



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS MEDICAS



Evaluación *in machina* de los efectos de las benzodiazepinas y ketamina de uso anestésico clínico sobre descargas neuronales individuales y actividad sináptica de los núcleos de control respiratorio del tallo cerebral

Doctorando: Harold Martínez Reyes.

Tutor: Dr. Antonio Eblen-Zajjur.

BÁRBULA, JUNIO 2023



ACTA DE DISCUSIÓN DE TESIS DOCTORAL

En atención a lo dispuesto en los Artículos 145, 147, 148 y 149 del Reglamento de Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo, quienes suscribimos como Jurado designado por el Consejo de la Facultad de Ciencias de la Salud, de acuerdo a lo previsto en el Artículo 146 del citado Reglamento, para estudiar la Tesis Doctoral titulada:

EVALUACIÓN IN MACHINA DE LOS EFECTOS DE LAS BENZODIACEPINAS Y KETAMINA DE USO ANESTÉSICO CLÍNICO SOBRE DESCARGAS NEURONALES INDIVIDUALES Y ACTIVIDAD SINÁPTICA DE LOS NÚCLEOS DE CONTROL RESPIRATORIO DEL TALLO CEREBRAL

Presentada para optar al grado de **Doctor en Ciencias Médicas** por el (la) aspirante:

MARTINEZ R., HAROLD L.
C.I. V- 6431051

Habiendo examinado el Trabajo presentado, bajo la tutoría del profesor(a): Antonio Eblen C.I. 12030014, decidimos que el mismo está **APROBADO**.

Acta que se expide en valencia, en fecha: **05/06/2023**

Dr. (a) Darío Saturno (Presidente)

Antonio Eblen
Dr. (a) Antonio Eblen
C.I. 12.030.014
Fecha 05/06/2023



Ezequiel Uribe
Dr. (a) Ezequiel Uribe
C.I. 16.501.915
Fecha 05/06/2023

Renny Pacheco
Dr. (a) Renny Pacheco
C.I. 14721733
Fecha 05/06/2023

Miguel López
Dr. (a) Miguel López
C.I. 5.373900
Fecha 05/06/2023

TG-CS:14-23



AUTORIZACIÓN DEL TUTOR

Yo, **ANTONIO EBLEN-ZAJJUR** en mi carácter de Tutor del Trabajo de Doctoral titulado: **“Evaluación *in machina* de los efectos de las benzodiazepinas y ketamina de uso anestésico clínico sobre descargas neuronales individuales y actividad sináptica de los núcleos de control respiratorio del tallo cerebral”**

Presentado por el Ciudadano **HAROLD MARTINEZ REYES** Titular de la Cédula de Identidad **Nro. 6.431.051** Para optar al título de **DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS**, considero que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación pública y evaluación por parte de los miembros de la Comisión Coordinadora del Programa Doctoral y Comisión Evaluadora asignada.

En Bárbula, a los 11 días del mes de Mayo del año Dos Mil Veinte.

Prof. Dr. Antonio Eblen Zajjur

C.I. 12.030.014



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS



Evaluación *in machina* de los efectos de las benzodiazepinas y ketamina de uso anestésico clínico sobre descargas neuronales individuales y actividad sináptica de los núcleos de control respiratorio del tallo cerebral

Autor: Harold Martínez Reyes.

Tutor: Antonio Eblen Zajjur.

BÁRBULA, JUNIO 2023



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS



Evaluación *in machina* de los efectos de las benzodiazepinas y ketamina de uso anestésico clínico sobre descargas neuronales individuales y actividad sináptica de los núcleos de control respiratorio del tallo cerebral

Trabajo que se presenta ante la Comisión Coordinadora del Doctorado en Ciencias Médicas para su aprobación como Proyecto de Investigación conducente a Tesis Doctoral de la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo para optar al Título de

DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS

Autor: Harold Martínez Reyes.

Tutor: Antonio Eblen Zajjur.

BÁRBULA, JUNIO 2023

Agradecimientos

A mi Universidad de Carabobo, mi Alma Mater, que siempre llevare en mi corazón y con orgullo de ser Ucista la representare a donde quiera que vaya.

