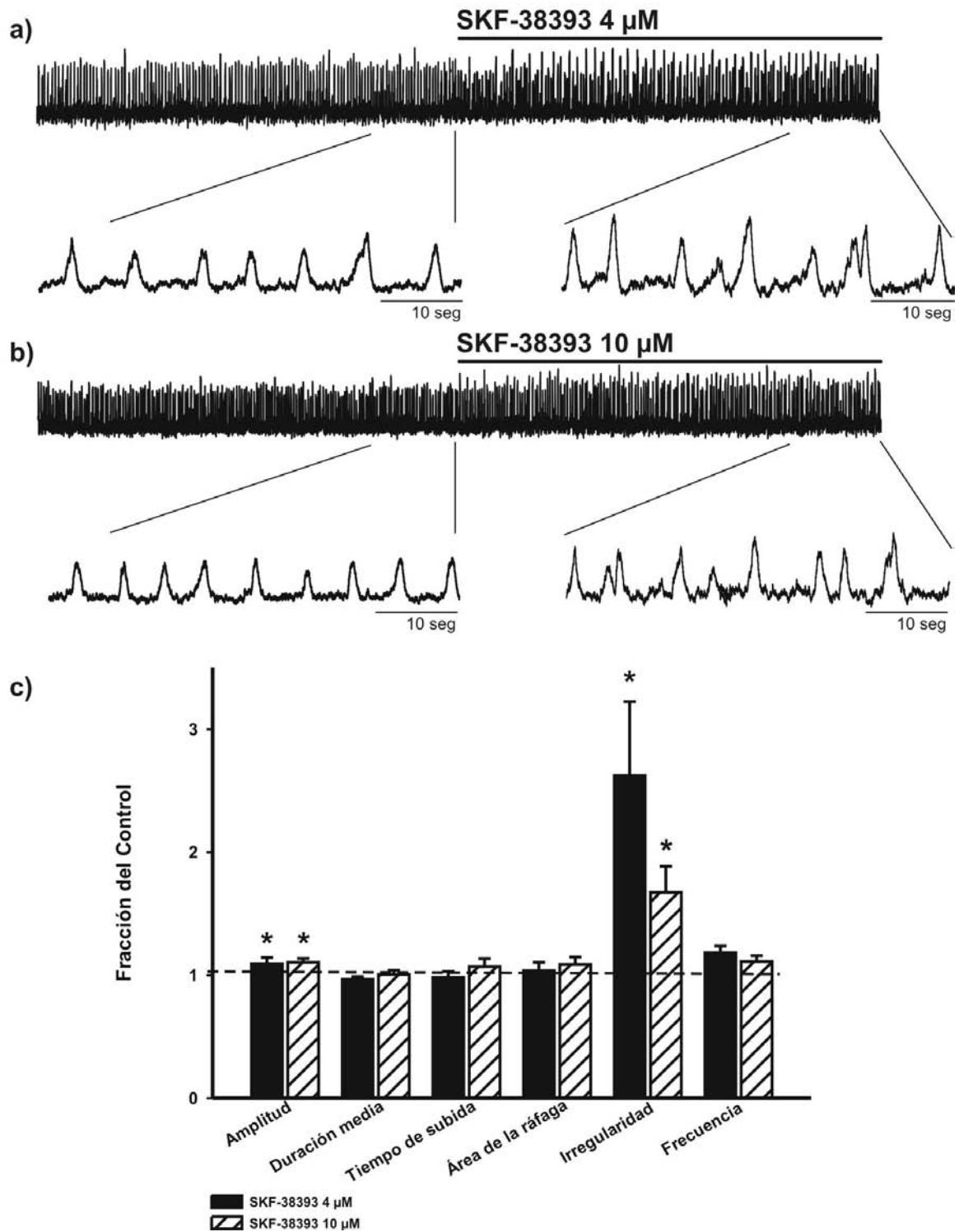


Figura 21. Efectos de SKF-38393 en Normoxia. Comparación de los efectos de SKF-38393 4 y 10 μ M en los distintos parámetros medidos (c). Se muestra un registro representativo de los efectos de SKF-38393 4 μ M (a) y 10 μ M (b) en normoxia. Debajo de cada registro se comparan 50 seg. de ráfagas ampliadas (de los últimos 2 minutos) de la eupnea ficticia (control) contra las mismas pero en presencia del SKF-38393, respectivamente. Los registros y las ráfagas se muestran a la misma escala con propósitos de comparación. * $P < 0.05$ comparado contra su propio control (línea punteada); # $P < 0.05$ comparado entre concentraciones.

15.2 Efectos de Naloxona, Forskolina y SKF-38393 en *Hipoxia*

(Protocolo Experimental 2)

15.2.1 Efectos de Naloxona en Hipoxia

Como se puede observar en la figura 22, únicamente encontramos un efecto estadísticamente significativo de la naloxona en la frecuencia del ritmo respiratorio en hipoxia.

Únicamente la naloxona 5 μM (1.161 ± 0.0611) ejerce un aumento estadísticamente significativo en la frecuencia del ritmo respiratorio en hipoxia comparado con su control (0.942 ± 0.0109 , $P < 0.05$). Además, al comparar las dos concentraciones, encontramos que el efecto de la la naloxona 5 μM (1.161 ± 0.0611) en hipoxia es significativamente diferente al de la naloxona 1 μM (1.075 ± 0.0891 , $P < 0.05$) en hipoxia.

Efectos de Naloxona en Hipoxia

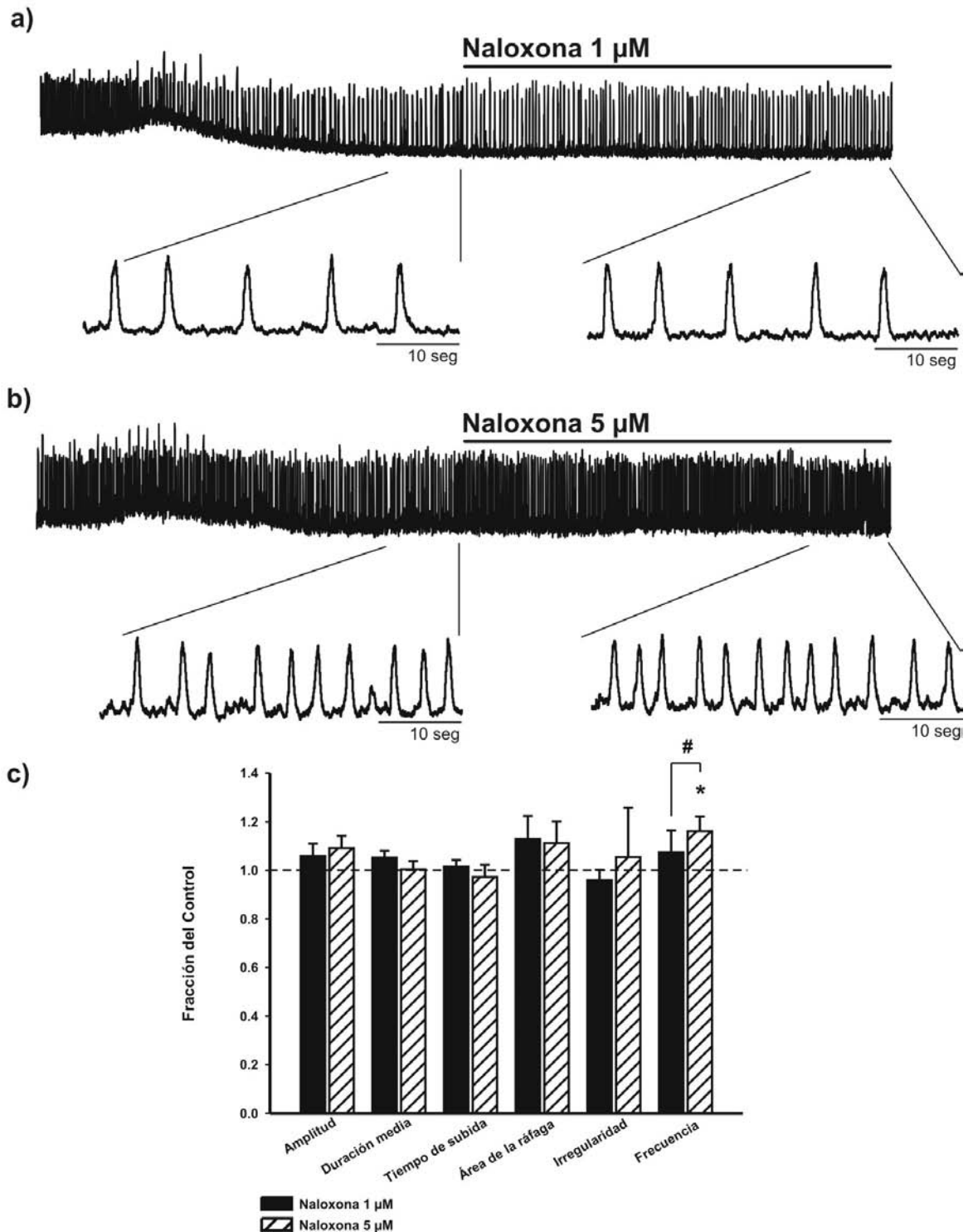


Figura 22. Efectos de Naloxona en Hipoxia. Comparación de los efectos de naloxona 1 y 5 μM en los distintos parámetros medidos (c). Se muestra un registro representativo de los efectos de naloxona 1 μM (a) y 5 μM (b) en hipoxia. Debajo de cada registro se comparan 50 seg. de ráfagas ampliadas (de los últimos 2 minutos) de los boqueos ficticios (control) contra los mismos pero en presencia de la naloxona, respectivamente. Los registros y las ráfagas se muestran a la misma escala con propósitos de comparación. * $P < 0.05$ comparado contra su propio control (línea punteada); # $P < 0.05$ comparado entre concentraciones.

15.2.2 Efectos de Forskolina en Hipoxia

Como se puede observar en la figura 23, únicamente encontramos un efecto estadísticamente significativo de la forskolina en la amplitud y en la frecuencia del ritmo respiratorio en hipoxia.

La forskolina 10 μM (0.748 ± 0.0765) ejerce una depresión estadísticamente significativa en la amplitud del ritmo respiratorio en hipoxia comparado con su control (1.015 ± 0.00701 , $P < 0.05$). Además, al comparar las dos concentraciones, encontramos que el efecto de la forskolina 10 μM (0.748 ± 0.0765) en hipoxia es significativamente diferente al de la forskolina 3 μM (1.037 ± 0.0230 , $P < 0.05$) en hipoxia.

En el caso de la frecuencia del ritmo respiratorio en hipoxia, se puede observar que ambas concentraciones ejercen un efecto estadísticamente significativo. La forskolina 3 μM (1.285 ± 0.0894) produce un aumento estadísticamente significativo en la frecuencia del ritmo respiratorio en hipoxia comparado con su control (0.990 ± 0.0110 , $P < 0.05$), así como la forskolina 10 μM (1.632 ± 0.175) también produce un aumento estadísticamente significativo en la frecuencia del ritmo respiratorio en hipoxia comparado con su control (0.974 ± 0.00854 , $P < 0.05$). Además, al comparar las dos concentraciones, encontramos que el efecto de la forskolina 3 μM (1.285 ± 0.0894) en hipoxia es significativamente diferente al de la forskolina 10 μM (1.632 ± 0.175 , $P < 0.05$) en hipoxia.

Efectos de Forskolina en Hipoxia

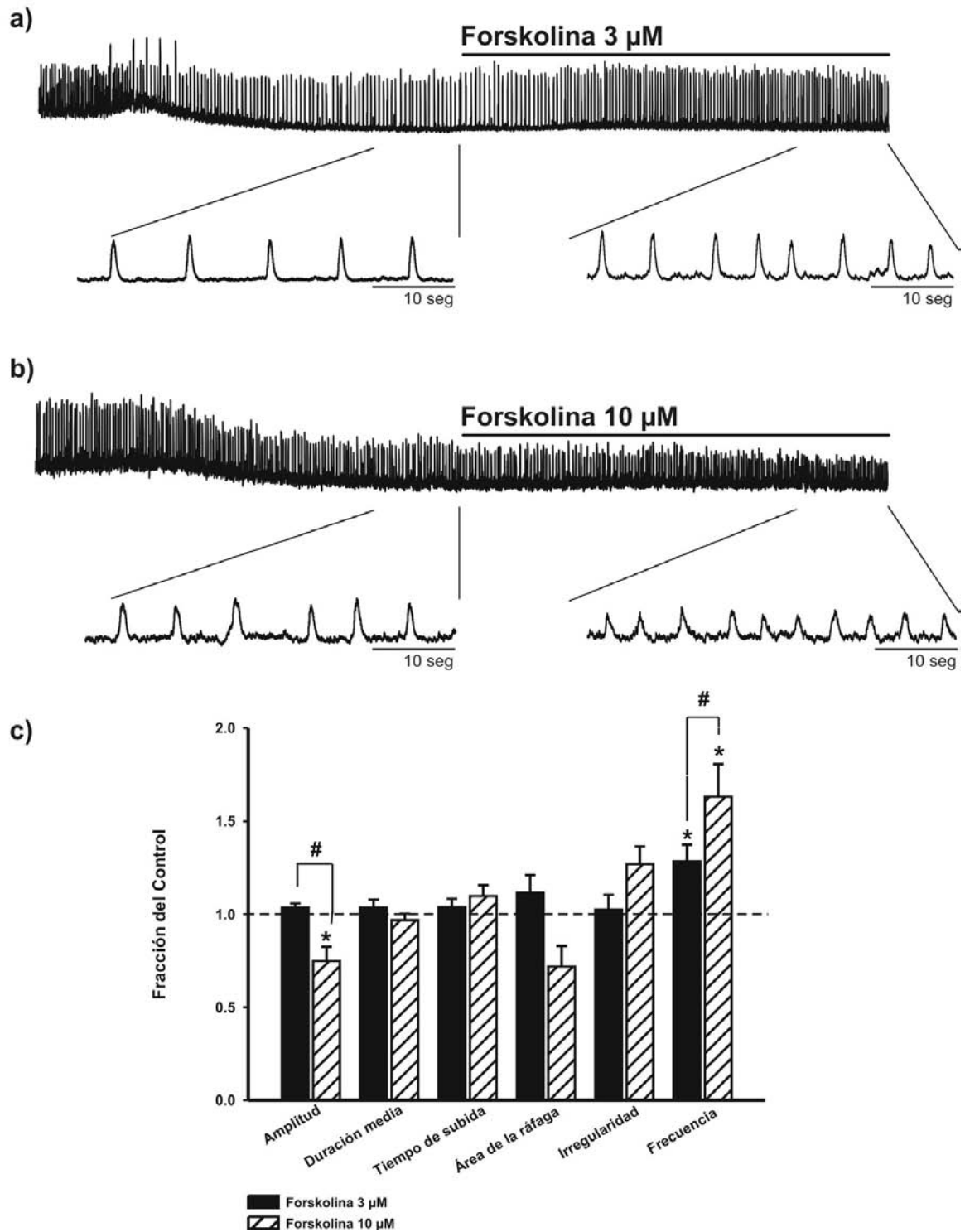


Figura 23. Efectos de Forskolina en Hipoxia. Comparación de los efectos de forskolina 3 y 10 μM en los distintos parámetros medidos (c). Se muestra un registro representativo de los efectos de forskolina 3 μM (a) y 10 μM (b) en hipoxia. Debajo de cada registro se comparan 50 seg. de ráfagas ampliadas (de los últimos 2 minutos) de los boqueos ficticios (control) contra los mismos pero en presencia de la forskolina, respectivamente. Los registros y las ráfagas se muestran a la misma escala con propósitos de comparación. * $P < 0.05$ comparado contra su propio control (línea punteada); # $P < 0.05$ comparado entre concentraciones.

15.2.3 Efectos de SKF-38393 en Hipoxia

Como se puede observar en la figura 24, únicamente encontramos un efecto estadísticamente significativo del SKF-38393 en la frecuencia del ritmo respiratorio en hipoxia.

Únicamente el SKF-38393 10 μM (1.293 ± 0.0902) ejerce un aumento estadísticamente significativo en la frecuencia del ritmo respiratorio en hipoxia comparado con su control (1.003 ± 0.0299 , $P < 0.05$). Además, al comparar las dos concentraciones, encontramos que el efecto del SKF-38393 10 μM (1.293 ± 0.0902) en hipoxia es significativamente diferente al del SKF-38393 4 μM (1.027 ± 0.0402 , $P < 0.05$) en hipoxia.

Efectos de SKF-38393 en Hipoxia

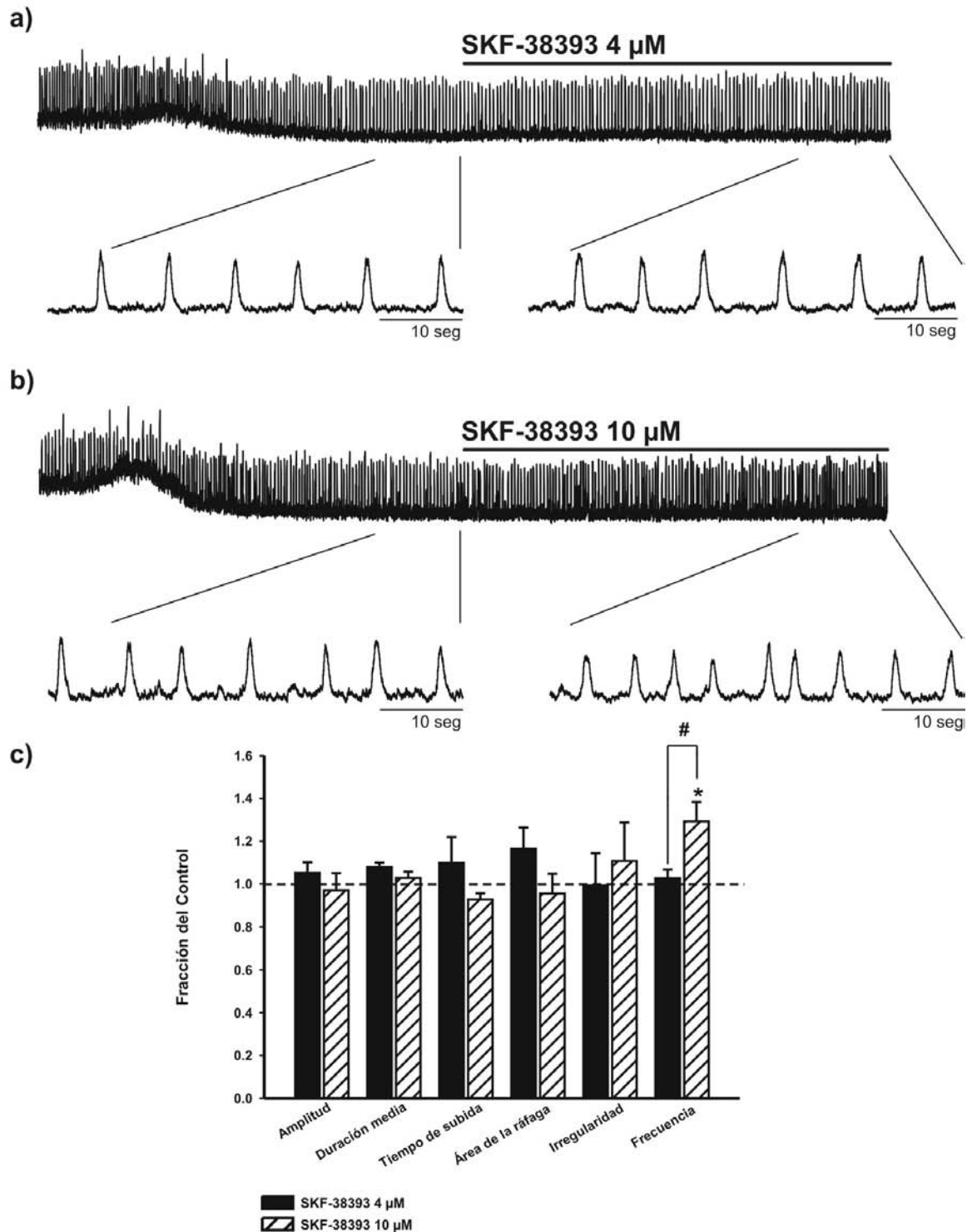


Figura 24. Efectos de SKF-38393 en Hipoxia. Comparación de los efectos de SKF-38393 4 y 10 μM en los distintos parámetros medidos (c). Se muestra un registro representativo de los efectos de SKF-38393 4 μM (a) y 10 μM (b) en hipoxia. Debajo de cada registro se comparan 50 seg. de ráfagas ampliadas (de los últimos 2 minutos) de los boqueos ficticios (control) contra los mismos pero en presencia del SKF-38393, respectivamente. Los registros y las ráfagas se muestran a la misma escala con propósitos de comparación. * $P < 0.05$ comparado contra su propio control (línea punteada); # $P < 0.05$ comparado entre concentraciones.