Al Centro de Biofísica y Neurociencia, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, a todo su personal de investigación, docente y administrativo, quienes me acogieron en su seno como uno más de la familia de la neurociencia, pero en especial a su fundador y director el **Dr. Antonio Eblen Zajjur**, mi tutor y mentor desde que era un simple estudiante de medicina en estas lides científicas, pero más que eso, amigo incondicional, quien puso su confianza en mí para este nuevo reto y con su tenacidad y apoyo el fin fue logrado.

A todos los profesores del Doctorado de Ciencias Médicas de la Universidad de Carabobo, por su excelente labor, esmero con que nos impartieron sus grandes conocimientos y alto nivel académico digno de un Doctorado de gran prestigio.

A mis compañeros de la V cohorte del Doctorado de Ciencias Médicas de la Universidad de Carabobo, orgulloso de cada uno de ustedes, por ese gran espíritu de solidaridad y compañerismo desinteresado.

A todos Muchas Gracias...

Dedicatoria

A Dios,

Creador supremo del universo a quien le debemos todo honor y toda honra.

A mis Padres: Juan y Cristina.

A quienes les debo la vida y lo que soy, fuente de ejemplo e inspiración.

A mi Esposa July,

Esa ayuda idónea que Dios me dio y quien ha estado siempre a mi lado es esos momentos difíciles sirviéndome de apoyo y en esos otros para compartir mis alegrías y triunfos.

A mis Hijos: Juleidy, Harold y Katherine

Por compartirme con mis estudios y profesión, por entender y aceptar mis ausencias como padre y que al final del día siempre me esperaban con su amor, ese amor que quita todo cansancio, y te da fuerzas para seguir adelante, quienes siempre estarán presentes en mi corazón todos los días de mi vida.

Sin la presencia de ustedes en mi vida, su apoyo y comprensión este nuevo logro académico no hubiese sido posible, a ustedes mi respeto y mi amor incondicional.

“El éxito se alcanza convirtiendo cada paso en una meta y cada meta en un paso”.

ÍNDICE

Acta de aprobacion.....	iii
Agradecimientos.....	vi
Dedicatoria	vii
ÍNDICE.....	viii
Resumen	xi
Summary.....	xiii
INTRODUCCION.....	1
CAPITULO I.....	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
FORMULACION DEL PROBLEMA	11
OBJETIVOS.....	8
OBJETIVO GENERAL	8
OBJETIVOS ESPECIFICOS	8
JUSTIFICACION.....	10
CAPITULO II.....	11
BASES TEÓRICAS	11

Regulación neuronal respiratoria.....	14
Etapas de la ritmogénesis respiratoria.	17
Modelo de mecanismos de reorganización de la generación del ritmo después de las transecciones del tallo cerebral.....	26
CAPITULO III	32
MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
Bases Epistemológicas	32
Población y muestra:	34
Diseño de la investigación.....	34
Efecto <i>in machina</i> de benzodiazepinas, barbitúricos, opioides y ketamina.	34
Descripción del modelo de neurona Pre-I del Pre-BötC:	35
Recolección de datos:	44
Estadística:	44
Financiamiento	45
Conflicto de Interés	45
CAPITULO IV	46
RESULTADOS	46
Efecto de dosis incrementales de agonistas GABA _A	47
Efecto de dosis incrementales de antagonista NMDA	51
Efectos de las benzodiazepinas y su termodependencia.....	54

Efecto de la ketamina y su termodependencia.....	64
CAPITULO V	77
DISCUSION.....	77
CONCLUSIONES.....	87
BIBLIOGRAFIA	89

Resumen

La respiración es un patrón, generado en la parte inferior del tallo cerebral. Los centros neuronales ponto-medulares respiratorios controlan este patrón sincronizando las descargas neuronales de las motoneuronas de las metámeras cervicales, toraco-lumbar y craneales, mostrando intensa interacción entre las neuronas inspiratorias del complejo pre Bötzing, donde la neurona Preinspiratoria (Pre-I) es el marcapaso principal y las espiratorias del complejo Bötzing los cuales forman el complejo generador central del patrón respiratorio. La red neuronal y los patrones de descarga de las neuronas inspiratorias son intensamente investigadas, así como la presencia de receptores GABA y de glutamato en sus membranas. Se hace necesario investigar el impacto de drogas de extenso uso clínico y anestésico como las benzodiacepinas y la ketamina en estas neuronas y receptores de membrana en varios escenarios frecuentes de temperatura corporal (35, 37 y 40°C) dada la termodependencia de estos efectos. **Materiales y Métodos:** Se generaron varios escenarios *in machina* utilizando el simulador electrofisiológico EOTN v.2014a emulando las descargas de la neurona Pre-I ante diversos niveles de actividad sináptica equivalentes a 60 hasta 160% para cada receptor GABA_A o NMDA y a diferentes temperaturas en rango clínico, evaluándose el número de potenciales de acción y su amplitud. **Resultados:** Se produce una disminución progresiva del número de espigas al aumentar la actividad GABA_A, en secuencia de intensidad: 35°C (-60,6%), 37°C (-27,2%) y 40°C (-5,8%). La amplitud de las espigas también se redujo siendo más variable e intensa a 40°C (-75%) que a 35°C (-33,7%) y 37°C (-7,4%). El antagonismo NMDA redujo menos intensamente el número de espigas siguiendo la secuencia: 35°C (-8,7%), 37°C (-7,2%) y 40°C (-3,9%) (p<0,01). La amplitud de las espigas también se redujo siendo más variable e intensa a 35°C (-9,6%), 37°C (-4,1%) (p<0,01) y sin cambios a 40°C. Las regresiones dosis-respuesta fueron no lineales para cada tipo de droga. Para todas las dosis equivalentes, se demostró la termodependencia al aumentar progresivamente del número y amplitud del potencial de acción con la temperatura. El agonismo GABA_A produce una disminución del número de espigas proporcional a la temperatura, manteniéndose éste en la medida que se aumentó el peso sináptico. La amplitud de las espigas aumentó según la actividad sináptica y la disminución de la temperatura. Al reducir la actividad sináptica de los receptores NMDA (Ketamina) se evidencia un aumento del número de espigas con el aumento de la temperatura, mientras que en hipotermia se observó un aumento de la amplitud de las espigas en todas las mediciones. El análisis de regresión polinomial entre el número de espigas y la actividad GABA_A mostró ajustes significativos para 37°C (p<0,01) y 35°C (p<0,02), no así para 40°C. No se encontró ajuste significativo para la amplitud de las espigas en ninguna de las tres temperaturas probadas. La regresión entre la actividad sináptica NMDA y el conteo de espigas fue significativa a 37 y 35°C (p<0,001) y para 40°C (p<0,03). La

regresión entre la amplitud de las espigas y la temperatura fue significativa a 37°C ($p < 0,03$) y 35°C ($p < 0,008$), pero no a 40°C. **CONCLUSION:** La temperatura modifica tanto la cantidad de espigas como la amplitud de éstas dependiente de la actividad sináptica GABA_A y NMDA. Los efectos son predecibles, los bloqueos de los receptores GABA_A por las benzodiazepinas, así como la ketamina para los NMDA. El bloqueo de la ketamina a la amplitud de las espigas no fue significativo a 40°C, lo que nos hace pensar que la entropía causada por el aumento de la temperatura puede ayudar a que se tenga una mejor respuesta por los receptores al bloqueo causado.

Palabras claves: Receptores neuronales, Benzodiazepinas, Ketamina, Centros Respiratorios, Complejo Pre-Bötzing.

Summary

Breathing is a pattern generated at the bottom of the brain stem. Ponto-medullary neural centers regulate the respiratory pattern by synchronizing the neuronal discharges of the motor neurons of cervical, thoraco-lumbar and cranial metamers, showing intense interaction between the inspiratory neurons of the pre Bötzing complex and the expiratory neurons of the Bötzing complex which form the central generator complex of the respiratory pattern. The neural network and discharge patterns of inspiratory neurons are intensively investigated, as well as the presence of GABA and glutamate receptors in their membranes. It is necessary to investigate the impact of drugs of extensive clinical use and anesthetics such as benzodiazepines and ketamine on these neurons and membrane receptors in several frequent scenarios of body temperature (35, 37 and 40°C) given the thermodependence of these neurons. **Materials and Methods:** Several *in machina* scenarios were generated using the EOTN v.2014a electrophysiological simulator, emulating the discharges of the Pre-I main pacemaker neuron from the Pre Bötzing complex, at various levels of synaptic activity equivalent to 60 to 160% for each receptor GABA_A or NMDA and at different temperatures in the clinical range, evaluating the number of action potentials and their amplitude. **Results:** A progressive decrease in the number of spikes occurs with increasing GABA_A activity, in sequence of intensity: 35°C (-60.6%), 37°C (-27.2%) and 40°C (-5.8 %). The amplitude of the spikes was also reduced, being more variable and intense at 40°C (-75%) than at 35°C (-33.7%) and 37°C (-7.4%). NMDA antagonism reduced the number of spikes less intensely following the sequence: 35°C (-8.7%), 37°C (-7.2%) and 40°C (-3.9%) (p<0,01). The amplitude of the spikes was also reduced, being more variable and intense at 35°C (-9.6%), 37°C (-4.1%) (p<0.01) and without changes at 40°C. Dose-response regressions were nonlinear for each drug type. For all equivalent doses, thermodependence was demonstrated by progressively increasing the number and amplitude of the action potential with temperature. GABA_A agonism produces a decrease in the number of spikes