15.3 Diferencias de los Efectos de Naloxona, Forskolina y SKF-38393

Normoxia vs. Hipoxia

Se comparó la eupnea ficticia (normoxia) con los boqueos ficticios (hipoxia) en cada parámetro evaluado y en cada uno de los fármacos usados en sus dos concentraciones diferentes por separado.

15.3.1 Amplitud

Como se puede observar en la figura 25, cuando comparamos el efecto de los fármacos en la amplitud de la eupnea ficticia vs. la amplitud de los boqueos ficticios, observamos que únicamente existe una diferencia estadísticamente significativa en el caso de la forskolina.

La forskolina 3 μM ejerce una depresión estadísticamente significativa de la amplitud del ritmo respiratorio en normoxia (-0.0551 ± 0.0323), mientras que en hipoxia ejerce un aumento estadísticamente significativo (0.0203 ± 0.0153 , $P < 0.05$).

Sin embargo, aunque no fue estadísticamente significativo, podemos observar que en el caso de la naloxona 1 μM , la amplitud del ritmo respiratorio parece disminuir en normoxia (-0.0177 ± 0.0226) y aumentar en hipoxia (0.0407 ± 0.0497).

Diferencias de los efectos de Naloxona, Forskolina y SKF-38393 Normoxia vs. Hipoxia

Amplitud

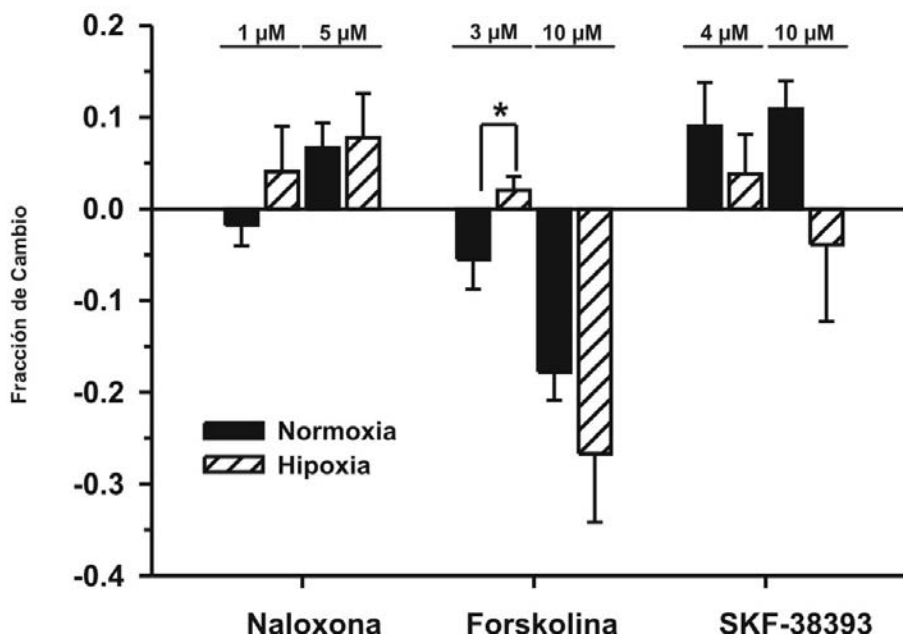


Figura 25. Efectos de Naloxona, Forskolina y SKF-38393 en Normoxia vs. Hipoxia. Comparación de los efectos de naloxona, forskolina y SKF-38393 en sus dos concentraciones diferentes en la amplitud de la eupnea ficticia y de los boqueos ficticios. * $P < 0.05$ comparado entre normoxia e hipoxia.

15.3.2 Duración Media

Como se puede observar en la figura 26, cuando comparamos el efecto de los fármacos en la duración media de la eupnea ficticia vs. la duración media de los boqueos ficticios, observamos que existe una diferencia estadísticamente significativa tanto en el caso de la naloxona como en el caso de la forskolina.

La naloxona 1 μM ejerce una depresión estadísticamente significativa de la duración media del ritmo respiratorio en normoxia (-0.0267 ± 0.0170), mientras que en hipoxia ejerce un aumento estadísticamente significativo (0.0588 ± 0.0204 , $P < 0.05$).

En el caso de la forskolina, se puede observar que, como en el caso de la naloxona, ésta a 3 μM ejerce una depresión estadísticamente significativa de la duración media del ritmo respiratorio en normoxia (-0.154 ± 0.0371), mientras que en hipoxia ejerce un aumento estadísticamente significativo (0.0497 ± 0.0450 , $P < 0.05$).

Sin embargo, aunque no fue estadísticamente significativo, podemos observar que en el caso de la naloxona 5 μM y del SKF-38393 4 μM , la duración media del ritmo respiratorio muestra una ligera tendencia a disminuir en normoxia y a aumentar en hipoxia.

La naloxona 5 μM muestra una ligera tendencia a disminuir la duración media del ritmo respiratorio en normoxia (-0.0373 ± 0.00994) y a aumentarla en hipoxia (0.00460 ± 0.0355). Del mismo modo, el SKF-38393 4 μM muestra una ligera tendencia a disminuir la duración media del ritmo respiratorio en normoxia (-0.0337 ± 0.0122) y a aumentarla en hipoxia (0.0842 ± 0.0224).

Diferencias de los efectos de Naloxona, Forskolina y SKF-38393 Normoxia vs. Hipoxia

Duración media

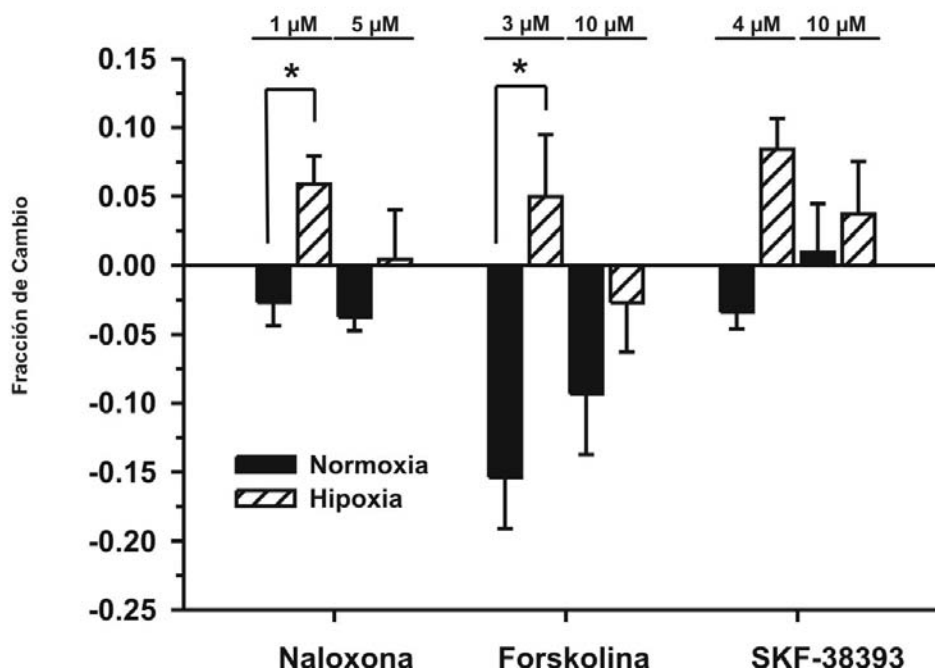


Figura 26. Efectos de Naloxona, Forskolina y SKF-38393 en Normoxia vs. Hipoxia. Comparación de los efectos de naloxona, forskolina y SKF-38393 en sus dos concentraciones diferentes en la duración media de la eupnea ficticia y de los boqueos ficticios. * $P < 0.05$ comparado entre normoxia e hipoxia.

15.3.3 Tiempo de Subida

Como se puede observar en la figura 27, cuando comparamos el efecto de los fármacos en el tiempo de subida de la eupnea ficticia vs. el tiempo de subida de los boqueos ficticios, observamos que únicamente existe una diferencia estadísticamente significativa en el caso de la forskolina.

La forskolina 3 μM ejerce una reducción estadísticamente significativa en el tiempo de subida del ritmo respiratorio en normoxia (-0.117 ± 0.0441), mientras que en hipoxia ejerce un aumento estadísticamente significativo (0.102 ± 0.0525 , $P < 0.05$). Lo que indica que, durante los boqueos, las ráfagas tienen una subida lenta.

Sin embargo, aunque no fue estadísticamente significativo, podemos observar que en el caso de la naloxona 1 μM y del SKF-38393 4 μM , el tiempo de subida del ritmo respiratorio muestra una ligera tendencia a disminuir en normoxia y a aumentar en hipoxia.

La naloxona 1 μM muestra una ligera tendencia a disminuir el tiempo de subida del ritmo respiratorio en normoxia (-0.0369 ± 0.0252) y a aumentarlo en hipoxia (0.00710 ± 0.0252). Del mismo modo, el SKF-38393 4 μM muestra una ligera tendencia a disminuir el tiempo de subida del ritmo respiratorio en normoxia (-0.0268 ± 0.0505) y a aumentarlo en hipoxia (0.127 ± 0.117).

Diferencias de los efectos de Naloxona, Forskolina y SKF-38393 Normoxia vs. Hipoxia

Tiempo de subida

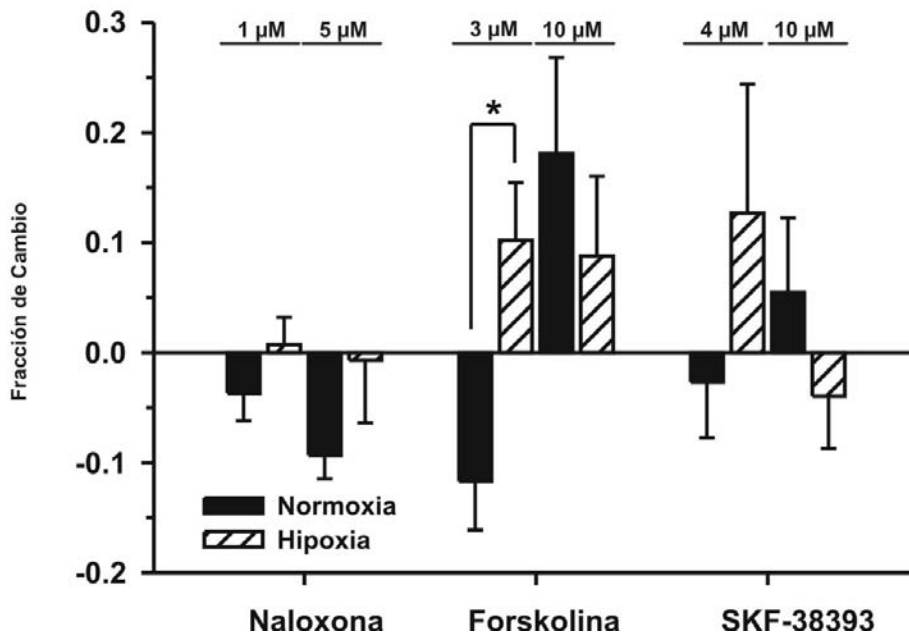


Figura 27. Efectos de Naloxona, Forskolina y SKF-38393 en Normoxia vs. Hipoxia. Comparación de los efectos de naloxona, forskolina y SKF-38393 en sus dos concentraciones diferentes en el tiempo de subida de la eupnea ficticia y de los boqueos ficticios. * $P < 0.05$ comparado entre normoxia e hipoxia.

15.3.4 Área de la Ráfaga

Como se puede observar en la figura 28, cuando comparamos el efecto de los fármacos en el área de la ráfaga de la eupnea ficticia vs. el área de la rafaga de los boqueos ficticios, observamos que únicamente existe una diferencia estadísticamente significativa en el caso de la forskolina.

La forskolina 3 μM ejerce una reducción estadísticamente significativa en el área de la ráfaga del ritmo respiratorio en normoxia (-0.259 ± 0.0449), mientras que en hipoxia ejerce un aumento estadísticamente significativo (0.109 ± 0.0852 , $P < 0.05$).

Sin embargo, aunque no fue estadísticamente significativo, podemos observar que en el caso de la naloxona 1 μM , el área de la ráfaga del ritmo respiratorio muestra una ligera tendencia a disminuir en normoxia (-0.0523 ± 0.0266) y a aumentar en hipoxia (0.109 ± 0.0833).

Diferencias de los efectos de Naloxona, Forskolina y SKF-38393 Normoxia vs. Hipoxia

Área de la ráfaga

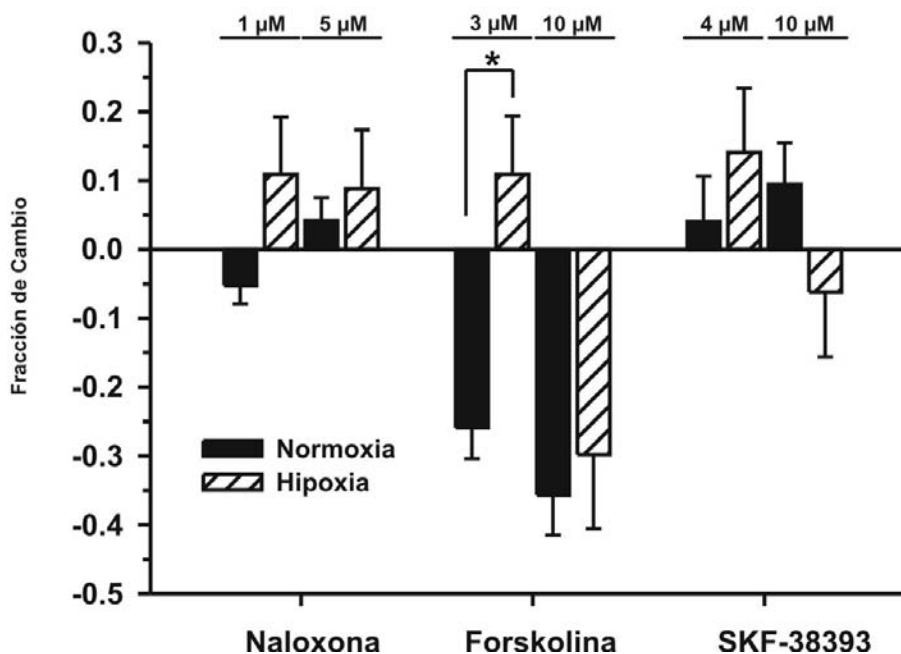


Figura 28. Efectos de Naloxona, Forskolina y SKF-38393 en Normoxia vs. Hipoxia. Comparación de los efectos de naloxona, forskolina y SKF-38393 en sus dos concentraciones diferentes en el área de la ráfaga de la eupnea ficticia y de los boqueos ficticios. * $P < 0.05$ comparado entre normoxia e hipoxia.

15.3.5 Irregularidad

Como se puede observar en la figura 29, cuando comparamos el efecto de los fármacos en la irregularidad de la eupnea ficticia vs. la irregularidad de los boqueos ficticios, observamos que únicamente existe una diferencia estadísticamente significativa en el caso del SKF-38393.

El SKF-38393 4 μM ejerce un aumento estadísticamente significativo en la irregularidad del ritmo respiratorio en normoxia (1.712 ± 0.586), mientras que en hipoxia ejerce una reducción estadísticamente significativa (0.0139 ± 0.146 , $P < 0.05$). Sin embargo, a diferencia del SKF-38393 4 μM, el SKF-38393 10 μM ejerce un

aumento estadísticamente significativo en la irregularidad del ritmo respiratorio tanto en normoxia (0.658 ± 0.213) como en hipoxia (0.114 ± 0.201 , $P < 0.05$).

Diferencias de los efectos de Naloxona, Forskolina y SKF-38393 Normoxia vs. Hipoxia

Irregularidad

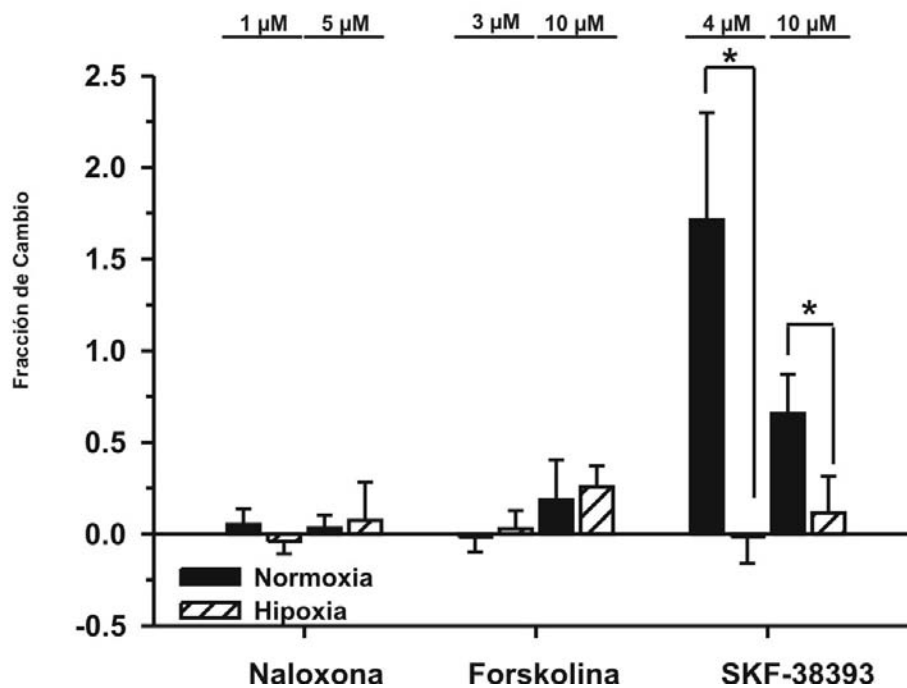


Figura 29. Efectos de Naloxona, Forskolina y SKF-38393 en Normoxia vs. Hipoxia. Comparación de los efectos de naloxona, forskolina y SKF-38393 en sus dos concentraciones diferentes en la irregularidad de la eupnea ficticia y de los boqueos ficticios. * $P < 0.05$ comparado entre normoxia e hipoxia.

15.3.6 Frecuencia

Como se puede observar en la figura 30, cuando comparamos el efecto de los fármacos en la frecuencia de la eupnea ficticia vs. la frecuencia de los boqueos ficticios, observamos que no existe ninguna diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los fármacos. Los tres fármacos, en sus dos concentraciones diferentes, e independientemente de si se encuentran en estado de normoxia o hipoxia, tienen un

comportamiento muy parecido: incrementar la frecuencia del ritmo respiratorio. Sin embargo, es muy notorio el hecho de que la forskolina tiene un efecto más marcado que la naloxona y/o el SKF-38393.

Diferencias de los efectos de Naloxona, Forskolina y SKF-38393 Normoxia vs. Hipoxia

Frecuencia

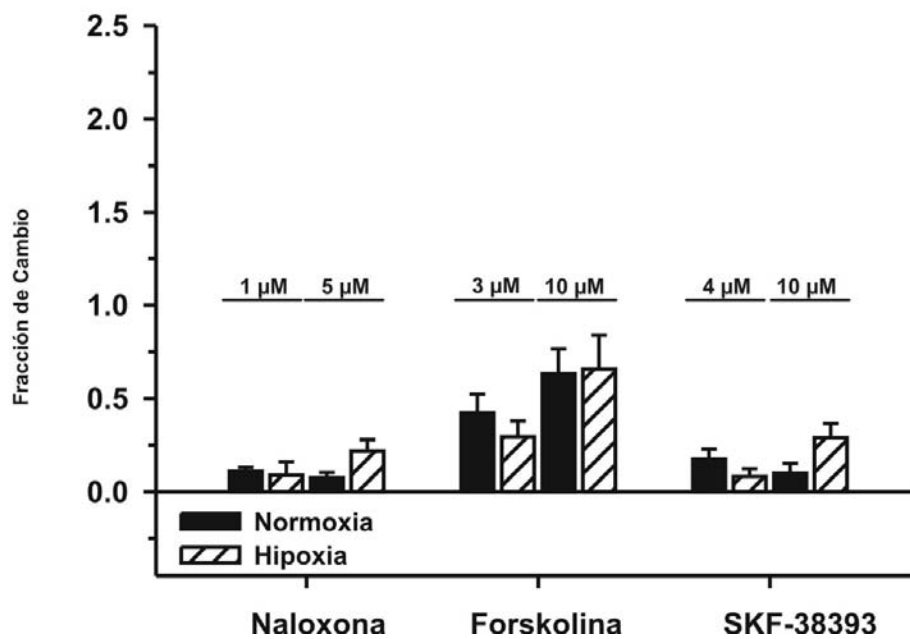




Figura 30. Efectos de Naloxona, Forskolina y SKF-38393 en Normoxia vs. Hipoxia. Comparación de los efectos de naloxona, forskolina y SKF-38393 en sus dos concentraciones diferentes en la frecuencia de la eupnea ficticia y de los boqueos ficticios. * $P < 0.05$ comparado entre normoxia e hipoxia.

Sintetizando, en la tabla 2 se muestran los resultados del Protocolo Experimental 1 (*Fármaco en Normoxia*); mientras que en la tabla 3 se muestran los resultados del Protocolo Experimental 2 (*Fármaco en Hipoxia*). Finalmente, en la tabla 4 se muestran los resultados de las diferencias de los efectos de los fármacos en normoxia e hipoxia.

		NORMOXIA					
		Naloxona		Forskolina		SKF-38393	
		1 μ M	5 μ M	3 μ M	10 μ M	4 μ M	10 μ M
Amplitud	Control	0.991 \pm 0.00728	0.997 \pm 0.00396	1.008 \pm 0.00900	0.997 \pm 0.00392	1.005 \pm 0.00549	0.996 \pm 0.00421
	Fármaco	0.974 \pm 0.0194	1.064 \pm 0.0248	0.953 \pm 0.0335	0.819 \pm 0.0307	1.095 \pm 0.0496	1.105 \pm 0.0316
Duración media	Control	1.001 \pm 0.0106	1.004 \pm 0.00630	1.011 \pm 0.00830	0.988 \pm 0.00739	1.002 \pm 0.0103	0.997 \pm 0.00825
	Fármaco	0.974 \pm 0.0131	0.966 \pm 0.00953	0.857 \pm 0.0404	0.895 \pm 0.0401	0.968 \pm 0.0200	1.007 \pm 0.0336
Tiempo de subida	Control	1.002 \pm 0.0184	1.016 \pm 0.0120	1.014 \pm 0.0158	1.011 \pm 0.0300	1.011 \pm 0.00800	1.016 \pm 0.0101
	Fármaco	0.965 \pm 0.0290	0.922 \pm 0.0262	0.897 \pm 0.0572	1.193 \pm 0.0836	0.984 \pm 0.0465	1.070 \pm 0.0658
Área de la ráfaga	Control	0.999 \pm 0.0154	0.994 \pm 0.00801	1.008 \pm 0.0125	1.013 \pm 0.0121	0.998 \pm 0.00508	0.994 \pm 0.00748
	Fármaco	0.946 \pm 0.0231	1.036 \pm 0.0326	0.749 \pm 0.0550	0.656 \pm 0.0543	1.038 \pm 0.0671	1.089 \pm 0.0592
Irregularidad	Control	0.988 \pm 0.0461	1.059 \pm 0.0403	0.954 \pm 0.0533	1.028 \pm 0.0227	0.913 \pm 0.0421	1.016 \pm 0.0239
	Fármaco	1.041 \pm 0.0486	1.091 \pm 0.0936	0.938 \pm 0.0508	1.217 \pm 0.230	2.625 \pm 0.598	1.674 \pm 0.211
Frecuencia	Control	0.988 \pm 0.0160	1.012 \pm 0.00558	1.022 \pm 0.0152	1.029 \pm 0.00781	1.007 \pm 0.0141	1.012 \pm 0.00856
	Fármaco	1.098 \pm 0.0211	1.087 \pm 0.0252	1.446 \pm 0.0990	1.661 \pm 0.134	1.183 \pm 0.0551	1.112 \pm 0.0483


Tabla 2. Efectos de Naloxona, Forskolina y SKF-38393 en Normoxia.


 $P < 0.05$ comparado contra su propio control.

 $P < 0.05$ comparado entre concentraciones.

		HIPOXIA					
		Naloxona		Forskolina		SKF-38393	
		1 μ M	5 μ M	3 μ M	10 μ M	4 μ M	10 μ M
Amplitud	Control	1.019 \pm 0.00718	1.015 \pm 0.00639	1.016 \pm 0.00979	1.015 \pm 0.00701	1.015 \pm 0.0106	1.009 \pm 0.00411
	Fármaco	1.060 \pm 0.0503	1.092 \pm 0.0507	1.037 \pm 0.0230	0.748 \pm 0.0765	1.053 \pm 0.0484	0.970 \pm 0.0805
Duración media	Control	0.994 \pm 0.00828	1.001 \pm 0.00356	0.987 \pm 0.00972	0.994 \pm 0.00565	0.994 \pm 0.00801	0.991 \pm 0.0131
	Fármaco	1.053 \pm 0.0278	1.005 \pm 0.0331	1.037 \pm 0.0434	0.967 \pm 0.0355	1.078 \pm 0.0216	1.028 \pm 0.0290
Tiempo de subida	Control	1.009 \pm 0.0167	0.980 \pm 0.0232	0.937 \pm 0.0155	1.011 \pm 0.0182	0.970 \pm 0.0177	0.968 \pm 0.0292
	Fármaco	1.016 \pm 0.0264	0.973 \pm 0.0502	1.039 \pm 0.0452	1.099 \pm 0.0575	1.098 \pm 0.121	0.928 \pm 0.0283
Área de la ráfaga	Control	1.021 \pm 0.0133	1.025 \pm 0.0152	1.007 \pm 0.0147	1.016 \pm 0.0116	1.023 \pm 0.0183	1.017 \pm 0.00513
	Fármaco	1.130 \pm 0.0938	1.113 \pm 0.0886	1.116 \pm 0.0954	0.718 \pm 0.111	1.165 \pm 0.0989	0.955 \pm 0.0925
Irregularidad	Control	1.000 \pm 0.0619	0.980 \pm 0.0531	0.996 \pm 0.0292	1.012 \pm 0.0344	1.006 \pm 0.0427	0.993 \pm 0.0341
	Fármaco	0.960 \pm 0.0429	1.055 \pm 0.203	1.024 \pm 0.0813	1.269 \pm 0.0969	0.992 \pm 0.152	1.107 \pm 0.181
Frecuencia	Control	0.987 \pm 0.0219	0.942 \pm 0.0109	0.990 \pm 0.0110	0.974 \pm 0.00854	0.944 \pm 0.0235	1.003 \pm 0.0299
	Fármaco	1.075 \pm 0.0891	1.161 \pm 0.0611	1.285 \pm 0.0894	1.632 \pm 0.175	1.027 \pm 0.0402	1.293 \pm 0.0902


Tabla 3. Efectos de Naloxona, Forskolina y SKF-38393 en Hipoxia.

 $P < 0.05$ comparado contra su propio control.

 $P < 0.05$ comparado entre concentraciones.

		NORMOXIA vs. HIPOXIA					
		Naloxona		Forskolina		SKF-38393	
		1 μM	5 μM	3 μM	10 μM	4 μM	10 μM
Amplitud	Normoxia	-0.0177 \pm 0.0226	0.0668 \pm 0.0271	-0.0551 \pm 0.0323	-0.178 \pm 0.0303	0.0905 \pm 0.0476	0.109 \pm 0.0305
	Hipoxia	0.0407 \pm 0.0497	0.0777 \pm 0.0483	0.0203 \pm 0.0153	-0.267 \pm 0.0745	0.0381 \pm 0.0432	-0.0388 \pm 0.0838
Duración media	Normoxia	-0.0267 \pm 0.0170	-0.0373 \pm 0.00994	-0.154 \pm 0.0371	-0.0931 \pm 0.0443	-0.0337 \pm 0.0122	0.00982 \pm 0.0349
	Hipoxia	0.0588 \pm 0.0204	0.00460 \pm 0.0355	0.0497 \pm 0.0450	-0.0270 \pm 0.0358	0.0842 \pm 0.0224	0.0371 \pm 0.0383
Tiempo de subida	Normoxia	-0.0369 \pm 0.0252	-0.0932 \pm 0.0215	-0.117 \pm 0.0441	0.181 \pm 0.0875	-0.0268 \pm 0.0505	0.0547 \pm 0.0679
	Hipoxia	0.00710 \pm 0.0252	-0.00682 \pm 0.0569	0.102 \pm 0.0525	0.0880 \pm 0.0725	0.127 \pm 0.117	-0.0395 \pm 0.0475
Área de la ráfaga	Normoxia	-0.0523 \pm 0.0266	0.0421 \pm 0.0328	-0.259 \pm 0.0449	-0.357 \pm 0.0581	0.0404 \pm 0.0660	0.0947 \pm 0.0601
	Hipoxia	0.109 \pm 0.0833	0.0883 \pm 0.0857	0.109 \pm 0.0852	-0.298 \pm 0.108	0.141 \pm 0.0935	-0.0619 \pm 0.0944
Irregularidad	Normoxia	0.0523 \pm 0.0851	0.0321 \pm 0.0714	-0.0154 \pm 0.0827	0.188 \pm 0.218	1.712 \pm 0.586	0.658 \pm 0.213
	Hipoxia	-0.0397 \pm 0.0690	0.0745 \pm 0.210	0.0288 \pm 0.0989	0.257 \pm 0.114	-0.0139 \pm 0.146	0.114 \pm 0.201
Frecuencia	Normoxia	0.109 \pm 0.0214	0.0752 \pm 0.0288	0.423 \pm 0.102	0.632 \pm 0.134	0.176 \pm 0.0526	0.0997 \pm 0.0529
	Hipoxia	0.0883 \pm 0.0731	0.219 \pm 0.0608	0.295 \pm 0.0845	0.658 \pm 0.181	0.0824 \pm 0.0420	0.290 \pm 0.0760

Tabla 4. Diferencias de los efectos de Naloxona, Forskolina y SKF-38393 en Normoxia e Hipoxia.

 $P < 0.05$ comparado entre condiciones (normoxia e hipoxia).

*¿Por qué esta magnífica tecnología científica, que ahorra trabajo y nos hace la vida más fácil, nos aporta tan poca felicidad?
La respuesta es, simplemente: porque aún no hemos aprendido a usarla con tino.*

Albert Einstein

16. Discusión

En este trabajo se estudió si la neuromodulación del circuito generador del ritmo respiratorio cambia de condiciones de normoxia (eupnea y suspiros) a condiciones de hipoxia (boqueos); lo cual se exploró a través de la aplicación de fármacos que incrementan la concentración de AMPc. La utilización de preparaciones de rebanada de tallo cerebral nos permitió examinar los efectos de la naloxona, la forskolina y el SKF-38393 en condiciones de normoxia; además, pudimos observar si dichos fármacos son o no capaces de revertir la depresión respiratoria producida por la hipoxia.

Efectos de Naloxona, Forskolina y/o SKF-38393 en Normoxia e Hipoxia

Efectos de Naloxona

Como se mencionó anteriormente, la naloxona es un antagonista no selectivo a los receptores de opioides, la cual ha sido ampliamente usada para discernir si los opioides endógenos afectan la respiración, ya sea tónicamente o bajo condiciones específicas donde se reta al sistema respiratorio (por ejemplo, hipoxia). La conclusión general de estos estudios es que la naloxona produce efectos variables en la respiración dependiendo de las especies y condiciones bajo las cuales se administra (Bianchi, A. L., Denavit-Saubié, M. y Champagnat, J., 1995). Por ejemplo: reduce la duración de episodios apneicos durante el sueño (Bianchi, A. L., Denavit-Saubié, M. y Champagnat,

J., 1995) e incrementa la respiración únicamente en ciertas condiciones de estrés, como anestesia, hipoxia e hipercapnia (Shook, J. E., Watkins, W. D. y Camporesi, E. M., 1990; Bianchi, A. L., Denavit-Saubié, M. y Champagnat, J., 1995; Greer, J. J., Carter, J. E. y al-Zubaidy, Z., 1995; Haji, A., Takeda, R. y Okazaki, M., 2000).

Nuestros resultados concuerdan con lo que otros autores han observado en sus respectivas investigaciones, en donde los efectos depresores de la respiración se revierten por la administración de naloxona. En general, la naloxona tendió a incrementar la amplitud (en normoxia) y la frecuencia (en normoxia e hipoxia) del ritmo respiratorio. Este aumento del patrón respiratorio mediado por naloxona se ve consistentemente en gatos, perros y conejos (Olson, E. B., 1987; Shook, J. E., Watkins, W. D. y Camporesi, E. M., 1990; Akiyama, Y. et al., 1993).

De manera interesante, observamos que los opioides deprimen la amplitud y la frecuencia del ritmo respiratorio en preparaciones *in vitro* debido a la activación de receptores a opioides μ en neuronas del CPB (Greer, J. J., Carter, J. E. y al-Zubaidy, Z., 1995; Gray, P. A. et al., 1999; Haji, A., Takeda, R. y Okazaki, M., 2000; Morin-Surun, M. P. et al., 2001; Tanabe, A., Fuji, T. y Onimaru, H., 2005).

Cuando comparamos los efectos de la naloxona en condiciones de normoxia vs. condiciones de hipoxia, observamos que, de manera general, la naloxona (1 μ M) en normoxia tiende a deprimir los distintos parámetros medidos, mientras que en hipoxia tiende a aumentarlos. Ejerciendo únicamente un efecto estadísticamente significativo en la duración media del ritmo respiratorio. Nuestros resultados demuestran que el efecto de la naloxona en el ritmo respiratorio cambia debido a la reconfiguración funcional del circuito, esto es, la eupnea y los suspiros son modulados de manera diferente que los boqueos.

Especulamos que, además de que los distintos ritmos respiratorios son modulados diferencialmente, los efectos contrastantes en normoxia e hipoxia pueden deberse a que como algunos autores señalan, la naloxona incrementa la respiración únicamente en ciertas condiciones de estrés, como la hipoxia (Shook, J. E., Watkins, W. D. y Camporesi, E. M., 1990; Bianchi, A. L., Denavit-Saubié, M. y Champagnat, J., 1995; Greer, J. J., Carter, J. E. y al-Zubaidy, Z., 1995; Haji, A., Takeda, R. y Okazaki, M., 2000). Lo cual puede explicar por qué observamos que una característica que define a los boqueos -su reducción en la duración media de la ráfaga respiratoria-, aumenta bajo el efecto de la naloxona 1 μ M. Además, se cree que la liberación de opioides puede contribuir a la depresión respiratoria durante la hipoxia (Shook, J. E., Watkins, W. D. y Camporesi, E. M., 1990; Ballanyi, K. et al., 1997), lo que puede explicar que el efecto antagonizante de la naloxona sea más marcado en la hipoxia.

Efectos de Forskolina

Nuestros resultados concuerdan con los resultados obtenidos por diversos autores en donde la forskolina refuerza el ritmo respiratorio en preparaciones *in vitro* (Arata, A., Onimaru, H. y Homma, I., 1993; Lalley, P. M. et al., 1997; Mironov, S. L., Langohr, K. y Richter, D. W., 1999; Takita, K. et al., 2000).

En general, la forskolina disminuyó la duración media y el área de la ráfaga (en normoxia) e incrementó la frecuencia (normoxia e hipoxia) del ritmo respiratorio. Sin embargo, la amplitud del ritmo respiratorio muestra una ligera tendencia a disminuir en normoxia, mientras que en hipoxia, aunque no es estadísticamente significativo, muestra una ligera tendencia a aumentar (forskolina 3 μ M). Además, el tiempo de subida del ritmo respiratorio en normoxia muestra una ligera tendencia a disminuir en forskolina 3 μ M, mientras que en forskolina 10 μ M muestra una ligera tendencia a aumentar. Esto es

interesante, ya que dos características que definen a los boqueos -su reducción en la duración media y en el tiempo de subida de la ráfaga respiratoria-, aumentan bajo el efecto de la forskolina 3 μ M.

Cuando comparamos los efectos de la forskolina en condiciones de normoxia vs. condiciones de hipoxia, observamos que, de manera general, la forskolina (3 μ M) en normoxia muestra una ligera tendencia a deprimir los distintos parámetros medidos, mientras que en hipoxia los aumenta. Sin ejercer un efecto estadísticamente significativo únicamente en la irregularidad y en la frecuencia del ritmo respiratorio, sin embargo, en el caso de la frecuencia del ritmo respiratorio, aunque no es estadísticamente significativo, es bastante notorio el hecho de que el aumento de la frecuencia del ritmo respiratorio es mucho mayor en el caso de la forskolina comparado con la naloxona y/o el SKF-38393. Lo cual especulamos que se debe a que, como mencionamos anteriormente, la forskolina no activa únicamente a la adenilato ciclasa (Xie, C. W. y Lewis, D. V., 1997), también interactúa con ciertos tipos de proteínas, incluyendo transportadores de glucosa y canales iónicos; tales interacciones dependen de diferentes patrones estructurales que aquellos observados para la activación de la actividad de la adenilato ciclasa (Insel, P. A. y Ostrom, R. S., 2003).

Nuestros resultados demuestran que el efecto de la forskolina en el ritmo respiratorio, al igual que el de la naloxona, cambia debido a la reconfiguración funcional del circuito, esto es, la eupnea y los suspiros son modulados de manera diferente que los boqueos.

Efectos de SKF-38393

Nuestros resultados concuerdan con lo que otros autores han observado en sus respectivas investigaciones, en donde la aplicación de agonistas a receptores

dopaminérgicos D₁ restauran la actividad respiratoria (Lalley, P. M., 2004). Sin embargo, a diferencia de nuestro estudio, en estos trabajos la depresión del ritmo respiratorio se ocasionó aplicando opioides. Por lo cual, nuestros experimentos indicarían que, cuando se deprime el ritmo respiratorio debido a la hipoxia, los agonistas D₁ tienen los mismos efectos que si la depresión respiratoria se hubiera ocasionado por la aplicación de opioides.

En general, el SKF-38393 incrementó la amplitud y la irregularidad (en normoxia) y la frecuencia (en hipoxia) del ritmo respiratorio. Sin embargo, este aumento en la amplitud del ritmo respiratorio puede ser más bien un aumento en la cantidad de suspiros (no cuantificados), como se puede observar en los registros representativos de la figura 21. Respecto a los suspiros, Lieske, S. P. y colaboradores (2000) comentan que es interesante que ciertas rebanadas no presenten suspiros. Una explicación posible es que es necesario cierto estado neuromodulador para su expresión, este estado dependería probablemente de si se preserva el NTS y/o núcleos del rañé en una rebanada transversal, lo cual puede variar con las técnicas de rebanado usadas en diferentes laboratorios o a la cepa de los ratones usados. La modulación de la frecuencia del ritmo respiratorio por SP sugiere que pequeñas variaciones en la concentración de neuromoduladores endógenos puede bastar para determinar la frecuencia con la cual una rebanada expresa suspiros (Lieske, S. P. et al., 2000). En nuestro caso, al igual que Lalley, P. M. (2005a,b), observamos que ambas concentraciones de SKF-38393 (4 y 10 μ M) tienen el mismo efecto en la amplitud del ritmo respiratorio; esto es, ambas concentraciones muestran una tendencia a aumentar la cantidad de suspiros, aunque parece ser más marcado en el caso de SKF-38393 4 μ M.

En el caso del incremento de la frecuencia respiratoria, nuestros resultados concuerdan con aquellos obtenidos por Lalley, P. M. (2005); en el cual la administración de DA 10 μ M resultó en un incremento de la tasa respiratoria.

Cuando comparamos los efectos del SKF-38393 en condiciones de normoxia vs. condiciones de hipoxia, observamos que, aunque no de manera general, el SKF-38393 (4 μ M) en normoxia muestra una tendencia a deprimir los distintos parámetros medidos, mientras que en hipoxia muestra una tendencia a aumentarlos. Ejerciendo únicamente un efecto estadísticamente significativo en la irregularidad del ritmo respiratorio; sin embargo, en este caso, la irregularidad del ritmo respiratorio muestra una tendencia a disminuir únicamente en hipoxia a la concentración 4 μ M. Esto es interesante, ya que dos características que definen a los boqueos -su reducción en la duración media y en el tiempo de subida de la ráfaga respiratoria-, muestran una tendencia a aumentar bajo el efecto del SKF-38393 4 μ M.