proportional to temperature, maintaining this number as synaptic weight increases. Spike amplitude increased with synaptic activity and decreasing temperature. By reducing the synaptic activity of NMDA (Ketamine) receptors, an increase in the number of spikes is evident with increasing temperature, while in hypothermia an increase in the amplitude of the spikes was observed in all measurements. The polynomial regression analysis between the number of spikes and GABA_A activity showed significant adjustments for 37°C (p<0.01) and 35°C (p<0.02), but not for 40°C. No significant adjustment was found for spike width at any of the three temperatures tested. The regression between NMDA synaptic activity and spike count was significant at 37 and 35°C (p<0.001) and for 40°C (p<0.03). The regression between spike width and temperature was significant at 37°C (p<0.03) and 35°C (p<0.008), but not at 40°C. **CONCLUSION:** Temperature modifies both the number of spikes and their amplitude depending on the GABA_A and NMDA synaptic activity. The Effects GABA_A receptor blocks by benzodiazepines as well as ketamine for NMDAs are predictable. Ketamine blockade to the amplitude of the spikes was not significant at 40°C, which makes us think that entropy caused by the increase in temperature may help to have a better response by the receptors to the blockade caused.

Key Words: Neural Receptors, Benzodiazepines, Ketamine, Respiratory Centers, Pre-Bötzinger Complex.

INTRODUCCION

La ritmogénesis de la respiración es un proceso complejo que aún no se conoce del todo, es por ello que se realizan intensos estudios *in vivo* e *in vitro* para comprender los diferentes receptores de membrana, neuronas, núcleos y áreas del cerebro, así como sus patrones de descarga e interconexiones que permiten el control respiratorio. En los mamíferos, los centros de control respiratorio se encuentran en el tallo cerebral (1,2) distribuyéndose mayoritariamente en el puente y la médula ventrolateral. La red generadora del patrón rítmico respiratorio posee neuronas caracterizadas por diferentes patrones de descarga relativos al ciclo respiratorio, lo cual unido a sus propiedades biofísicas como canales iónicos, receptores de membrana, interacción sináptica, y proyecciones a otras regiones del cerebro ha permitido su clasificación fisiológica (1,2,3).

El ritmo respiratorio puede ser dividido en 3 etapas: la primera de inspiración (I), donde entran en funcionamiento los músculos inspiratorios (diafragma e intercostales), la segunda de inspiración - espiración (I-E) y la tercera de espiración activa (E) en la que entran en funcionamiento los músculos espiratorios abdominales. Todo este control viene dado por los centros respiratorios ponto-medulares, los cuales sincronizan las descargas neuronales de las motoneuronas cervicales y toraco-lumbares así como de las motoneuronas corticales, proceso en el que se ven involucrados diversos músculos como el diafragma, músculos intercostales, y los músculos del cuello, que hacen una válvula extraordinaria entre la vía aérea y la digestiva llevando a cabo numerosos desafíos fisiológicos como la fonación, deglución y vómito entre otros (1,4,5).

El sincronismo de la respiración viene dado por la interacción de las neuronas inspiratorias que se encuentran en el complejo nuclear pre-Bötzinger de la columna ventrolateral respiratoria medular (6,7). Las actividades inspiratorias y espiratorias producidas en estos generadores de ritmo respiratorio medular se modulan desde varios sitios del tronco encefálico inferior, incluidas la protuberancia (8) y las neuronas del complejo nuclear de Bötzinger que son principalmente de función espiratoria (3,9,10), quienes en conjunto forman el núcleo generador central del patrón respiratorio (11,12,13). Este núcleo es uno de los encargados de la generación y organización del patrón respiratorio, analizando muchos mecanismos mecano y quimiosensoriales, incluyendo los pulmonares, traqueobronquiales y carotídeos que proveen señales de retroalimentación que involucran la hemodinámica, el control respiratorio y función cardiovascular, así como las diferentes coordinaciones motoras compaginadas con la respiración (14).