Nuestros resultados demuestran que el efecto del SKF-38393 en el ritmo respiratorio, al igual que el de la naloxona y el de la forskolina, cambia debido a la reconfiguración funcional del circuito, esto es, la eupnea y los suspiros son modulados de manera diferente que los boqueos.

Especulamos que, además de que los distintos ritmos respiratorios son modulados diferencialmente, los efectos contrastantes en normoxia e hipoxia pueden deberse a que más de un subtipo de receptores dopaminérgicos modula la actividad de la red respiratoria. Como consecuencia, otros subtipos de receptores dopaminérgicos (como el D₅) continúan organizando una variedad de efectos vinculados a la liberación de DA endógena en el ritmo respiratorio y en su excitabilidad y, por lo tanto, la respuesta general de la red respiratoria está determinada fuertemente por sus concentraciones.

Finalmente, como el circuito se reconfigura y, por lo mismo, “es otro”, la acción de los neuromoduladores cambia. Esto quiere decir que hay una distribución heterogénea de los receptores y sus sistemas de transducción en las neuronas del CPB. Y por lo tanto nos permitiría abordar diversos trastornos de la respiración.

Resultados Contrastantes

Como pudimos observar en nuestro estudio, la elevación de AMPc por naloxona, forskolina y/o SKF-38393 tuvo efectos opuestos tanto en las distintas concentraciones como en las distintas condiciones experimentales. Especulamos que estas diferencias pueden deberse a que el efecto de estos fármacos puede ser directo (como la forskolina) o indirecto (como la naloxona y/o el SKF-38393); o que subgrupos de neuronas respiratorias poseen sensibilidad diferencial a dichos fármacos.

Además, se puede argumentar que estos resultados contrastantes entre concentraciones y/o condiciones experimentales (normoxia e hipoxia) en la respiración, son altamente dependientes de las especificidades de la preparación: estado metabólico y/o del procedimiento de la preparación, especies y la edad de los animales usados, anestesia y/o decerebración, temperatura, falta de retroalimentación aferente, etc.; ya que diferentes condiciones experimentales causan variación de los efectos de agonistas y antagonistas (Haji, A., Takeda, R. y Okazaki, M., 2000).

Sin embargo, a pesar de estos efectos contrastantes, se encontró que todas las concentraciones de los fármacos que incrementan el AMPc, como la naloxona, la forskolina y el SKF-38393 tuvieron un efecto en el ritmo respiratorio, tanto en

normoxia como en hipoxia, lo que coincide con lo observado por Mironov, S. L., Langohr, K. y Richter, D. W. (1999).

Otro efecto bastante interesante -producido por el SKF-38393- fue el aumento en la cantidad de suspiros; irónicamente, este aumento en la cantidad de suspiros no se vio reflejado en un aumento en la frecuencia respiratoria. Esto es muy interesante, ya que se sabe que en infantes que mueren del SIDS existe un decremento significativo en el número de suspiros (Lieske, S. P. et al., 2000). Sin embargo, además de aumentar la cantidad de suspiros, el SKF-38393 aumenta la irregularidad del ritmo respiratorio, es decir, aunque continúa disparando ráfagas respiratorias, éstas suelen encontrarse muy alejadas o muy cercanas unas de otras. Por lo tanto, las actividades de proteínas cinasas dependientes de AMPc parecen mantenerse a alto nivel en neuronas del CPB durante el funcionamiento normal de la red respiratoria, posiblemente por entradas convergentes de neuromoduladores excitadores; lo que explicaría el aumento en la irregularidad del ritmo respiratorio.

Un efecto claro y de suma importancia en nuestro estudio fue que aunque tanto la naloxona, como la forskolina y/o el SKF-38393 ejercen un aumento en la frecuencia respiratoria, este aumento fue más marcado en el caso de la forskolina y fue consistente en condiciones hipóxicas, esto es, el aumento en la frecuencia respiratoria fue estadísticamente significativo en todos los casos -únicamente en condiciones de hipoxia-, lo cual indica que hay una mayor generación de boqueos. Sin embargo, no pudimos discernir si el aumento de la frecuencia respiratoria se debió directamente a las acciones de receptores neuronales localizados en el CPB o indirectamente debido a las acciones de receptores neuronales de centros distantes que convergen en esta región para modular el ritmo respiratorio.

Nuestros resultados se enmarcan en la teoría de la reconfiguración funcional del circuito respiratorio en hipoxia. Si bien algunas de las neuronas que participan en la generación de la eupnea también participan en la generación de los boqueos, hay un cambio en el número y el tipo de neuronas que se involucran en la generación de los boqueos. En este trabajo demostramos que la neuromodulación del circuito respiratorio es diferente en el circuito “normal” –en normoxia- y el circuito “reconfigurado” –en hipoxia-; lo cual demostramos a través de la aplicación de fármacos que incrementan la concentración de AMPc, como la naloxona, la forskolina y el SKF-38393. Lo cual quiere decir que a pesar de que las neuronas que participan en la hipoxia también lo hacen en la normoxia, el caso opuesto no es cierto. Esto lleva a que la sensibilidad farmacológica del circuito “reconfigurado” sea determinada por una subpoblación de neuronas del CPB.

Sin embargo, existía la posibilidad de que la neuromodulación del circuito respiratorio en normoxia e hipoxia fuera exactamente igual. Si éste hubiera sido el caso, hubiéramos planteado dos opciones: 1) El circuito respiratorio no se reconfigura en hipoxia o, 2) Todas las neuronas del CPB son moduladas de manera idéntica. Nuestros resultados, así como los de otros estudios, demuestran que éste no es el caso. Por ejemplo, se ha visto que el bloqueo de la corriente persistente de sodio con riluzole o el bloqueo de receptores a serotonina 5-HT_{2A} con piperidina o ketanserina, abolen el ritmo respiratorio en hipoxia pero no bloquean el ritmo respiratorio en normoxia (Peña, F. y Ramirez, J. M., 2002; Peña, F. et al., 2004).

Resumiendo, nuestros experimentos tienen importantes implicaciones ya que sugieren que la red respiratoria es particularmente rica con posibilidades de modulación, lo cual es esencial para ajustar la respiración en una manera dependiente de estado para los continuos requerimientos en un organismo conductual. Como mencionamos

anteriormente, las demandas del control respiratorio son diferentes durante condiciones normóxicas e hipóxicas. En condiciones de normoxia el énfasis es en el uso de energía y, en condiciones de hipoxia, es en la autorresucitación y en la reoxigenación a cualquier costo. Por lo tanto, esta aproximación debería llevar a un entendimiento del control central de la respiración bajo condiciones normales e hipóxicas y, como consecuencia, de los trastornos respiratorios en humanos (específicamente en infantes).

Aunque la respiración es literalmente de vital interés para la fisiología humana y la medicina clínica, únicamente se han hecho intentos superficiales en entenderla.

La respiración puede considerarse como una variable independiente que afecta la emoción, la cognición y la conducta; así como una variable dependiente que refleja cambios en la emoción, la cognición y la conducta (Ley, R., 1994). Esta interacción bidireccional es básica para una apreciación de la importancia de la respiración en términos de su relevancia en la investigación y su aplicación.

Recientemente se demostró *in vitro*, que en condiciones normales de oxigenación, el circuito generador del ritmo respiratorio, el CPB, produce dos ritmos respiratorios que corresponden a la respiración “normal” (llamada eupnea) y a los suspiros. Además, se encontró que el mismo circuito se reconfigura y es capaz de generar, en condiciones de hipoxia prolongada, un tercer ritmo respiratorio que corresponde a los boqueos (Lieske, S. P. et al., 2000).

Aunque los cambios inducidos por la hipoxia se han estudiado en muchas neuronas y redes neuronales, no hay muchas redes neuronales en las cuales es posible relacionar cambios hipóxicos a nivel celular con cambios al nivel de la red funcional. La respuesta del sistema respiratorio de los mamíferos a la hipoxia es una excepción, ya

que su respuesta se puede estudiar en preparaciones *in vivo* e *in vitro*. Sin embargo, para entender como la hipoxia altera la red respiratoria, es crítico describir la función de la red bajo condiciones control.

Ya que los organismos tienen un número finito de circuitos neuronales, las neuronas y las redes deben ser multifuncionales. La neuromodulación proporciona un medio poderoso para reconfigurar dramática, pero reversiblemente, la función de un circuito (Birmingham, J. T. y Tauck, D. L., 2003). Un efecto neuromodulatorio típicamente comienza con la unión de un péptido u otra molécula pequeña a un receptor metabotrópico. Esto dispara una cascada de reacciones bioquímicas que finalmente cambia la fisiología de la célula y puede provocar efectos mucho más complejos que la simple excitación o inhibición de la neurotransmisión clásica. Esto puede incluir modificación de la resistencia membranal de una neurona, de las propiedades o tasas de disparo, de las dinámicas de adaptación, de la fuerza de su salida sináptica o incluso de la forma del potencial de acción (Bianchi, A. L., Denavit-Saubié, M. y Champagnat, J., 1995).

Potenciales Aplicaciones Terapéuticas

Los boqueos también son conocidos como respiración agonal y el nombre es apropiado porque los boqueos son el último patrón respiratorio previo a la apnea. Los boqueos restauran el ritmo respiratorio normal de un bebé y también alertan al bebé y a la madre de que algo está mal, esto es, sólo se cuenta con los boqueos como la única oportunidad para resucitar; por lo que surge una preocupación de que el infante está sufriendo y en agonía.

Cualquier muerte súbita inesperada desequilibra el sentido de normalidad y seguridad para la familia de la víctima. Simplemente, no se supone que los bebés deben morir. Debido a que el fallecimiento de un infante es una interrupción de orden natural, es especialmente traumático para los padres, otros miembros de la familia y amigos. Muchos padres reportan que ver a sus hijos boquear al final de su vida es una de las peores experiencias y pueden describir gráficamente el horror que sintieron cuando sus hijos parecían luchar para respirar al final de su vida (Perkin, R. M. y Resnik, D. B., 2002).

Como cualquier muerte súbita, una muerte por el SIDS deja a la familia con un sentimiento de shock y pérdida y una necesidad urgente de entender lo que pasó. La falta de una causa perceptible, la muerte inesperada, y la posible implicación de autoridades legales hace que la muerte por el SIDS sea incluso más difícil.

Finalmente, una muerte por el SIDS también deja a la familia con una necesidad de entender que no puede ser prevenida, lo cual puede proporcionar algo de consuelo a la afligida familia. Por lo tanto, los boqueos al final de la vida deberían ser tratados.

Debido a la importancia del sistema respiratorio para la supervivencia de cualquier mamífero, el progreso en este campo de investigación no sólo tiene implicaciones científicas importantes, sino también implicaciones clínicas (por ejemplo, entender las causas que subyacen al SIDS).

Desde el punto de vista clínico, nuestros resultados sugieren una posible estrategia terapéutica para la protección de la actividad respiratoria rítmica en la hipoxia. Encontramos que la aplicación de fármacos que elevan la concentración de AMPc, como la naloxona, la forskolina y el SKF-38393, pueden ser un posible blanco

terapéutico ya que fomentan la generación de boqueos y evitan la aparición de la apnea hipóxica y, por lo tanto, permitirían la prevención del SIDS.

17. Conclusiones

1. Nuestros resultados apoyan la teoría de la reconfiguración funcional del circuito respiratorio en hipoxia; ya que demostramos, a través de la aplicación de distintos neuromoduladores que incrementan la concentración de AMPc, como la naloxona, la forskolina y el SKF-38393, que la neuromodulación del circuito respiratorio es diferente en el circuito "normal" –en normoxia- y el circuito "reconfigurado" –en hipoxia-.
2. Además, nuestros resultados tienen importancia terapéutica para su posible aplicación en el tratamiento de trastornos patológicos de la respiración, específicamente el SIDS, ya que sugieren que aproximaciones farmacológicas que apuntan a incrementar el nivel de AMPc pueden ser un antídoto efectivo de amplio espectro en contra de la depresión respiratoria inducida por hipoxia. Sin embargo, si bien aumentan la frecuencia de los boqueos (algo deseable), esto es a expensas de aumentar la irregularidad del ritmo respiratorio en normoxia (algo no deseable), en el caso específico del SKF-38393.
3. Se debe tener cuidado cuando se extrapolan los hallazgos *in vitro* a situaciones *in vivo*, ya que aún no queda claro si los principios de la ritmogénesis respiratoria que han sido demostrados *in vitro* son aplicables a animales intactos.
4. La investigación básica sobre la ritmogénesis respiratoria es de suma importancia en la identificación de factores de riesgo biológicos para el SIDS y su prevención.

Apéndice I

Modelos Experimentales para estudiar el Control Neuronal de la Respiración

Actualmente existen diversos modelos animales para estudiar la generación del ritmo respiratorio, que pueden dividirse de manera general en modelos *in vivo* e *in vitro*. Ambos modelos son favorecidos por diferentes razones y tienen sus propias limitantes.

Modelos *in vivo* vs. *in vitro*

Aunque un modelo neuronal simple sea capaz de generar ráfagas de manera rítmica cuando es aislado de sus vías sinápticas aferentes, el comportamiento rítmico que exhibe puede ser muy diferente al observado en el mismo modelo en el animal intacto (Bianchi, A. L., Denavit-Saubié, M. y Champagnat, J., 1995). Tanto los modelos *in vivo* como los *in vitro* tienen esta desventaja, pues en los primeros es necesario anestesiarse al animal y seccionar ciertos tejidos para acceder al sitio de interés y, en los segundos, las redes neuronales a estudiar suelen estar tan aisladas que rara vez reciben los estímulos que recibirían en el animal intacto. Aún así, los experimentos *in vivo* nos han permitido conocer la respiración a fondo, si bien no en un plano celular o molecular; mientras que otros problemas, como revelar las propiedades intrínsecas de las membranas neuronales, han sido resueltos gracias a modelos *in vitro*.

Modelos *in vivo*

Los experimentos pioneros que apuntaron a estudiar el control neuronal de la respiración fueron realizados en modelos *in vivo*. Estos estudios usaron gatos y ratas

como modelos de animales, y establecieron la identidad de los sustratos neuronales del control de la respiración, con lo que ayudaron a identificar las estructuras esenciales para la generación de la respiración y sus interacciones con influencias centrales y periféricas (Richter, D. W., Heyde, F. y Gabriel, M., 1975; Hilaire, G. y Monteau, R., 1976; Denavit-Saubié, M., Champagnat, J. y Zieglgänsberger, W., 1978; Bianchi, A. L., Denavit-Saubié, M. y Champagnat, J., 1995; Richter, D. W. y Spyer, K. M., 2001). Comúnmente, estos experimentos implican el registro de la actividad de uno o varios de los núcleos que corresponden a los nervios que enervan los músculos de las vías respiratorias superiores en animales apropiadamente anestesiados, cuyo cerebelo y tallo cerebral son expuestos quirúrgicamente (Ballanyi, K., Onimaru, H. y Homma, I., 1999). La ventaja obvia de una aproximación *in vivo* es que el estudio neuronal de la generación y del control de la respiración se ejecuta bajo la influencia más o menos intacta de la información aferente que viene de la periferia y del resto del cerebro, la cual es eliminada en preparaciones más reducidas (Richter, D. W. y Spyer, K. M., 2001). Sin embargo, los estudios *in vivo* fracasan en describir la fisiología “real” de la red respiratoria, debido a que el patrón de descarga de los músculos respiratorios y de las neuronas respiratorias centrales (motoneuronas e interneuronas) están afectadas por muchos factores otros que la respiración bajo condiciones *in vivo*. Por lo tanto, es difícil interpretar los cambios respiratorios inducidos experimentalmente estimulando estructuras centrales o ejecutando lesiones y/o aplicando fármacos a estas estructuras (Richter, D. W. y Spyer, K. M., 2001). También es difícil determinar si las estructuras en cuestión realmente pertenecen a la red respiratoria o a los centros no respiratorios que interactúan con la respiración. Otra clara desventaja de los experimentos *in vivo* es la necesidad ética y práctica de anestésiar al animal utilizado. La anestesia, siendo una sustancia ajena al cuerpo del individuo, afecta irremediabilmente las condiciones

experimentales. Los barbitúricos, por ejemplo, son potentes inhibidores de los procesos sinápticos y deprimen ciertos canales iónicos, lo que puede tener efectos directos sobre el experimento realizado (Richter, D. W. y Spyer, K. M., 2001). Además, en la mayoría de los casos, la aplicación de fármacos no está controlada y los experimentos se contaminan con la presencia de anestésicos (Richter, D. W., Heyde, F. y Gabriel, M., 1975; Denavit-Saubié, M., Champagnat, J. y Zieglgänsberger, W., 1978; Lalley, P. M., 1986). Finalmente, cuando se trata de entender los mecanismos celulares implicados en este proceso, la aproximación *in vivo* tiene la desventaja de que algunos registros unicelulares, particularmente registros de patch-clamp, no pueden ser ejecutados bajo condiciones muy controladas (Richter, D. W. y Spyer, K. M., 2001).

Modelos *in vitro*

Con el fin de superar estos problemas, se han desarrollado preparaciones más reducidas para estudiar el control de la respiración y la generación del ritmo respiratorio. La alternativa al modelo *in vivo*, los modelos *in vitro*, pueden dividirse en dos partes: el modelo de preparación en bloque (Suzue, T., 1984) y el modelo de rebanada de tallo cerebral (Smith, J. C. et al., 1991).

Los modelos *in vitro* ofrecen ventajas únicas, como la posibilidad de modificar el medio extracelular, registrar la actividad neuronal en condiciones más favorables y estimular o destruir parte de la red neuronal sin inducir cambios mediados por respuestas de retroalimentación periférica (Hilaire, G. y Pásaro, R., 2003). Además, el uso de preparaciones *in vitro* ha permitido la aplicación de aproximaciones farmacológicas, electrofisiológicas y de imagenología más sofisticadas, bajo condiciones más controladas, suministrando un entendimiento más profundo de la

generación, localización y el control del circuito generador del ritmo respiratorio (Smith, J. C. et al., 1991; Koshiya, N. y Smith, J. C., 1999; Lieske, S. P. et al., 2000; McCrimmon, D. R. et al., 2000; Del Negro, C. A., Morgado-Valle, C. y Feldman, J. L., 2002; Onimaru, H. y Homma, I., 2003; Peña, F. et al., 2004).

Preparación en bloque (“en bloc”)

En un estudio en 1984, Suzue, T. describió una preparación para el estudio de la actividad respiratoria. Esta preparación era de tallo cerebral-médula espinal (preparación en bloque) de rata neonata, la cual consiste en la extracción del tallo cerebral completo junto con el segmento cervical de la médula espinal. Suzue, T. (1984) estableció que, en ratas neonatas, la red respiratoria aislada produce continuamente disparos rítmicos de potenciales en el nervio frénico *in vitro*. En ese entonces, muy pocos científicos estaban convencidos de que estas preparaciones *in vitro* eran realmente adecuadas para ejecutar estudios de la red respiratoria. Ahora, sin embargo, los estudios se ejecutan ampliamente usando el modelo de Suzue, T. (1984) (Onimaru, H. y Homma, I., 2003) y otros modelos *in vitro* de este tipo, como rebanadas de tallo cerebral (Smith, J. C. et al., 1991), e incluso partes restringidas aisladas de rebanadas de tallo cerebral en las cuales las partes más indispensables de la red se conservan (Johnson, S. M., Koshiya, N. y Smith, J. C., 2001).

La Rebanada de Tallo Cerebral

Este modelo se desarrolló en 1991 por Smith, J. C. y colaboradores a partir del modelo de Suzue, T. (1984). En dicho estudio, el seccionamiento secuencial de la rebanada de tallo cerebral reveló que el CPB era necesario y suficiente para la generación del ritmo respiratorio ficticio, ya que la preparación aislada de rebanada de

tallo cerebral (transversal, coronal o sagital) conteniendo al CPB generaba continuamente el ritmo respiratorio (Smith, J. C. et al., 1991; Richter, D. W. y Spyer, K. M., 2001). Tomando esta aproximación a un extremo, Johnson, S. M., Koshiya, N. y Smith, J. C. (2001) demostraron que una “isla” obtenida al cortar y sacar el CPB de una rebanada de tallo cerebral aún es capaz de producir el ritmo respiratorio ficticio con diferencias sutiles de aquellas registradas con la rebanada intacta. Este hallazgo verificó la noción de que el CPB juega un papel prominente en la generación del ritmo respiratorio (Onimaru, H., Arata, A. y Homma, I., 1988; Smith, J. C. et al., 1991; Rekling, J. C. y Feldman, J. L., 1998; Johnson, S. M., Koshiya, N. y Smith, J. C., 2001; Onimaru, H. y Homma, I., 2003; Peña, F. et al., 2004; Janczewski, W. A. y Feldman, J. L., 2006).