Este centro puede ser objeto de alteraciones en su funcionamiento por efecto de drogas, alteraciones en la aferencia de la información mecano o quimiosensorial, infecciones virales o bacterianas localizadas en los pulmones o en el mismo sistema nervioso central alterando la interconexión de la red neuronal del centro respiratorio (15,16).

Conociendo los patrones de descarga, los parámetros sinápticos y de membrana, Ryback, *et al.* (17) y Smith, *et al.* (18) generaron modelos de las neuronas inspiratorias, reproduciendo los patrones de descarga de las diferentes células que componen la red de control respiratorio. Estos modelos surgidos a partir de datos experimentales *in vivo* e *in vitro* proponen varios circuitos neuronales

respiratorios de carácter dinámico dentro del tronco cerebral, siendo el circuito más relevante el encargado de generar el ritmo y patrón respiratorio localizado en la columna ventral respiratoria que incluye en sentido rostro-caudal, los complejos Bötzinger, Pre-Bötzinger (Pre-BötC), el grupo rostral ventral respiratorio y el grupo caudal ventral respiratorio.

Adicionalmente, se describe un núcleo central generador del patrón respiratorio que incluye un grupo neuronal con propiedad intrínseca excitatoria denominadas neuronas pre-inspiratorias (Pre- I) ubicadas en el Pre-BötC que son la mayor fuente de actividad inspiratoria de la red neuronal, y que estimulan a las neuronas pre-motoras del hipogloso y al grupo rostral ventral respiratorio a través de las neuronas Ramp-I. Este grupo de neuronas Pre-I del Pre-BötC comprenden neuronas excitatorias con membranas que expresan corrientes iónicas de sodio con propiedades de descarga endógena en salvas y con sinapsis auto-excitatorias que se activan con niveles relativamente bajos de excitabilidad neuronal (19,20), las cuales interactúan con un anillo de tres poblaciones neuronales mutuamente inhibitorias: la post-inspiratoria (Post-I), la aumento-espíratória (Aug-E) ubicadas en el complejo Bötzinger, y la temprano-inspiratoria (Early-I) del Pre-BötC (19,21).

Los modelos de redes respiratorias de Ryback, *et al.* (17) y Smith, *et al.* (18) utilizan neuronas como compartimientos de Hodgkin–Huxley, cuyos parámetros biofísicos, cinética de canales iónicos y conductancias sinápticas han sido obtenidas en experimentos *in vitro* descritos por diferentes autores en neuronas de los centros respiratorios (11,17,22,23) y que incluyen receptores de membrana tanto ionotrópicos como metabotrópicos (17,18). Los receptores GABA_A (canal

inhibitorio de cloruro activado por el ácido γ -amino-butírico) y los receptores NMDA (n-metil-D-aspartato) que son canales excitatorios de sodio y calcio activados por glutamato, están presentes en alta densidad en las membranas neuronales de los núcleos de control respiratorio del tallo cerebral (22,23,24), mostrando además elevados valores de termodependencia con coeficientes de Arrhenius (Q_{10}) superiores a 2 (25).

En el campo clínico médico y más específicamente en la anestesiología, el uso de drogas anestésicas durante las intervenciones quirúrgicas como las benzodiazepinas, barbitúricos, opioides y ketamina entre otros, son de uso rutinario, y su mecanismo de acción tiene como blanco farmacológico los receptores GABA_A de los tres primeros o NMDA en el caso de la ketamina (22,23,26). Por lo anteriormente expuesto, surge la inquietud por saber el efecto de éstas drogas sobre los centros de control respiratorio y en especial sobre el centro principal de generación del patrón respiratorio. La comprensión de estos efectos permitiría la detección temprana y el tratamiento de uno de los eventos más temidos dentro y fuera de quirófano como lo es la depresión respiratoria asociada a estos medicamentos (27,28,29,30).

En los albores de la anestesiología, a finales del siglo XII fecha en que fue descubierto el *Vitriolo dulce* que más tarde en 1730 fuera bautizado como *éter*, que en griego significa “Cielo” (31), se ha estado buscando la mejor forma de monitorear a los pacientes bajo anestesia y minimizar así los riesgos que implica el uso de drogas que modifican los estados de conciencia y en especial los que pueden alterar el control respiratorio o llegar a causar la depresión respiratoria.

Con el advenimiento de nuevas drogas y de nuevas técnicas anestésicas también se ha tenido que desarrollar diferentes métodos para monitorear el efecto de esas drogas anestésicas sobre el organismo humano, creando así diferentes escalas y rangos de valores de los signos evaluados en los pacientes sometidos a una cirugía.

El desarrollo informático en los últimos 20 años, la necesidad de reducir costos en los diseños de procesos médicos e industriales y la prueba rápida de modelos teóricos, han generado una rama de la bioinformática encargada de la producción de programas de simulación, que incorporando las ecuaciones matemáticas que describen un determinado modelo o proceso de interés, son capaces de reproducir, interpolar o extrapolar el desempeño de dicho modelo con alta fidelidad a la realidad, aportando resultados gráficos y/o analíticos (32). Las ecuaciones utilizadas en los programas de simulación y que constituyen conceptos básicos, generales y/o fundamentales, provienen en su gran mayoría de los análisis de regresión multiparamétrica de datos reales obtenidos en experimentos, mediciones de campo o de procesos cuantitativos o semicuantitativos, lo que les confiere una validación intrínseca (33).

Al ser las ecuaciones de regresión del tipo multiparamétrico es posible modificar uno o varios de estos parámetros en la simulación y obtener así los resultados con los propósitos de comparación y progresión de escenarios diferentes (33,34,35).

En el presente estudio pondremos en práctica estos modelos matemáticos implementados en programas validados de simulación neuronal, los cuales son cada vez más usados en neurofisiología y neurofarmacología (35,36,37).

CAPITULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los más grandes retos a los que se enfrenta un anestesiólogo es el uso de drogas que actúan sobre el sistema nervioso central y periférico, lo cual modifica el patrón basal tanto respiratorio como hemodinámico del paciente durante el acto quirúrgico. Esto implica el adecuado conocimiento de la farmacocinética, farmacodinamia y la sinergia que pudiesen tener las diferentes drogas anestésicas durante la cirugía y en el período post operatorio. Es por ello que se utilizan diferentes tipos de monitoreo para vigilar el nivel anestésico al cual es sometido un paciente sin embargo, aún se desconocen muchos de los efectos de esas drogas anestésicas y más específicamente las de uso frecuente como benzodiazepinas, ketamina, opioides y barbitúricos sobre las diferentes neuronas y centros que controlan el automatismo respiratorio.

FORMULACION DEL PROBLEMA

¿Es factible conocer la acción de drogas como las benzodiazepinas, barbitúricos, opioides con acción agonista GABA_A o la ketamina como antagonista NMDA, sobre la principal neurona marcapaso generador del patrón respiratorio que explique la causa de la depresión respiratoria que producen dichos medicamentos?

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar *in machina* los efectos de las benzodiazepinas, opioides, barbitúricos como agonistas de los receptores GABA_A y de la ketamina como antagonista de receptores NMDA, y su termodependencia sobre las descargas de la neurona Pre-Inspiratoria (Pre I) del Pre-BötC de control respiratorio del tallo cerebral.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Generar un modelo *in machina* de neurona Pre-I del Pre-BötC que posea las corrientes iónicas específicas y patrones de descarga similares a los reportados en registros *in vivo*.
2. Determinar *in machina* el efecto de las benzodiazepinas, opioides y barbitúricos en su acción agonista de los receptores GABA_A sobre el número y amplitud de las descargas de la neurona Pre-I del Pre-BötC.
3. Determinar *in machina* la curva dosis-respuesta de las benzodiazepinas, opioides y barbitúricos en su acción agonista de los receptores GABA_A sobre el número y amplitud de las descargas de la neurona Pre-I del Pre-BötC.