Además, la rebanada de tallo cerebral ha permitido el estudio de la generación del ritmo respiratorio normal ficticio (“actividad eupneica”) pero también de otros ritmos respiratorios ficticios, desde que una caracterización muy cuidadosa ha mostrado que el CPB es capaz de generar no solamente ritmos respiratorios normales ficticios (eupnea) sino también suspiros ficticios e incluso boqueos ficticios. Este último ritmo ficticio aparece cuando la red respiratoria es retada con condiciones hipóxicas (Lieske, S. P. et al., 2000; Lieske, S. P., Thoby-Brisson, M. y Ramirez, J. M., 2001).

Este método, sin embargo, tiene una desventaja inherente, en el sentido de que, como una preparación *in vitro*, las preparaciones de rebanada de tallo cerebral deben hacerse lo suficientemente delgadas para permitir el suministro de O₂ suficiente a los tejidos (Suzue, T., 1984), además de que no se pueden obtener de animales más grandes de tres semanas (Ballanyi, K., Onimaru, H. y Homma, I., 1999; Del Negro, C. A., Morgado-Valle, C. y Feldman, J. L., 2002; Onimaru, H. y Homma, I., 2003; Peña, F. et al., 2004). Adicionalmente, suele estudiarse a bajas temperaturas (28-30°C) para

incrementar su viabilidad, lo cual reduce la actividad sináptica y la frecuencia respiratoria (Richter, D. W. y Spyer, K. M., 2001). Finalmente, con el fin de registrar un nivel suficiente de actividad rítmica robusta y duradera (horas) de rebanadas de tallo cerebral (como en preparaciones en bloque), a menudo (en un 80% de los casos) es necesario elevar la concentración extracelular de potasio (K^+) con la finalidad de despolarizar a las neuronas y/o superar la pérdida de aferencias causada por el proceso de crear la preparación *in vitro* (Tryba, A. K., Peña, F. y Ramirez, J. M., 2003).

Preparación *in situ*

Finalmente, el interés más importante originado del uso de preparaciones *in vitro* es la irrigación anormal del tejido, lo cual significaría que las demandas metabólicas del tejido (por ejemplo, nutrientes y O_2) no satisfacen a todas las neuronas bajo estas condiciones (Richter, D. W. y Spyer, K. M., 2001; Tryba, A. K., Peña, F. y Ramirez, J. M., 2003). Por esta razón, se ha desarrollado una transición entre las aproximaciones *in vitro* e *in vivo*. La llamada preparación *in situ* consiste de una preparación perfundida de tallo cerebral adherida a la caja torácica. Esta preparación tiene la ventaja de que el tejido está bien irrigado (Richerson, G. B. y Getting, P. A., 1987, 1990; Paton, J. F., 1996; Paton, J. F. y St-John, W. M., 2005) y las condiciones experimentales permiten el uso de técnicas de patch clamp (Tryba, A. K., Peña, F. y Ramirez, J. M., 2003). Sin embargo, la perfusión requerida para esta preparación puede comprometer la integridad de elementos como la barrera hematoencefálica, ya que se ha mostrado que agentes que normalmente serían incapaces de cruzar esta barrera afectan la ritmicidad central generada en esta preparación (Rodman, J. R. et al., 2006).

La complejidad general del acto de respirar puede de hecho explicar por qué los resultados de estudios *in vivo* no han bastado para explicar la generación del ritmo respiratorio (Hilaire, G. y Pásaro, R., 2003). La preparación de rebanada de tallo cerebral abrió nuevas posibilidades para estudiar la generación y el control de la respiración. Por lo tanto, el entendimiento de los mecanismos que subyacen a la generación del ritmo respiratorio en la rebanada de tallo cerebral servirá como la base para revelar los mecanismos en preparaciones más intactas incluyendo condiciones *in vivo* (Feldman, J. L. y Del Negro, C. A., 2006). Así, podemos concluir que, ya que permiten la aplicación de un amplio rango de técnicas, las preparaciones de rebanada de tallo cerebral son herramientas experimentales útiles para investigaciones fisiológicas, farmacológicas y bioquímicas del SNC de los mamíferos.

Apéndice II

Trastornos Respiratorios asociados con el Sistema Nervioso Central

Las patologías pulmonares y cardíacas son las principales causas de los trastornos respiratorios, pero las disfunciones relacionadas al control neuronal de la respiración también tienen un efecto significativo en la salud pública, ya que cobran miles de vidas al año (Weese-Mayer, D. E. et al., 2003).

Apnea del Sueño

La apnea se define como el cese de la respiración, y la apnea del sueño [SA, por sus siglas en inglés (Sleep Apnea)], como la interrupción de la respiración por al menos 10 segundos y al menos 5 veces por hora durante el sueño (Hui, D. S. et al., 2000). La SA es el trastorno de sueño respiratorio más importante y se ve agravado por fumar, beber alcohol, tener sobrepeso o vivir en altitudes mayores. Esta enfermedad puede complicarse con la presión sanguínea alta y otras enfermedades cardiovasculares, problemas de memoria, ganancia de peso, impotencia, dolores de cabeza y puede ser responsable de deterioro en el trabajo y accidentes vehiculares (De Backer, W. A., 1995; Hui, D. S. et al., 2000). La SA se ha clasificado como se indica a continuación:

Apnea del Sueño Obstructiva (OSA)

La apnea del sueño obstructiva [OSA, por sus siglas en inglés (Obstructive Sleep Apnea)], la más común de las apneas, es causada por el bloqueo del flujo de aire, usualmente cuando el tejido blando en el fondo de la garganta se colapsa y se cierra durante el sueño o por un exceso de tejido adiposo superficial en el cuello que ejerce presión sobre las vías aéreas cuando el paciente se encuentra recostado (Loube, D.,

2001). La OSA se caracteriza por obstrucciones episódicas de las vías aéreas superiores durante el sueño, a menudo ocurriendo más de 60 veces por hora. Estos eventos están asociados no únicamente con hipoxia sino también con hipercapnia. Pacientes con OSA exhiben una excesiva somnolencia durante el día (Jenkinson, C. et al., 1999), hipertensión y falla cardíaca (Bradley, T. D. y Floras, J. S., 2003) debido a que la presión sanguínea aumenta de forma abrupta al final de cada evento obstructivo como resultado de un reflejo de vasoconstricción. Además de mostrar pérdida funcional de la memoria sustancial y ejecutiva, tienen incrementados los marcadores circulantes de estrés oxidativo e inflamación, y desarrollan pérdida regional de la sustancia gris (Beebe, D. W. y Gozal, D., 2002; Macey, P. M. et al., 2002; Ramirez, J. M., Folkow, L. P. y Blix, A. S., 2007).

Apnea del Sueño Central

Causada por una disfunción de los centros que generan y controlan la respiración (De Backer, W. A., 1995). Se cree que este fenómeno se debe principalmente a un daño en las neuronas de la región ventro-lateral del tallo cerebral, implicadas en la generación del ritmo respiratorio (De Backer, W. A., 1995). Sin embargo, se sabe que las apneas centrales pueden tener otras causas, como defectos en el control metabólico de los músculos respiratorios o inestabilidades en el control central en un sistema respiratorio por demás intacto; también pueden ser consecuencia del síndrome de hipoventilación alveolar crónica y son características de las personas que padecen de insuficiencia cardíaca congestiva (De Backer, W. A., 1995).

Al igual que las apneas obstructivas, las apneas centrales son recurrentes y pueden repetirse muchas veces en la misma noche (Younes, M. et al., 2001). Independientemente de la causa principal, un rasgo común de las apneas centrales es

que la presión parcial de CO₂ cae (fenómeno conocido como hipocapnia) por debajo de los niveles necesarios para estimular la generación del ritmo respiratorio (Reed, D. J. y Kellogg, R. H., 1960). Dicha hipocapnia puede ser provocada por la hiperventilación crónica que ocurre durante los periodos breves de vigilia entre episodios consecutivos de apnea y que es característica de los pacientes que sufren de apneas centrales (De Backer, W. A., 1995). Las consecuencias de la apnea central sobre la salud humana son muy parecidas a las de la apnea obstructiva. Sin embargo, las personas que sufren de apneas obstructivas, incluyendo los niños, corren el riesgo adicional de desarrollar insuficiencia cardíaca congestiva (De Backer, W. A., 1995).

Apnea Mixta

Como su nombre lo indica, es una combinación de la apnea del sueño obstructiva y de la apnea del sueño central. En un estudio reciente, la ablación de neuronas del CPB condujo a patrones de respiración atáxicos durante el alertamiento (Gray, P.A. et al., 2001) y a trastornos del sueño respiratorios, incluyendo la apnea (McKay, L. C., Janczewski, W. A. y Feldman, J. L., 2005); sugiriendo que el daño a las neuronas del CPB puede ser la base de los trastornos respiratorios que pueden agravarse durante el sueño (McKay, L. C., Janczewski, W. A. y Feldman, J. L., 2005). La agravación de esta enfermedad durante el sueño puede deberse al hecho de que las neuronas del rafe, que suministran inputs tónicos de 5-HT al generador del ritmo respiratorio y a varias motoneuronas respiratorias (Lalley, P. M. et al., 1997a) decrementan su disparo durante sueño MOR y no-MOR (Jacobs, B. L. y Azmitia, E. C., 1992).

La reducción en la liberación de 5-HT durante el sueño puede tener efectos profundos en la red respiratoria y así, de esta manera, contribuir a las apneas del sueño centrales. De hecho, recientemente, Tryba, A. K., Peña, F. y Ramirez, J. M. (2006) mostraron que el bloqueo de receptores 5-HT_{2A} puede producir apnea en hipoxia, eliminando el boqueo ficticio. Recientemente, se reportó un polimorfismo en este receptor asociado con SA (Sakai, K. et al., 2005; Bayazit, Y. A. et al., 2006). Casualmente, se han sugerido moduladores de la transmisión de 5-HT como tratamiento para las apneas del sueño centrales (Veasey, S. C., 2003).

Síndrome Congénito de Hipoventilación

El Síndrome Congénito de Hipoventilación [CCHS, por sus siglas en inglés (Congenital Central Hypoventilation Syndrome)] es un trastorno neurológico poco común presente al nacimiento, en el cual el control automático de la respiración está ausente o dañado durante el sueño, mientras que el control voluntario de la respiración, el cual opera durante horas de alertamiento, está generalmente intacto (Weese-Mayer, D. E. et al., 1999). El CCHS es considerado como una apnea del sueño central con hipoventilación severa. Este trastorno está asociado con la disfunción generalizada del sistema nervioso autónomo y con el desarrollo anormal de células embrionarias tempranas que forman la cresta neuronal, particularmente involucrando genes que son críticos para el desarrollo del centro respiratorio de la médula ventro-lateral, por lo que su deficiencia puede estar asociada al CCHS (Shirasawa, S. et al., 2000; Amiel, J. et al., 2003; De Pontual, L. et al., 2003; Nsegbe, E. et al., 2004). Desafortunadamente, los mecanismos implicados en las alteraciones de estos genes aún permanecen desconocidos.

Recientemente, un estudio de imagenología de resonancia magnética funcional localizó estructuras cerebrales que responden a la hipercapnia en pacientes con CCHS. Este estudio reveló la activación de regiones cerebrales usualmente no consideradas de tener una función respiratoria y revelaron papeles significativos de sitios ganglionares cerebelares y basales en respuesta a la hipercapnia, así como participación talámica y mesencefálica en el control de la respiración de estos pacientes (Harper, R. M. et al., 2005).

Depresión Respiratoria Inducida por Fármacos

Existen diversos fármacos, la mayoría de ellos comúnmente usados en la medicina clínica, que pueden producir un fenómeno llamado Depresión Respiratoria Inducida por Fármacos [DIRD, por sus siglas en inglés (Drug Induced Respiratory Depression)] (Kelly, H. W. et al., 1993). La DIRD puede ser causada por alcohol, analgésicos, narcóticos, barbitúricos y benzodiazepinas. Por ejemplo, un consumo elevado de alcohol puede afectar los centros respiratorios en el cerebro y causar muchos trastornos neurológicos (Brailowsky, S. y García, O., 1999). Además de sus efectos bien conocidos en distintos canales iónicos y receptores de neurotransmisores (Brailowsky, S. y García, O., 1999), el alcohol puede inhibir la ATPasa de Na^+/K^+ , dañar el metabolismo del AMPc y la síntesis GABAérgica (Brailowsky, S. y García, O., 1999; Buchanon, J. F. et al., 1992). En general, estos efectos del alcohol pueden producir grandes perturbaciones en la red respiratoria (Buchanon, J. F. et al., 1992; Moseley, A. E. et al., 2003), complicando la reversión de la depresión respiratoria producida por el alcohol (Summers, A. M. et al., 2000; Blackwell, C. C. et al., 2002). Los Barbitúricos son fuertes depresores respiratorios (Kelly, H. W. et al., 1993) y son contraindicados en

pacientes con trastornos respiratorios preexistentes (Pittman, A. M., Woodley, M. y Whelan, A., 1993). La combinación de barbitúricos y de otros depresores respiratorios puede causar efectos sinérgicos en el patrón de supresión respiratoria (Olin, B. R., Hebel, S. K. y Dewein, A. C., 1995). Recientemente, se mostró que la depresión respiratoria por barbitúricos se debe a la inhibición mediada por el receptor GABA_A (Fregosi, R. F., Luo, Z. e Iizuka, M., 2004). La activación de este receptor en la red respiratoria puede ser el componente principal de este DIRD. Aplicación de pentobarbital en la preparación de médula espinal-tallo cerebral enlenteció el ritmo respiratorio, pero su efecto se revirtió por el lavado del fármaco o por la aplicación simultánea de metiodida bicuculina, un antagonista a receptores GABA_A. El agonista a receptores GABA_A, muscimol, provoca cambios similares (Fregosi, R. F., Luo, Z. e Iizuka, M., 2004). El propofol, un agonista de receptores GABA_A, que se usa como anestésico, puede inducir depresión respiratoria posiblemente mediante la supresión del disparo de neuronas pre-inspiratorias y espiratorias, pero no de neuronas inspiratorias (Kashiwagi, M. et al., 2004). Todos estos datos sugieren que la activación de receptores GABA_A puede ser un componente importante de DIRD (al menos para la depresión respiratoria inducida por alcohol, barbitúricos y posiblemente benzodiazepinas). Por otra parte, los opioides y narcóticos son depresores respiratorios muy potentes (Koo, P. J. et al., 1992; Reisner-Keller, L. A. et al., 1992; Olin, B. R., Hebel, S. K. y Dewein, A. C., 1995). Interesantemente, algunos autores han reportado que las mismas neuronas que expresan receptores a opioides también tienen receptores 5-HT_{4(a)}, y que un agonista 5-HT_{4(a)} previene la depresión respiratoria inducida por opioides sin afectar las propiedades analgésicas de los opioides (Manzke, T. et al., 2003). Aunque este efecto no se puede reproducir en humanos (Lötsch, J. et al., 2005), el diseño de agonistas 5-

HT_{4(a)} más específicos, puede ser una alternativa al tratamiento de la depresión respiratoria inducida por fármacos usados en la medicina clínica.

Síndrome de Hipoventilación por Obesidad

El síndrome de hipoventilación por obesidad [OHS, por sus siglas en inglés (Obesity Hypoventilation Syndrome)] es un hallazgo relativamente poco común en niños con obesidad. Algunos autores definen al OHS como una combinación de obesidad e hipoventilación crónica; sin embargo, la definición precisa de este síndrome ha estado lejos de ser una definición directa, debido a que la obesidad, la respiración trastornada en el sueño y la hipercapnia durante el estado de alerta, son características generales descritas en el OHS (Olson, A. L. y Zwillich, C., 2005). Clínicamente, los pacientes pueden presentar síntomas como sueño excesivo durante el día, fatiga o dolores de cabeza matutinos, los cuales son similares a los síntomas observados en el síndrome de apnea-hipoapnea obstructiva del sueño. Se desconoce el mecanismo exacto de desarrollo de OHS; sin embargo, puede estar relacionado con anomalías en el patrón respiratorio y a la respuesta a la hipoxia e hipercapnia, en vez de los factores mecánicos relacionados con peso corporal excesivo que puede resultar en fatiga de músculos respiratorios como consecuencia de intentar mantener la respiración bajo estas condiciones. Sin embargo, la distribución de la grasa corporal, hormonas y el tamaño del flujo de aire superior puede jugar un papel importante en OHS. Evidencia reciente sugiere que la proteína leptina puede estar involucrada en la patogénesis de OHS. La leptina se produce por un tejido adiposo y actúa en receptores en el hipotálamo para suprimir el apetito. Una mutación en el gen que codifica la proteína de la leptina produce obesidad en ratones y humanos (Zhang, Y. et al., 1994; Campfield, L. A. et al.,

1995; Montague, C. T. et al., 1997). Además, la leptina actúa en los centros respiratorios centrales para estimular la respiración, mientras que su deficiencia se ha asociado con hipoventilación (O'Donnell, C. P. et al., 1999). Ratones deficientes en leptina se hipoventilan y el reemplazo de leptina resulta en una respiración incrementada. En ratones wild-type con obesidad inducida por la dieta, los niveles de leptina se incrementan más de 10 veces y están asociados con un incremento en la respiración. Estos hallazgos sugieren que la leptina puede estar involucrada en mantener un nivel adecuado de respiración en ciertos grados de obesidad (O'Donnell, C. P. et al., 1999).

Síndrome de Rett

El síndrome de Rett [RS, por sus siglas en inglés (Rett Syndrome)], que fue descrito por primera vez en 1966 (Rett, A., 1966), es un severo trastorno del neurodesarrollo caracterizado por la pérdida progresiva de funciones intelectuales, habilidades motoras finas y gruesas, habilidades comunicativas, desaceleración del crecimiento de la cabeza y el desarrollo de movimientos estereotipados de la mano, que ocurren después de un periodo normal de desarrollo. Niñas con RS usualmente desarrollan ataques, escoliosis, y retraso de crecimiento (Hagberg, B. et al., 1983). La asociación de RS con mutaciones en el *methyl-CpG binding protein 2 gene* (MECP2) se reportó en 1999 (Amir, R. E. et al., 1999). Se sabe que la proteína MECP2 se une a secuencias metiladas del ADN y recluta compuestos silenciadores que llevan a la compactación y silenciamiento de cromatina en los alrededores (Van den Veyver, I. B. y Zoghbi, H. Y., 2000). La disritmia de la respiración es una característica notable del síndrome de Rett y está fuertemente relacionada al trastorno del movimiento y a la

agitación. Son notables en estos pacientes la hiperventilación alterna y la contención del aliento (Elian, M. y Rudolf, N. D., 1991; Kerr, A. M., 1992; Woodyatt, G. C. y Murdoch, B. E., 1996; Morton, R. E. et al., 1997; Cooper, R. A., Kerr, A. M. y Amos, P. M., 1998; Kerr, A. M. y Julu, P. O., 1999; Julu, P. O. et al., 2001). Interesantemente, la respiración es regular durante el sueño pero se puede transformar de altamente irregular a regular durante el estado de alerta (Marcus, C. L. et al., 1994; Julu, P. O. et al., 2001). Existe fuerte evidencia que sugiere que estas irregularidades en la respiración son causadas por una falta de neuromoduladores requeridos para generar ritmos respiratorios regulares en el tallo cerebral (Nomura, Y., Segawa, M. e Higurashi, M., 1985; Zoghbi, H. Y. et al., 1985; Riederer, P. et al., 1986; Zoghbi, H. Y. et al., 1989; Lekman, A. et al., 1990; Nielsen, J. B., Lou, H. C. y Andresen, J., 1990; Segawa, M., 1997; Kerr, A. M. et al., 1998; Dunn, H. G., 2001; Dunn, H. G. y MacLeod, P. M., 2001). El hallazgo reciente de que las perturbaciones en la respiración observadas en modelos transgénicos del síndrome de Rett (el ratón deficiente de MECP2) pueden corregirse con la aplicación de noradrenalina (*in vitro*) (Viemari, J. C. et al., 2005), abre la posibilidad de entender y corregir los trastornos respiratorios asociados con esta enfermedad.

Lesiones en la Espina Dorsal

Los trastornos respiratorios son la causa principal de mortalidad y morbilidad después de las lesiones de espina dorsal [SCI, por sus siglas en inglés (Spinal Cord Injury)], afectando aproximadamente a la mitad de todos los pacientes con un déficit neurológico después de SCI (Wilson, C. G. et al., 2004). Las lesiones traumáticas a la espina dorsal cervical, rostral al nivel del núcleo frénico, pueden interrumpir las vías

respiratorias bulboespinales descendientes (Dobbins, E. G. y Feldman, J. L., 1994) y causar parálisis muscular respiratoria. La insuficiencia respiratoria resultante se trata, frecuentemente, colocando un ventilador mecánico como apoyo a largo plazo. Dicho tratamiento no siempre es óptimo y puede llevar a complicaciones serias, como infecciones, neumonía, atelectasis, o incluso la muerte (Claxton, A. R. et al., 1998; Frankel, H. L. et al., 1998). Además, los pacientes cuadraplégicos que están atados a ventiladores mecánicos no tienen completa libertad de participar en estrategias de rehabilitación física y ocupacional. Eventualmente, estos pacientes tienen la tasa de mortalidad más alta de todas las personas que sufren de lesiones de espina dorsal. Las estrategias para aumentar la función respiratoria después de una SCI se han enfocado en preservar las vías espinales durante el periodo agudo de post-lesión (Blight, A. R., 2004). De hecho, las lesiones espinales, con axones no heridos, suministran un sustrato para la débil recuperación funcional espontánea usualmente observada en sistemas motores debajo de la lesión (Raineteau, O. y Schwab, M. E., 2001). Por otra parte, en un modelo animal de SCI, se ha demostrado que una vía motora respiratoria latente puede activarse para restaurar la función de un hemidiafragma paralizado con hemisecciones ipsilaterales de la cervical dorsal durante un reflejo conocido como el “fenómeno frénico cruzado” [CCP, por sus siglas en inglés (Crossed Phrenic Phenomenon)] (Goshgarian, H. G., 1979, 2003). En este modelo, una hemisección de la espina dorsal cervical interrumpe las principales vías respiratorias descendientes y paraliza el hemidiafragma ipsilateral a la hemisección. Transacciones subsecuentes del nervio frénico contralateral a la hemisección induce asfixia, la cual aumenta el patrón respiratorio central y, así, activa la vía motora respiratoria latente, reestableciendo la función del hemidiafragma paralizado por la hemisección (Lewis, L. J. y Brookhart, J. M., 1951). La activación de la vía motora respiratoria latente también puede lograrse

farmacológicamente por la aplicación de antagonistas de receptores de adenosina tipo 1 y agonistas de receptores de adenosina tipo 2 (Nantwi, K. D. y Goshgarian, H. G., 2002; Zimmer, M. B. y Goshgarian, H. G., 2005) así como agonistas serotoninérgicos (Hadley, S. D., Walker, P. D. y Goshgarian, H. G., 1999; Zhou, S. Y. y Goshgarian, H. G., 2000) por un mecanismo mediado por receptores 5-HT₂ (Zhou, S. Y., Basura, G. J. y Goshgarian, H. G., 2001). Estos datos experimentales abren una ventana terapéutica que debe ser considerada en el tratamiento de estas consecuencias particulares de la lesión de espina dorsal. Recientemente, se ha mostrado que la hipoxia intermitente fortalece las vías sinápticas espinales cruzadas por un mecanismo dependiente de 5-HT (Golder, F. J. y Mitchell, G. S., 2005).

18. Referencias

- Adolph, E. F. (1969). Regulations during survival without oxygen in infant mammals. *Respiratory Physiology*, 7, 356-368.
- Akiyama, Y., Nishimura, M., Kobayashi, S., Yoshioka, A., Yamamoto, M., Miyamoto, K. y Kawakami, Y. (1993). Effects of naloxone on the sensation of dyspnea during acute respiratory stress in normal adults. *Journal of Applied Physiology*, 74, 590-595.
- Amiel, J., Laudier, B., Attié-Bitach, T., Trang, H., de Pontual, L., Gener, B., Trochet, D., Etchevers, H., Simonneau, M., Vekemans, M., Munnich, A., Gaultier, C. y Lyonnet, S. (2003). Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. *Nature Genetics*, 33, 459-461.
- Amir, R. E., Van den Veyver, I. B., Wan, M., Tran, C. Q., Francke, U. y Zoghbi, H. Y. (1999). Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nature Genetics*, 23, 185-188.
- Arata, A., Onimaru, H. y Homma, I. (1993). Effects of cAMP on respiratory rhythm generation in brainstem-spinal cord preparation from newborn rat. *Brain Research*, 605, 193-199.
- Arshavsky, Y. I. (2003). Cellular and network properties in the functioning of the nervous system: from central pattern generators to cognition. *Brain Research Reviews*, 41, 229-267.
- Ballanyi, K., Lalley, P. M., Hoch, B. y Richter, D. W. (1997). cAMP-dependent reversal of opioid- and prostaglandin-mediated depression of the isolated respiratory network in newborn rats. *Journal of Physiology*, 504, 127-134.
- Ballanyi, K., Onimaru, H. y Homma, I. (1999). Respiratory network function in the isolated brainstem-spinal cord of newborn rats. *Progress in Neurobiology*, 59, 583-634.
- Ballanyi, K., Volker, A. y Richter, D. W. (1994). Anoxia induced functional inactivation of neonatal respiratory neurones in vitro. *NeuroReport*, 6, 165-168.
- Bayazit, Y. A., Yilmaz, M., Ciftci, T., Erdal, E., Kokturk, O., Gokdogan, T., Kemaloglu, Y. K. e Inal, E. (2006). Association of the -1438G/A polymorphism of the 5-HT2A receptor gene with obstructive sleep apnea syndrome. *Journal of Oto-Rhino-Laryngology and its Related Specialties*, 68, 123-128.

- Beebe, D. W. y Gozal, D. (2002). Obstructive sleep apnea and the prefrontal cortex: towards a comprehensive model linking nocturnal upper airway obstruction to daytime cognitive and behavioral deficits. *Journal of Sleep Research*, 11, 1-16.
- Bianchi, A. L., Denavit-Saubié, M. y Champagnat, J. (1995). Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiological Reviews*, 75, 1-45.
- Birmingham, J. T. y Tauck, D. L. (2003). Neuromodulation in invertebrate sensory systems: from biophysics to behavior. *Journal of Experimental Biology*, 206, 3541-3546.
- Blackwell, C. C., Gordon, A. E., James, V. S., MacKenzie, D. A., Mogensen-Buchanan, M., El Ahmer, O. R., Al Madani, O. M., Törö, K., Csukás, Z., Sótonyi, P., Weir, D. M. y Busuttill, A. (2002). The role of bacterial toxins in sudan infant death syndrome (SIDS). *International Journal of Medical Microbiology*, 291, 561-570.
- Blight, A. R. (2004). Just one word: plasticity. *Nature Neuroscience*, 7, 206-208.
- Bodineau, L., Cayetanot, F. y Frugiere, A. (2000). Possible role of retrotrapezoid nucleus and parapyramidal area in the respiratory response to anoxia: an in vitro study in neonatal rat. *Neuroscience Letters*, 295, 67-69.
- Bradley, T. D. y Floras, J. S. (2003). Sleep apnea and Heart failure: Part I: obstructive sleep apnea. *Circulation*, 107, 1671-1678.
- Brailowsky, S. y Garcia, O. (1999). Etanol, GABA and epilepsy. *Archives of Medical Research*, 30, 3-9.
- Buchanon, J. F., Joe, G., McKinney, H. E., Koda-Kimble, M. A. y Young, L. Y. (1992). *Applied Therapeutics: The Clinical Use of Drugs*. Vancouver, BC: Applied Therapeutics, Inc. Vol. 60, pp. 1-60.
- Bureau, M. A., Zinman, R., Foulon, P. y Begin, R. (1984). Diphasic ventilatory response to hypoxia in newborn lambs. *Journal of Applied Physiology*, 56, 84-90.
- Butera, R. J. Jr., Rinzel, J. y Smith, J. C. (1999). Models of respiratory rhythm generation in the pre-Botzinger complex. II. Populations Of coupled pacemaker neurons. *Journal of Neurophysiology*, 82, 398-415.
- Campfield, L. A., Smith, F. J., Guisez, Y., Devos, R. y Burn, P. (1995). Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*, 269, 546-549.
- Champagnat, J. y Richter, D. W. (1993). Second messenger-induced modulation of the excitability of respiratory neurons. *NeuroReport*, 4, 861-863.

- Chen, Z. B., Enqberg, G., Hedner, T. y Hedner, J. (1991). Antagonistic effects of somatostatin and substance P on respiratory regulation in the rat ventrolateral medulla oblongata. *Brain Research*, 556, 13-21.
- Claxton, A. R., Wong, D. T., Chung, F. y Fehlings, M. G. (1998). Predictors of hospital mortality and mechanical ventilation in patients with cervical spinal cord injury. *Canadian Journal of Anesthesia*, 45, 144-149.
- Cooke, R. W. (1998). Smoking, intra-uterine growth retardation and sudden infant death syndrome. *International Journal of Epidemiology*, 27, 238-241.
- Cooper, R. A., Kerr, A. M. y Amos, P. M. (1998). Rett syndrome: critical examination of clinical features, serial EEG and video-monitoring in understanding and management. *European Journal of Paediatric Neurology*, 2, 127-135.
- Côté, A., Gerez, T., Brouillette, R. T. y Laplante, S. (2000). Circumstances leading to a change to prone sleeping in sudden infant death syndrome victims. *Pediatrics*, 106, 86.
- Daly, J. W., Padgett, W. y Seamon, K. B. (1982). Activation of cyclic AMP-generating systems in brain membranes and slices by the diterpene forskolin: augmentation of receptor-mediated responses. *Journal of Neurochemistry*, 38, 532-544.
- De Backer, W. A. (1995). Central sleep apnoea, pathogenesis and treatment: an overview and perspective. *European Respiratory Journal*, 8, 1372-1383.
- De Pontual, L., Népote, V., Attié-Bitach, T., Al Halabiah, H., Trang, H., Elghouzzi, V., Levacher, B., Benihoud, K., Augé, J., Faure, C., Laudier, B., Vekemans, M., Munnich, A., Perricaudet, M., Guillemot, F., Gaultier, C., Lyonnet, S., Simonneau, M. y Amiel, J. (2003). Noradrenergic neuronal development is impaired by mutation of the proneural HASH-1 gene in congenital central hypoventilation syndrome (Ondine's curse). *Human Molecular Genetics*, 12, 3173-3180.
- Del Negro, C. A., Johnson, S. M., Butera, R. J. y Smith, J. C. (2001). Models of respiratory rhythm generation in the pre-Botzinger complex. III. Experimental tests of model predictions. *Journal of Neurophysiology*, 86, 59-74.
- Del Negro, C. A., Morgado-Valle, C. y Feldman, J. L. (2002). Respiratory rhythm: an emergent network property? *Neuron*, 34, 821-830.
- Del Negro, C. A., Morgado-Valle, C., Hayes, J. A., Mackay, D. D., Pace, R. W., Crowder, E. A. y Feldman, J. L. (2005). Sodium and calcium current-mediated pacemaker neurons and respiratory rhythm generation. *Journal of Neuroscience*, 25, 446-453.
- Denavit-Saubié, M., Champagnat, J. y Zieglgänsberger, W. (1978). Effects of opiates and methionine-enkephalin on pontine and bulbar respiratory neurons of the cat. *Brain Research*, 155, 55-67.

- Deshpande, P., Khurana, A., Hansen, P., Wilkins, D. y Thach B. T. (1999). Failure of autoresuscitation in weanling mice: significance of cardiac glycogen and heart rate regulation. *Journal of Applied Physiology*, 87, 203-210.
- Dessauer, C. W., Tesmer, J. J., Sprang, S. R. y Gilman, A. G. (1998). Identification of a G α binding site on type V adenylyl cyclase. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 25831-25839.
- Dickinson, P. S. (2006). Neuromodulation of central pattern generators in invertebrates and vertebrates. *Current Opinion in Neurobiology*, 16, 604-614.
- Dobbins, E. G. y Feldman, J. L. (1994). Brainstem network controlling descending drive to phrenic motoneurons in rat. *Journal of Comparative Neurology*, 347, 64-86.
- Duffin, J., Tian, G. F. y Prever, J. H. (2000). Functional synaptic connections among respiratory neurons. *Respiratory Physiology*, 122, 237-246.
- Dunn, H. G. (2001). Neurons and neuronal systems involved in the pathophysiologies of Rett syndrome. *Brain and Development*, 23, 99-100.
- Dunn, H. G. y MacLeod, P. M. (2001). Rett syndrome: review of biological abnormalities. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 28, 16-29.
- Elian, M. y Rudolf, N. D. (1991). EEG and respiration in Rett syndrome. *Acta Neurologica Scandinavica*, 83, 123-128.
- Ellenberger, H. H. (1999). Nucleus ambiguus and bulbospinal ventral respiratory group neurons in the neonatal rat. *Brain Research Bulletin*, 50, 1-13.
- Elsen, F. P. y Ramirez, J. M. (1998). Calcium currents of rhythmic neurons recorded in the isolated respiratory network of neonatal mice. *Journal of Neuroscience*, 18, 10652-10662.
- England, S. J., Melton, J. E., Douse, M. A. y Duffin, J. (1995). Activity of respiratory neurons during hypoxia in the chemodenervated cat. *Journal of Applied Physiology*, 78, 856-861.
- Eshel, G., Safar, P., Sassano, J. y Stezoski, W. (1990). Hyperthermia-induced cardiac arrest in dogs and monkeys. *Resuscitation*, 20, 129-143.
- Felder, C. C., Jose, P. A. y Axelrod, J. (1989). The dopamine-1 agonist, SKF 82526, stimulates phospholipase-C activity independent of adenylate cyclase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 248, 171-175.
- Feldman, J. L. y Del Negro, C. A. (2006). Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. *Nature Reviews Neuroscience*, 7, 232-242.

- Feldman, J. L., Mitchell, G. S. y Nattie, E. E. (2003). Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity. *Annual Review of Neuroscience*, 26, 239-266.
- Feldman, J. L. y Smith, J. C. (1989). Cellular mechanisms underlying modulation of breathing pattern in mammals. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 563, 114-130.
- Fewell, J. E., Smith, F. G., Ng, V. K., Wong, V. H. y Wang, Y. (2000). Postnatal age influences the ability of rats to autoresuscitate from hypoxic-induced apnea. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 279, 39-46.
- Filiano, J. J. y Kinney, H. C. (1994). A perspective on neuropathologic findings in victims of the sudden infant death syndrome: the triple-risk model. *Biology of the Neonate*, 65, 194-197.
- Fleming, P. J., Gilbert, R., Azaz, Y., Berry, P. J., Rudd, P. T., Stewart, A. y Hall, E. (1990). Interaction between bedding and sleeping position in the sudden infant death syndrome: a population based case-control study. *British Medical Journal*, 301, 85-89.
- Florez, J., Mediavilla, A. y Pazos, A. (1980). Respiratory effects of beta-endorphin, D-Ala²-met-enkephalinamide, and Met-enkephalin injected into the lateral ventricle and the pontomedullary subarachnoid space. *Brain Research*, 199, 197-206.
- Frankel, H. L., Coll, J. R., Charlifue, S. W., Whiteneck, G. G., Gardner, B. P., Jamous, M. A., Krishnan, K. R., Nuseibeh, I., Savic, G. y Sett, P. (1998). Long-term survival in spinal cord injury: a fifty year investigation. *Spinal Cord*, 36, 266-274.
- Fregosi, R. F., Luo, Z. e Iizuka, M. (2004). GABAA receptors mediate postnatal depression of respiratory frequency by barbiturates. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 140, 219-230.
- French, J. W., Morgan, B. C. y Guntheroth, W. G. (1972). Infant monkeys—a model for crib death. *American Journal of Diseases of Children*, 123, 480-484.
- Frøen, J. F., Akre, H., Stray-Pedersen, B. y 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, 52.
- Fuji, M., Umezawa, K. y Arata, A. (2004). Dopaminergic modulation on respiratory rhythm in rat brainstem-spinal cord preparation. *Neuroscience Research*, 50, 355-359.
- Fung, M. L., Wang, W. y St John, W. M. (1994). Medullary loci critical for expression of gasping in adult rats. *Journal of Physiology*, 480, 597-611.

- Funk, G. D. y Feldman, J. L. (1995). Generation of respiratory rhythm and pattern in mammals: insights from developmental studies. *Current Opinion in Neurobiology*, 5, 778-785.
- Gershan, W. M., Jacobi, M. S. y Thach, B. T. (1992). Mechanisms underlying induced autoresuscitation failure in BALB/c and SWR mice. *Journal of Applied Physiology*, 72, 677-685.
- Golder, F. J. y Mitchell, G. S. (2005). Spinal synaptic enhancement with acute intermittent hypoxia improves respiratory function after chronic cervical spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, 25, 2925-2932.
- Goshgarian, H. G. (1979). Developmental plasticity in the respiratory pathway of the adult rat. *Experimental Neurology*, 66, 547-555.
- Goshgarian, H. G. (2003). The crossed phrenic phenomenon: a model for plasticity in the respiratory pathways following spinal cord injury. *Journal of Applied Physiology*, 94, 795-810.
- Gozal, D., Gozal E., Reeves, S. R. y Lipton, A. J. (2002). Gasping and autoresuscitation in the developing rat: effect of antecedent intermittent hypoxia. *Journal of Applied Physiology*, 92, 1141-1144.
- Gray, P. A., Janczewski, W.A., Mellen, N., McCrimmon, D. R. y Feldman, J. A. (2001). Normal breathing requires pre-Bötzinger complex neurokinin-1 receptor-expressing neurons. *Nature Neuroscience*, 4, 927-930.
- Gray, P. A., Rekling, J. C., Bocchiaro, C. M. y Feldman, J. L. (1999). Modulation of respiratory frequency by peptidergic input to rhythmogenic neurons in the preBotzinger complx. *Science*, 286, 1566-1568.
- Greer, J. J., al-Zubaidy, Z. y Carter, J. E. (1996). Thyrotropin-releasing hormone stimulates perinatal rat respiration in Vitro. *American Journal of Physiology*, 271, 1160-1164.
- Greer, J. J., Carter, J. E. y al-Zubaidy, Z. (1995). Opioid depression of respiration in neonatal rats. *Journal of Physiology*, 485, 845-855.
- Guntheroth, W. G. y Kawabori, I. (1975). Hypoxic apnea and gasping. *Journal of Clinical Investigation*, 56, 1371-1377.
- Guntheroth, W. G. y Spiers, P. S. (2002). The triple risk hypotheses in sudden infant death syndrome. *Pediatrics*, 110, 64.
- Guyenet, P. G. y Wang, H. (2001). Pre-Bötzinger neurons with preinspiratory discharges “in vivo” express NK1 receptors in the rat. *Journal of Neurophysiology*, 86, 438-446.

- Haddad, G. G. y Jiang, C. (1993). Mechanisms of anoxia-induced depolarization in brainstem neurons: in vitro current and voltage clamp studies in the adult rat. *Brain Research*, 625, 261-268.
- Haddad, G. G. y Mellins, R. B. (1984). Hypoxia and respiratory control in early life. *Annual Review of Physiology*, 46, 629-643.
- Hadley, S. D., Walker, P. D. y Goshgarian, H. G. (1999). Effects of serotonin inhibition on neuronal and astrocyte plasticity in the phrenic nucleus 4 h following C2 spinal cord hemisection. *Experimental Neurology*, 160, 433-445.
- Hagberg, B., Aicardi, J., Dias, K. y 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, 471-479.
- Haji, A., Takeda, R. y Okazaki, M. (2000). Neuropharmacology of control of respiratory rhythm and pattern in mature mammals. *Pharmacology and Therapeutics*, 86, 277-304.
- Harfstrand, A., Fuxe, K., Kalia, M. y Agnati, L. F. (1985). Somatostatin induced apnoea: prevention by central and peripheral administration of the opiate receptor blocking agent naloxone. *Acta Physiologica Scandinavica*, 125, 91-95.
- Harper, R. M., Macey, P. M., Woo, M. A., Macey, K. E., Keens, T. G., Gozal, D. y Alger, J. R. (2005). Hypercapnic exposure in congenital central hypoventilation syndrome reveals CNS respiratory control mechanisms. *Journal of Neurophysiology*, 93, 1647-1658.
- Hedner, J., Hedner, T., Jonason, J. y Lundberg, D. (1981). Central respiratory stimulant effect by thyrotropin releasing hormone in the rat. *Neuroscience Letters*, 25, 317-320.
- Hicks, S. P. (1953). Developmental brain metabolism; effects of cortisone, anoxia fluoroacetate, radiation, insulin, and other inhibitors on the embryo, newborn, and adult. *American Medical Association Archives of Pathology*, 55, 302-327.
- Hilaire, G. y Duron, B. (1999). Maturation of the mammalian respiratory system. *Physiological Reviews*, 79, 325-360.
- Hilaire, G. y Monteau, R. (1976). Function of different medullary neurons in respiration. *Journal of Physiology*, 70, 759-777.
- Hilaire, G. y Pásaro, R. (2003). Genesis and control of the respiratory rhythm in adult mammals. *News in Physiological Sciences*, 18, 23-28.

- Hoffman, H. J. y Hillman, L. S. (1992). Epidemiology of the sudden infant death syndrome: maternal, neonatal, and postneonatal risk factors. *Clinics in Perinatology*, 19, 717-737.
- Hsieh, J. H., Chang, Y. C., Su, C. K., Hwang, J. C., Yen, C. T. y Chai, C. Y. (1998). A single minute lesion around the ventral respiratory group in medulla produces fatal apnea in cats. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 73, 7-18.
- Huang, Z. G., Wang, X., Dergacheva, O. y Mendelowitz, D. (2005). Prenatal nicotine exposure recruits an excitatory pathway to brainstem parasympathetic cardioinhibitory neurons during hypoxia/hypercapnia in the rat: implications for sudden infant death syndrome. *Pediatric Research*, 58, 562-567.
- Hui, D. S., Choy, D. K., Ko, F. W., Li, T. S. y Lai, C. K. (2000). Obstructive sleep apnoea syndrome: treatment update. *Hong Kong Medical Journal*, 6, 209-217.
- Insel, P. A. y Ostrom, R. S. (2003). Forskolin as a tool for examining adenylyl cyclase expression, regulation, and G protein signaling. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 23, 305-314.
- Jacobs, B. L. y Azmitia, E. C. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiological Reviews*, 72, 165-229.
- Janczewski, W. A. y Feldman, J. L. (2006). Distinct rhythm generators for inspiration and expiration in the juvenile rat. *Journal of Physiology*, 570, 407-420.
- Jenkinson, C., Davies, R. J., Mullins, R. y Stradling, J. R. (1999). Comparison of therapeutic and subtherapeutic nasal continuous positive airway pressure for obstructive sleep apnoea: a randomised prospective parallel trial. *Lancet*, 353, 2100-2105.
- Johnson, S. M., Koshiya, N. y 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, 1772-1776.
- Johnson, S. M., Smith, J. C. y Feldman, J. L. (1996). Modulation of respiratory rhythm in vitro: role of Gi/o protein-mediated mechanisms. *Journal of Applied Physiology*, 80, 2120-2133.
- Julu, P. O., Kerr, A. M., Apartopoulos, F., Al-Rawas, S., Engerström, I. W., Engerström, L., Jamal, G. A. y Hansen, S. (2001). Characterisation of breathing and associated central autonomic dysfunction in the Rett disorder. *Archives of Disease in Childhood*, 85, 29-37.
- Kahraman, L. y Thach, B. T. (2004). Inhibitory effects of hyperthermia on mechanisms involved in autoresuscitation from hypoxic apnea in mice: a model for thermal stress causing SIDS. *Journal of Applied Physiology*, 97, 669-674.

- Kandel E. R., Schwartz J. H. y Jessell T. M. (2000). *Neurociencia y conducta*. Madrid, ES: Prentice Hall.
- Kasaba, T., Takeshita, M. y Takasaki, M. (1997). The effects of caffeine on the respiratory depression by morphine. *Masui*, 46, 1570-1574.
- Kashiwagi, M., Okada, Y., Kuwana, S., Sakuraba, S., Ochiai, R. y Takeda, J. (2004). A neuronal mechanism of propofol-induced central respiratory depression in newborn rats. *Anesthesia and Analgesia*, 99, 49-55.
- Kato, I., Groswasser, J., Franco, P., Scaillet, S., Kelmanson, I., Togari, H. y Kahn, A. (2001). Developmental characteristics of apnea in infants who succumb to sudden infant death syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 164, 1464-1469.
- Kelly, H. W., Dipiro, J. T., Talbert, R. L. y Hayes, P. E. (1993). *Pharmacotherapy: A Pathophysiological Approach*. Norwalk, CA: Appleton & Lange. pp: 482-493.
- Kerr, A. M. (1992). A review of the respiratory disorder in the Rett syndrome. *Brain and Development*, 14, 43-45.
- Kerr, A. M. y Julu, P. O. (1999). Recent insights into hyperventilation from the study of Rett syndrome. *Archives of Disease in Childhood*, 80, 384-387.
- Kerr, A. M., Julu, P. O., Hansen, S., Apartopoulos, F. y Perat, M. V. (1998). *New developments in child neurology*. Bologna, IT: Monduzzi Editore. pp: 191-195.
- Koo, P. J., Dube, J. E., Koda-Kimble, M. A. y Young, L. Y. (1992). *Applied Therapeutics: The Clinical Use of Drugs*. Vancouver, BC: Applied Therapeutics, Inc. Vol. 4, pp. 2-4.
- Koshiya, N. y Guyenet, P. G. (1996). Tonic sympathetic chemoreflex after blockade of respiratory rhythmogenesis in the rat. *Journal of Physiology*, 491, 859-869.
- Koshiya, N. y Smith, J. C. (1999). Neuronal pacemaker for breathing visualized in vitro. *Nature*, 400, 360-363.
- Lalley, P. M. (1986). Effects of baclofen and gamma-aminobutyric acid on different types of medullary respiratory neurons. *Brain Research*, 376, 392-395.
- Lalley, P. M. (2004). Dopamine 1 receptor agonists reverse opioid respiratory network depression, increase CO₂ reactivity. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 139, 247-262.
- Lalley, P. M. (2005a). D1-dopamine receptor blockade slows respiratory rhythm and enhances opioid-mediated depression. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 145, 13-22.

- Lalley, P. M. (2005b). D1-dopamine receptor agonists prevent and reverse opiate depression of breathing but not antinociception in the cat. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 289, 45-51.
- Lalley, P. M., Benacka, R., Bischoff, A. M. y Richter, D. W. (1997a). Nucleus raphe obscurus evokes 5-HT-1A receptor-mediated modulation of respiratory neurons. *Brain Research*, 747, 156-159.
- Lalley, P. M., Pierrefiche, O., Bischoff, A. M. y Richter, D. W. (1997b). cAMP-dependent protein kinase modulates expiratory neurons *in vivo*. *Journal of Neurophysiology*, 77, 1119-1131.
- Laurenza, A. y Seamon, K. B. (1991). High-affinity binding sites for [3H]forskolin. *Methods in Enzymology*, 195, 52-65.
- Leach, C. E., Blair, P. S., Fleming, P. J., Smith, I. J., Platt, M. W., Berry, P. J. y Golding, J. (1999). Epidemiology of SIDS and explained sudden infant deaths. *Pediatrics*, 104, 43.
- Lekman, A., Witt-Engerström, I., Holmberg, B., Percy, A., Svennerholm, L. y Hagberg, B. (1990). CSF and urine biogenic amine metabolites in Rett syndrome. *Clinical Genetics*, 37, 173-178.
- Lewis, L. J. y Brookhart, J. M. (1951). Significance of the crossed phrenic phenomenon. *American Journal of Physiology*, 166, 241-254.
- Ley, R. (1994). An introduction to the psychophysiology of breathing. *Biofeedback and Self-Regulation*, 19, 95-96.
- Lieske, S. P., Thoby-Brisson, M., Telgkamp, P. y Ramirez, J. M. (2000). Reconfiguration of the neural network controlling multiple breathing patterns: eupnea, sighs and gasps. *Nature Neuroscience*, 3, 600-607.
- Lieske, S. P., Thoby-Brisson, M. y Ramirez, J. M. (2001). Reconfiguration of the central respiratory network under normoxic and hypoxic conditions. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 499, 171-178.
- Lijowska, A. S., Reed, N. W., Chiodini, B. A. y Thach, B. T. (1997). Sequential arousal and airway-defensive behavior of infants in asphyxial sleep environments. *Journal of Applied Physiology*, 83, 219-228.
- Lindsey, B. G. (2001). How is the respiratory central pattern generator configured and reconfigured? A workshop summary. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 499, 179-184.
- Lopez, H. S. y Brown, A. M. (1992). Neuromodulation. *Current Opinion in Neurobiology*, 2, 317-322.

- Lötsch, J., Skarke, C., Schneider, A., Hummel, T. y Geisslinger, G. (2005). The 5-hydroxytryptamine 4 receptor agonist mosapride does not antagonize morphine-induced respiratory depression. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 78, 278-287.
- Loube, D. (2001). Sleep apnea: a global perspective. *Chest*, 119, 4-5.
- Lumsden, T. (1923). Observations on the respiratory centres. *Journal of Physiology*, 57, 354-367.
- Lundberg, D., Bresse, G. R. y Mueller, R. A. (1979). Dopaminergic interaction with the respiratory control system in the rat. *European Journal of Pharmacology*, 54, 153-159.
- Lundberg, D., Mueller, R. A. y Breese, G. R. (1982). Effects of vagotomy and glossopharyngectomy on respiratory response to dopamine-agonists. *Acta Physiologica Scandinavica*, 114, 81-89.
- Macdonald, S. M., Song, G. y Poon, C. S. (2007). Nonassociative learning promotes respiratory entrainment to mechanical ventilation. *PLoS ONE Public Library of Science*, 2, 865.
- Macey, P. M., Henderson, L. A., Macey, K. E., Alger, J. R., Frysinger, R. C., Woo, M. A., Harper, R. K., Yan-Go, F. L. y Harper, R. M. (2002). Brain morphology associated with obstructive sleep apnea. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 166, 1382-1387.
- Manzke, T., Guenther, U., Ponimaskin, E. G., Haller, M., Dutschmann, M., Schwarzacher, S. y Richter, D. W. (2003). 5-HT₄(a) receptors avert opioid-induced breathing depression without loss of analgesia. *Science*, 301, 226-229.
- Marcus, C. L., Carroll, J. L., McColley, S. A., Loughlin, G. M., Curtis, S., Pyzik, P. y Naidu, S. (1994). Polysomnographic characteristics of patients with Rett syndrome. *Journal of Pediatrics*, 125, 218-224.
- Marder, E. (1994). Invertebrate neurobiology. Polymorphic neural networks. *Current Biology*, 4, 752-754.
- Martin, R. J., DiFiore, J. M., Jana, L., Davis, R. L., Miller, M. J., Coles, S. K. y Dick, T. E. (1998). Persistence of the biphasic ventilatory response to hypoxia in preterm infants. *Journal of Pediatrics*, 132, 960-964.
- Maxova, H. y Vizek, M. (2001). Biphasic ventilatory response to hypoxia in unanesthetized rats. *Physiological Research*, 50, 91-96.
- McCrimmon, D. R., Ramirez, J. M., Alford, S. y Zuperku, E. J. (2000). Unraveling the Mechanism for Respiratory Rhythm Generation *BioEssays*, 22, 6-9.

- McFarland, B. J., Seidler, F. J. y Slotkin, T. A. (1991). Inhibition of DNA synthesis in neonatal rat brain regions caused by acute nicotine administration. *Brain Research Developmental Brain Research*, 58, 223-229.
- McKay, L. C., Janczewski, W. A. y Feldman, J. L. (2005). Sleep-disordered breathing after targeted ablation of preBotzinger complex neurons. *Nature Neuroscience*, 8, 1142-1144.
- Meyer, T., Hoch, B. y Ballanyi, K. (1998). Prostaglandin mediation of apnea in preterm infants and neonatal rats. *European Journal of Neuroscience*, 10, 5-16.
- Meyer, T., Hoch, B. y Ballanyi, K. (1999). Endogenous frequency depression of the isolated respiratory network of fetal rats. *European Journal of Physiology*, 437, 31-36.
- Meyrand, P., Simmers, J. y Moulins, M. (1991). Construction of a pattern generating circuit with neurons of different networks. *Nature*, 351, 60-63.
- Mironov, S. L., Langohr, K. y Richter, D. W. (1999). A1 adenosine receptors modulate respiratory activity of the neonatal mouse via the cAMP-mediated signalling pathway. *Journal of Neurophysiology*, 81, 247-255.
- Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M. y Caron, M. G. (1998). Dopamine receptors: from structure to function. *Physiological Reviews*, 78, 189-225.
- Mitchell, E. A., Scragg, L. y Clements, M. (1996). Soft cot mattresses and the sudden infant death syndrome. *New Zealand Medical Journal*, 109, 206-207.
- Mitchell, E. A., Thach, B. T., Thompson, J. M. y Williams, S. (1999). Changing infants' sleep position increases risk of sudden infant death syndrome. New Zealand Cot Death Study. *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine*, 153, 1136-1141.
- Montague, C. T., Farooqi, I. S., Whitehead, J. P., Soos, M. A., Rau, H., Wareham, N. J., Sewter, C. P., Digby, J. E., Mohammed, S. N., Hurst, J. A., Cheetham, C. H., Earley, A. R., Barnett, A. H., Prins, J. B. y O'Rahilly, S. (1997). Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*, 387, 903-908.
- Morin-Surun, M. P., Boudinot, E., Dubois, C., Matthes, H. W., Kieffer, B. L., Denavit-Saubié, M., Champagnat, J. y Foutz, A. S. (2001). Respiratory function in adult mice lacking the mu-opioid receptor: role of delta-receptors. *European Journal of Neuroscience*, 13, 1703-1710.
- Morin-Surun, M. P., Boudinot, E., Gacel, G., Champagnat, J., Roques, B. P. y Denavit-Saubié, M. (1984). Different effects of mu and delta opiate agonists on respiration. *European Journal of Pharmacology*, 98, 235-240.

- Morton, R. E., Bonas, R., Minford, J., Tarrant, S. C. y Ellis, R. E. (1997). Respiration patterns during feeding in Rett syndrome. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 39, 607-613.
- Moseley, A. E., Lieske, S. P., Wetzell, R. K., James, P. F., He, S., Shelly, D. A., Paul, R. J., Boivin, G. P., Witte, D. P., Ramirez, J. M., Sweadner, K. J. y Lingrel, J. B. (2003). The Na,K-ATPase alpha 2 isoform is expressed in neurons, and its absence disrupts neuronal activity in newborn mice. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 5317-5324.
- Murakoshi, T., Suzue, T. y Tamai, S. (1985). A pharmacological study on respiratory rhythm in the isolated brainstem-spinal cord preparation of the newborn rat. *British Journal of Pharmacology*, 86, 95-104.
- Nantwi, K. D. y Goshgarian, H. G. (2002). Actions of specific adenosine receptor A1 and A2 antagonists in recovery of phrenic motor output following upper cervical spinal cord injury in adult rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 29, 915-923.
- Neubauer, J. A. (2001). Physiological and pathophysiological responses to intermittent hypoxia. *Journal of Applied Physiology*, 90, 1593-1599.
- Neubauer, J. A., Melton, J. E. y Edelman, N. H. (1990). Modulation of respiration during brain hypoxia. *Journal of Applied Physiology*, 68, 441-451.
- Neubauer, J. A. y Sunderram, J. (1996). Oxygen-sensing neurons in the central nervous system. *Journal of Applied Physiology*, 96, 367-374.
- Nielsen, J. B., Lou, H. C. y Andresen, J. (1990). Biochemical and clinical effects of tyrosine and tryptophan in the Rett syndrome. *Brain and Development*, 12, 143-147.
- Nomura, Y., Segawa, M. e Higurashi, M. (1985). Rett syndrome—an early catecholamine and indolamine deficient disorder?. *Brain and Development*, 7, 334-341.
- Nsegbe, E., Wallén-Mackenzie, A., Dauger, S., Roux, J. C., Shvarev, Y., Lagercrantz, H., Perlmann, T. y Herlenius, E. (2004). Congenital hypoventilation and impaired hypoxic response in Nurr1 mutant mice. *Journal of Physiology*, 556, 43-59.
- O'Donnell, C. P., Schaub, C. D., Haines, A. S., Berkowitz, D. E., Tankersley, C. G., Schwartz, A. R. y Smith, P. L. (1999). Leptin prevents respiratory depression in obesity. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 159, 1477-1484.
- Ogilvie, M. D., Gottschalk, A., Anders, K., Richter, D. W. y Pack, A. I. (1992). A network model of respiratory rhythmogenesis. *American Journal of Physiology*, 263, 962-975.

- Olin, B. R., Hebel, S. K. y Dewein, A. C. (1995). Drug Facts and Comparisons. St Louis, MO: Facts and Comparisons.
- Olson, E. B. (1987). Naloxone accelerates the rate of ventilatory acclimatization to hypoxia in awake rats. *Life Sciences*, *41*, 161-167.
- Olson, A. L. y Zwillich, C. (2005). The obesity hypoventilation syndrome. *American Journal of Medicine*, *118*, 948-956.
- Onimaru, H., Arata, A. y Homma, I. (1988). Primary respiratory rhythm generator in the medulla of brainstem-spinal cord preparation from newborn rat. *Brain Research*, *445*, 314-324.
- Onimaru, H., Arata, A. y Homma, I. (1990). Inhibitory synaptic inputs to the respiratory rhythm generator in the medulla isolated from newborn rats. *Pflügers Archives-European Journal of Physiology*, *417*, 425-432.
- Onimaru, H. y Homma, I. (2003). A novel functional neuron group for respiratory rhythm generation in the ventral medulla. *Journal of Neuroscience*, *23*, 1478-1486.
- Onimaru, H. y Homma, I. (2005). Developmental changes in the spatio-temporal pattern of respiratory neuron activity in the medulla of late fetal rat. *Neuroscience*, *131*, 969-977.
- Opdal, S. H. y Rognum, T. O. (2004). New insight into sudden infant-death syndrome. *Lancet*, *364*, 825-826.
- Oyen, N., Markestad, T., Skaerven, R., Irgens, L. M., Helweg-Larsen, K., Alm, B., Norvenius, G. y Wennergren, G. (1997). Combined effects of sleeping position and prenatal risk factors in sudden infant death syndrome: the Nordic Epidemiological SIDS Study. *Pediatrics*, *100*, 613-621.
- Pagliardini, S., Ren, J. y Greer, J. J. (2003). Ontogeny of the pre-Botzinger complex in perinatal rats. *Journal of Neuroscience*, *23*, 9575-9584.
- Paluszynska, D. A., Harris, K. A. y Thach, B. T. (2004). Influence of sleep position experience on ability of prone-sleeping infants to escape from asphyxiating microenvironments by changing head position. *Pediatrics*, *114*, 1634-1639.
- Pantaleo, T., Bongianni, F. y Mutolo, D. (2005). Central nervous mechanisms in the generation of the pattern of breathing. *Archives Italiennes de Biologie*, *143*, 207-214.
- Partridge, L. D., Swandulla, D. y Muller, T. H. (1990). Modulation of calcium-activated non-specific cation currents by cyclic AMP-dependent phosphorylation in neurons of Helix. *Journal of Physiology*, *429*, 131-145.

- Paton, J. F. (1996). A working heart-brainstem preparation of the mouse. *Journal of Neuroscience Methods*, 65, 63-68.
- Paton, J. F., Abdala, A. P., Koizumi, H., Smith, J. C. y St-John, W. M. (2006). Respiratory rhythm generation during gasping depends on persistent sodium current. *Nature Neuroscience*, 9, 311-313.
- Paton, J. F. y St-John, W. M. (2005). Long-term intracellular recordings of respiratory neuronal activities in situ during eupnea, gasping and blockade of synaptic transmission. *Journal of Neuroscience Methods*, 147, 138-145.
- Pauly, J. R., Marks, M. J., Gross, S. D. y Collins, A. C. (1991). An autoradiographic analysis of cholinergic receptors in mouse brain after chronic nicotine treatment. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 258, 1127-1136.
- Peña, F. y Aguilera, M. A. (2007). Effects of riluzole and flufenamic acid on eupnea and gasping of neonatal mice in vivo. *Neuroscience Letters*, 415, 288-293.
- Peña, F. y Garcia, O. (2006). Breathing generation and potential pharmacotherapeutic approaches to central respiratory disorders. *Current Medicinal Chemistry*, 13, 2681-2693.
- Peña, F., Parkis, M. A., Tryba, A. K. y Ramirez, J. M. (2004). Differential contribution of pacemaker properties to the generation of respiratory rhythms during normoxia and hypoxia. *Neuron*, 43, 105-117.
- Peña, F. y Ramirez, J. M. (2002). Endogenous activation of serotonin-2A receptors is required for respiratory rhythm generation in vitro. *Journal of Neuroscience*, 22, 11055-11064.
- Peña, F. y Ramirez, J. M. (2005). Hypoxia-induced changes in neuronal network properties. *Molecular Neurobiology*, 32, 251-283.
- Perkin, R. M. y Resnik, D. B. (2002). The agony of agonal respiration: is the last gasp necessary?. *Journal of Medical Ethics*, 28, 164-169.
- Pierrefiche, O., Schwarzacher, S. W., Bischoff, A. M. y Richter, D. W. (1998). Blockade of synaptic inhibition within the pre-Botzinger complex in the cat suppresses respiratory rhythm generation in vivo. *Journal of Physiology*, 509, 245-254.
- Pisani, A., Calabresi, P. y Bernardi, G. (1997). Hypoxia in striatal and cortical neurones: membrane potential and Ca²⁺ measurements. *NeuroReport*, 8, 1143-1147.
- Pittman, A. M., Woodley, M. y Whelan, A. (1993). *Patient care in internal medicine*. Boston, MA: Little, Brown and Company. pp:1-20.

- Poets, C. F., Meny, R. G., Chobanian, M. R. y Bonofiglio, R. E. (1999). Gasping and other cardiorespiratory patterns during sudden infant deaths. *Pediatric Research*, 45, 350-354.
- Price, C. J., Kim, P. y Raymond, L. A. (1999). D1 dopamine receptor-induced cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation and potentiation of striatal glutamate receptors. *Journal of Neurochemistry*, 73, 2441-2446.
- Raineteau, O. y Schwab, M. E. (2001). Plasticity of motor systems after incomplete spinal cord injury. *Nature Reviews Neuroscience*, 2, 263-273.
- Ramirez, J. M. (1998). Reconfiguration of the respiratory network at the onset of locust flight. *Journal of Neurophysiology*, 80, 3137-3147.
- Ramirez, J. M., Folkow, L. P. y Blix, A. S. (2007). Hypoxia tolerance in mammals and birds: from the wilderness to the clinic. *Annual Review of Physiology*, 69, 113-43.
- Ramirez, J. M., Quellmalz, U. J. y Richter, D. W. (1996). Postnatal changes in the mammalian respiratory network as revealed by the transverse brainstem slice of mice. *Journal of Physiology*, 491, 799-812.
- Ramirez, J.M., Quellmalz, U. J. A. y Wilken, B. (1997). Developmental changes in the hypoxic response of the hypoglossus respiratory motor output in vitro. *Journal of Neurophysiology*, 78, 383-392.
- Ramirez, J.M., Quellmalz, U. J., Wilken, B. y Richter, D. W. (1998b). The hypoxic response of neurons within the in Vitro mammalian respiratory network. *Journal of Physiology*, 507, 571-582.
- Ramirez, J. M., Schwarzacher, S. W., Pierrefiche, O., Olivera, B. M. y Richter, D. W. (1998a). Selective lesioning of the cat pre-Bötzinger complex in vivo eliminates breathing but not gasping. *Journal of Physiology*, 507, 895-907.
- Ramirez, J. M., Tryba, A. K. y Peña, F. (2004). Pacemaker neurons and neuronal networks: an integrative view. *Current Opinion in Neurobiology*, 14, 665-674.
- Reed, D. J. y Kellogg, R. H. (1960). Effect of sleep on hypoxic stimulation of breathing at sea level and altitude. *Journal of Applied Physiology*, 15, 1130-1134.
- Reisner-Keller, L. A., Hefindal, E. T., Gourey, D. R. y Hart, L. L. (1992). *Clinical Pharmacy and Therapeutics*. Baltimore, MD: Williams and Wilkins. pp. 879-903.
- Rekling, J. C. y Feldman, J. L. (1998). PreBötzinger Complex and Pacemaker Neurons: Hypothesized Site and Kernel for Respiratory Rhythm Generation. *Annual Review of Physiology*, 60, 385-405.

- Rett, A. (1966). On a unusual brain atrophy syndrome in hyperammonemia in childhood. *Wien Med Wochenschr*, 116, 723-726.
- Richerson, G. B. y Getting, P. A. (1987). Maintenance of complex neural function during perfusion of the mammalian brain. *Brain Research*, 409, 128-132.
- Richerson, G. B., y Getting, P. A. (1990). Preservation of integrative function in a perfused guinea pig brain. *Brain Research*, 517, 7-18.
- Richter, D. W. (1982). Generation and maintenance of the respiratory rhythm. *Journal of Experimental Biology*, 100, 93-107.
- Richter, D. W., Ballanyi, K. y Schwarzacher, S. (1992). Mechanisms of respiratory rhythm generation. *Current Opinion in Neurobiology*, 2, 788-793.
- Richter, D. W., Bischoff, A., Anders, K., Bellingham, M. y Windhorst, U. (1991). Response of the medullary respiratory network of the cat to hypoxia. *Journal of Physiology*, 443, 231-56.
- Richter, D. W., Heyde, F. y Gabriel, M. (1975). Intracellular recordings from different types of medullary respiratory neurons of the cat. *Journal of Neurophysiology*, 38, 1162-1171.
- Richter, D. W., Lalley, P. M., Pierrefiche, O., Aji, A., Bischoff, A. M., Wilken, B. y Hanefeld, V. (1997). Intracellular signal pathways controlling respiratory neurons. *Respiratory Physiology*, 110, 113-123.
- Richter, D. W. y Spyer, K. M. (2001). Studying rhythmogenesis of breathing: comparison of in vivo and in vitro models. *Trends in Neurosciences*, 24, 464-472.
- Riederer, P., Weiser, M., Wichart, I., Schmidt, B., Killian, W. y Rett, A. (1986). Preliminary brain autopsy findings in prodromic Rett syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, 25, 305-315.
- Robinson, D. M., Peebles, K. C., Kwok, H., Adams, B. M., Clarke, L. L., Woollard, G. A. y Funk, G. D. (2002). Prenatal nicotine exposure increases apnoea and reduces nicotinic potentiation of hypoglossal inspiratory output in mice. *Journal of Physiology*, 538, 957-973.
- Rodman, J. R., Harris, M. B., Rudkin, A. H., St-John, W. M. y Leiter, J. C. (2006). Gap junction blockade does not alter eupnea or gasping in the juvenile rat. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 152, 51-60.
- Sakai, K., Takada, T., Nakayama, H., Kubota, Y., Nakamata, M., Satoh, M., Suzuki, E., Akazawa, K. y Gejyo, F. (2005). Serotonin-2A and 2C receptor gene polymorphisms in Japanese patients with obstructive sleep apnea. *Internal Medicine*, 44, 928-933.

- Schroeder, J. E., Fischbach, P. S., Zheng, D. y McCleskey, E. W. (1991). Activation of mu opioid receptors inhibits transient high- and low-threshold Ca²⁺ currents, but spares a sustained current. *Neuron*, 6, 13-20.
- Seamon K. B., Padgett W. y Daly J. W. (1981). Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78, 3363-3367.
- Segawa, M. (1997). Pathophysiology of Rett syndrome from the standpoint of early catecholamine disturbance. *European Child and Adolescent Psychiatry*, 6, 56-60.
- Shao, X. M. y Feldman, J. L. (1997). Respiratory rhythm generation and synaptic inhibition of expiratory neurons in pre-Bötzinger complex: differential roles of glycinergic and GABAergic neural transmission. *Journal of Neurophysiology*, 77, 1853-1860.
- Shao, X. M. y Feldman, J. L. (2001). Mechanisms underlying regulation of respiratory pattern by nicotine in preBötzinger complex. *Journal of Neurophysiology*, 85, 2461-2467.
- Shen, L. y Duffin, J. (2002). Caudal expiratory neurons in the rat. *Pflügers Archives-European Journal of Physiology*, 444, 405-410.
- Shirasawa, S., Arata, A., Onimaru, H., Roth, K. A., Brown, G. A., Horning, S., Arata, S., Okumura, K., Sasazuki, T. y Korsmeyer, S. J. (2000). Rnx deficiency results in congenital central hypoventilation. *Nature Genetics*, 24, 287-290.
- Shook, J. E., Watkins, W. D. y Camporesi, E. M. (1990). Differential roles of opioid receptors in respiration, respiratory disease, and opiate-induced respiratory depression. *American Review of Respiratory Disease*, 142, 895-909.
- Sievert, M. K., Pilli, G., Liu, Y., Sutkowski, E. M., Seamon, K. B. y Ruoho, A. E. (2002). Photoaffinity labeling of adenylyl cyclase. *Methods in Enzymology*, 345, 188-197.
- Slotkin, T. A., Epps, T. A., Stenger, M. L., Sawyer, K. J. y Seidler, F. J. (1999). Cholinergic receptors in heart and brainstem of rats exposed to nicotine during development: implications for hypoxia tolerance and perinatal mortality. *Brain Research Developmental Brain Research*, 113, 1-12.
- Slotkin, T. A., Saleh, J. L., McCook, E. C. y Seidler, F. J. (1997). Impaired cardiac function during postnatal hypoxia in rats exposed to nicotine prenatally: implications for perinatal morbidity and mortality, and for sudden infant death syndrome. *Teratology*, 55, 177-184.
- Smith, J. C., Butera, R. J., Koshiya, N., Del Negro, C. A., Wilson, C. G. y Johnson, S. M. (2000). Respiratory rhythm generation in neonatal and adult mammals: the hybrid pacemaker-network model. *Respiratory Physiology*, 122, 131-147

- Smith, J. C., Ellenberger, H. H., Ballanyi, K., Richter, D. W. y Feldman, J. L. (1991). Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science*, 254, 726-729.
- Smith, D. O., Lowe, D., Temkin, R., Jensen, P. y Hatt, H. (1995). Dopamine enhances glutamate-activated currents in spinal motoneurons. *Journal of Neuroscience*, 15, 3905-3912.
- Solomon, I. C., Edelman, N. H. y Neubauer, J. A. (1999). Patterns of phrenic motor output evoked by chemical stimulation of neurons located in the pre-Bötzinger complex in vivo. *Journal of Neurophysiology*, 81, 1150-1161.
- Solomon, I. C., Edelman, N. H. y Neubauer, J. A. (2000). Pre-Bötzinger complex functions as a central hypoxia chemosensor for respiration in vivo. *Journal of Neurophysiology*, 83, 2854-2868.
- Sridhar, R., Thach, B. T., Kelly, D. H. y Henslee, J. A. (2003). Characterization of successful and failed autoresuscitation in human infants, including those dying of SIDS. *Pediatric Pulmonology*, 36, 113-122.
- St John, W. M. (1990). Neurogenesis, control, and functional significance of gasping. *Journal of Applied Physiology*, 68, 1305-1315.
- St John, W. M. (1996). Medullary regions for neurogenesis of gasping: noeud vital or noeuds vitaux?. *Journal of Applied Physiology*, 81, 1865-1877.
- Stoltenberg, L., Sundar, T., Almaas, R., Storm, H., Rognum, T. O. y Saugstad, O. D. (1994). Changes in apnea and autoresuscitation in piglets after intravenous and intrathecal interleukin-1 beta injection. *Journal of Perinatal Medicine*, 22, 421-432.
- Summers, A. M., Summers, C. W., Drucker, D. B., Hajeer, A. H., Barson, A. y Hutchinson, I. V. (2000). Association of IL-10 genotype with sudden infant death syndrome. *Human Immunology*, 61, 1270-1273.
- Suzue, T. (1984). Respiratory rhythm generation in the in vitro brain stem-spinal cord preparation of the neonatal rat. *Journal of Physiology*, 354, 173-183.
- Takita, K., Herlenius, E. A., Lindahl, S. G. y Yamamoto, Y. (1997). Actions of opioids on respiratory activity via activation of brainstem mu-,delta- and kappa-receptors; an in Vitro study. *Brain Research*, 778, 233-241.
- Takita, K., Herlenius, E., Yamamoto, Y. y Lindahl, S. G. (2000). Effects of neuroactive substances on the morphine-induced respiratory depression; an in vitro study. *Brain Research*, 884, 201-205.

- Tanabe, A., Fuji, T. y Onimaru, H. (2005). Facilitation of respiratory rhythm by a mu-opioid agonist in newborn rat pons-medulla-spinal cord preparations. *Neuroscience Letters*, 375, 19-22.
- Taylor, P. M. (1960). Oxygen consumption in new-born rats. *Journal of Physiology*, 154, 153-168.
- Telgkamp, P. y Ramirez, J. M. (1999). Differential responses of respiratory nuclei to anoxia in rhythmic brain stem slices of mice. *Journal of Neurophysiology*, 82, 2163-2170.
- Thoby-Brisson, M. y Ramirez, J. M. (2000). Role of inspiratory pacemaker neurons in mediating the hypoxic response of the respiratory network in vitro. *Journal of Neuroscience*, 20, 5858-5866.
- Timmons, B. H. y Ley, R. (1994). *Behavioral and psychological approaches to breathing disorders*. New York, N.Y.: Springer.
- Tryba, A. K., Peña, F. y Ramirez, J. M. (2003). Stabilization of bursting in respiratory pacemaker neurons. *Journal of Neuroscience*, 23, 3538-3546.
- Tryba, A. K., Peña, F. y Ramirez, J. M. (2006). Gasping activity in Vitro: a rhythm dependent on 5-HT_{2A} receptors. *Journal of Neuroscience*, 26, 2623-2634.
- Tryba, A. K. y Ramirez, J. M. (2004). Hyperthermia modulates respiratory pacemaker bursting properties. *Journal of Neurophysiology*, 92, 2844-2852.
- Uhlen, S. y Wikberg, J. E. (1988). Inhibition of cyclic AMP production by alpha 2-adrenoceptor stimulation in the guinea-pig spinal cord slices. *Pharmacology and Toxicology*, 63, 178-182.
- Van den Veyver, I. B. y Zoghbi, H. Y. (2000). Methyl-CpG-binding protein 2 mutations in Rett syndrome. *Current Opinion in Genetics and Development*, 10, 275-279.
- Veasey, S. C. (2003). Serotonin agonists and antagonists in obstructive sleep apnea: therapeutic potential. *American Journal of Respiratory Medicine*, 2, 21-29.
- Viemari, J. C., Roux, J. C., Tryba, A. K., Saywell, V., Burnet, H., Peña, F., Zanella, S., Bévençut, M., Barthelemy-Reguin, M., Herzing, L. B., Moncla, A., Mancini, J., Ramirez, J. M., Villard, L. y Hilaire, G. (2005). Mecp2 deficiency disrupts norepinephrine and respiratory systems in mice. *Journal of Neuroscience*, 25, 11521-11530.
- Wang, W., Fung, M. L. y St John, W. M. (1993). Pontile regulation of ventilatory activity in the adult rat. *Journal of Applied Physiology*, 74, 2801-2811.

- Weese-Mayer, D. E., Berry-Kravis, E. M., Maher, B. S., Silvestri, J. M., Curran, M. E. y Marazita, M. L. (2003). Sudden infant death syndrome: association with a promoter polymorphism of the serotonin transporter gene. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 117, 268-274.
- Weese-Mayer, D. E., Shannon, D. C., Keens, T. G. y Silvestri, J. M. (1999). Idiopathic congenital central hypoventilation syndrome: diagnosis and management. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 160, 368-373.
- Wenninger, J. M., Pan, L. G., Klum, L., Leekley, T., Bastastic, J., Hodges, M. R., Feroah, T., Davis, S. y Forster, H. V. (2004a). Small reduction of neurokinin-1 receptor-expressing neurons in the pre-Bötzinger complex area induces abnormal breathing periods in awake goats. *Journal of Applied Physiology*, 97, 1620-1628.
- Wenninger, J. M., Pan, L. G., Klum, L., Leekley, T., Bastastic, J., Hodges, M. R., Feroah, T. R., Davis, S. y Forster, H. V. (2004b). Large lesions in the pre-Bötzinger complex area eliminate eupneic respiratory rhythm in awake goats. *Journal of Applied Physiology*, 97, 1629-1636.
- Williams, J. T., North, R. A. y Tokimasa, T. (1988). Inward rectification of resting and opiate-activated potassium currents in rat locus coeruleus neurons. *Journal of Neuroscience*, 8, 4299-4306.
- Willinger, M., James, L. S. y Catz, C. (1991). Defining the sudden infant death syndrome (SIDS): deliberations of an expert panel convened by the National Institute of Child Health and Human Development. *Pediatric Pathology*, 11, 677-684.
- Wilson, C. G., Martin, R. J., Jaber, M., Abu-Shaweesh, J., Jafri, A., Haxhiu, M. A. y Zaidi, S. (2004). Adenosine A2A receptors interact with GABAergic pathways to modulate respiration in neonatal piglets. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 141, 201-211.
- Wimpey, T. L. y Chavkin, C. (1991). Opioids activate both an inward rectifier and a novel voltage-gated potassium conductance in the hippocampal formation. *Neuron*, 6, 281-289.
- Woodyatt, G. C. y Murdoch, B. E. (1996). The effect of the presentation of visual and auditory stimuli on the breathing patterns of two girls with Rett syndrome. *Journal of Intellectual Disability Research*, 40, 252-259.
- Xie, C. W. y Lewis, D. V. (1997). Involvement of cAMP-dependent protein kinase in mu-opioid modulation of NMDA-mediated synaptic currents. *Journal of Neurophysiology*, 78, 759-766.
- Xu, L., Sapolsky, R. M. y Giffard, R. G. (2001). Differential sensitivity of murine astrocytes and neurons from different brain regions to injury. *Experimental Neurology*, 169, 416-424.

- Yamamoto, Y., Onimaru, H. y Homma, I. (1992). Effect of substance P on respiratory rhythm and pre-inspiratory neurons in the ventrolateral structure of rostral medulla oblongata: an in Vitro study. *Brain Research*, 599, 272-276.
- Yamamoto, Y., Runold, M., Prabhakar, N., Pantaleo, T. y Lagercrantz, H. (1988). Somatostatin in the control of respiration. *Acta Physiologica Scandinavica*, 134, 529-533.
- Younes, M., Ostrowski, M., Thompson, W., Leslie, C. y Shewchuk, W. (2001). Chemical control stability in patients with obstructive sleep apnea. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 163, 1181-1190.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. y Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372, 425-432.
- Zhou, S. Y., Basura, G. J. y Goshgarian, H. G. (2001). Serotonin(2) receptors mediate respiratory recovery after cervical spinal cord hemisection in adult rats. *Journal of Applied Physiology*, 91, 2665-2673.
- Zhou, S. Y. y Goshgarian, H. G. (2000). 5-hydroxytryptophan-induced respiratory recovery alter cervical spinal cord hemisection. *Journal of Applied Physiology*, 89, 1528-1536.
- Zimmer, M. B. y Goshgarian, H. G. (2005). Spontaneous crossed phrenic activity in the neonatal respiratory network. *Experimental Neurology*, 194, 530-540.
- Zoghbi, H. Y., Milstien, S., Butler, I. J., Smith, E. O., Kaufman, S., Glaze, D. G. y Percy, A. K. (1989). Cerebrospinal fluid biogenic amines and biopterin in Rett syndrome. *Annals of Neurology*, 25, 56-60.
- Zoghbi, H. Y., Percy, A. K., Glaze, D. G., Butler, I. J. y Riccardi, V. M. (1985). Reduction of biogenic amine levels in the Rett syndrome. *New England Journal of Medicine*, 313, 921-924.