4. Determinar *in machina* el efecto de la ketamina en su acción antagonista de los receptores NMDA sobre el número y amplitud de las descargas de la neurona Pre-I del Pre-BötC.
5. Determinar *in machina* la curva dosis-respuesta de la ketamina en su acción antagonista de los receptores NMDA sobre el número y amplitud de las descargas de la neurona Pre-I del Pre-BötC.
6. Determinar *in machina* la termodependencia en el rango 35 a 40°C del efecto de las benzodiazepinas, opioides y barbitúricos en su acción agonista de los receptores GABA_A sobre el número y amplitud de las descargas de la neurona Pre-I del Pre-BötC.
7. Determinar *in machina* la termodependencia en el rango 35 a 40°C del efecto de la ketamina en su acción antagonista de los receptores NMDA sobre el número y amplitud de las descargas de la neurona Pre-I del Pre-BötC.

JUSTIFICACION

La importancia de este trabajo radica en conocer el efecto de medicamentos de amplio uso en terapéutica médica y especialmente en anestesiología como son los agonistas de receptores GABA_A (benzodiazepinas, barbitúricos y opioides) y los antagonistas de receptores NMDA (ketamina) sobre el principal generador del patrón respiratorio como lo es la neurona Pre-I del Pre-BötC del tallo cerebral. La alta frecuencia de uso de estos medicamentos y el escaso conocimiento de sus efectos sobre el patrón respiratorio aún con dosis dentro del rango terapéutico y en condiciones clínicas donde la temperatura puede con frecuencia ser diferente a lo normal (hiper o hipotermia) pueden incidir sobre el riesgo de depresión respiratoria que es la complicación más temida en anestesiología. Por lo anterior, se hace urgente investigar y caracterizar estos efectos de una manera segura, controlada y sin riesgo para los pacientes como es la experimentación *in machina*.

CAPITULO II

BASES TEÓRICAS

Es conocida la acción de las benzodiazepinas y barbitúricos sobre receptores de membranas neuronales, específicamente el incremento de las corrientes iónicas de cloro al activar el receptor ionotrópico GABA_A, lo cual genera un influjo de cloruro a la neurona hiperpolarizándola. Por su parte los opioides son capaces de activar tres tipos de receptores del tipo metabotrópico: μ , κ , δ , en especial, la acción sobre el receptor μ , activa una proteína G acoplada intracelularmente, incrementando la actividad de la enzima adenilciclase y los niveles de AMPc el cual aumenta la apertura de los canales de potasio y el eflujo de éste con el efecto hiperpolarizante, simultáneamente cierra el canal de calcio reduciendo el influjo de éste, generando un efecto hiperpolarizante (11,17,38)

Por su parte, la ketamina ejerce acción bloqueante de los canales NMDA impidiendo el influjo catiónico, específicamente de sodio y calcio por estos canales lo cual impide la despolarización neuronal (23,38).

La respiración es un acto motor rítmico complejo que involucra varias decenas de músculos, que pertenecen a tres grupos funcionales:

En primer lugar, el diafragma, este músculo, insertado entre las costillas inferiores, actúa como una bomba moviéndose arriba y abajo dentro de la caja torácica, sus contracciones son directamente responsables de actuar como fuelle y movilizándolo el aire pulmonar mediante la generación de presiones negativas y positivas alternantes en la caja torácica.

Segundo, hay varios músculos, como los intercostales internos y externos, escalenos y los músculos abdominales, que aunque a menudo son clasificados como músculos respiratorios "accesorios", juegan un papel importante en la estructura anatómica del individuo ya que endurecen la caja torácica y por lo tanto determinan la eficacia de las contracciones del diafragma.

Tercero, los músculos de la vía aérea superior, como los de la laringe, faringe, y músculo geniogloso controlan la apertura y cierre rítmico de la vía, sus contracciones regulan la tasa en la que el aire fluye dentro y fuera de los pulmones de la misma manera que una válvula (*Figura 1*), (1,34,39).

Las motoneuronas que comandan los músculos respiratorios están situadas en diferentes lugares y por ende diferentes niveles del sistema nervioso central. Las motoneuronas de las vías respiratorias superiores se encuentran a nivel craneal; las motoneuronas del nervio frénico que controlan el diafragma se encuentran en el asta ventral de la médula cervical, y las motoneuronas de control muscular de la caja torácica y abdomen están situadas en el asta ventral de la medula en el segmento toracolumbar. Todas estas motoneuronas son rítmicamente coordinadas por un

mando central llamado “centro respiratorio”, una red interneuronal ubicada en el tronco cerebral (40,41).

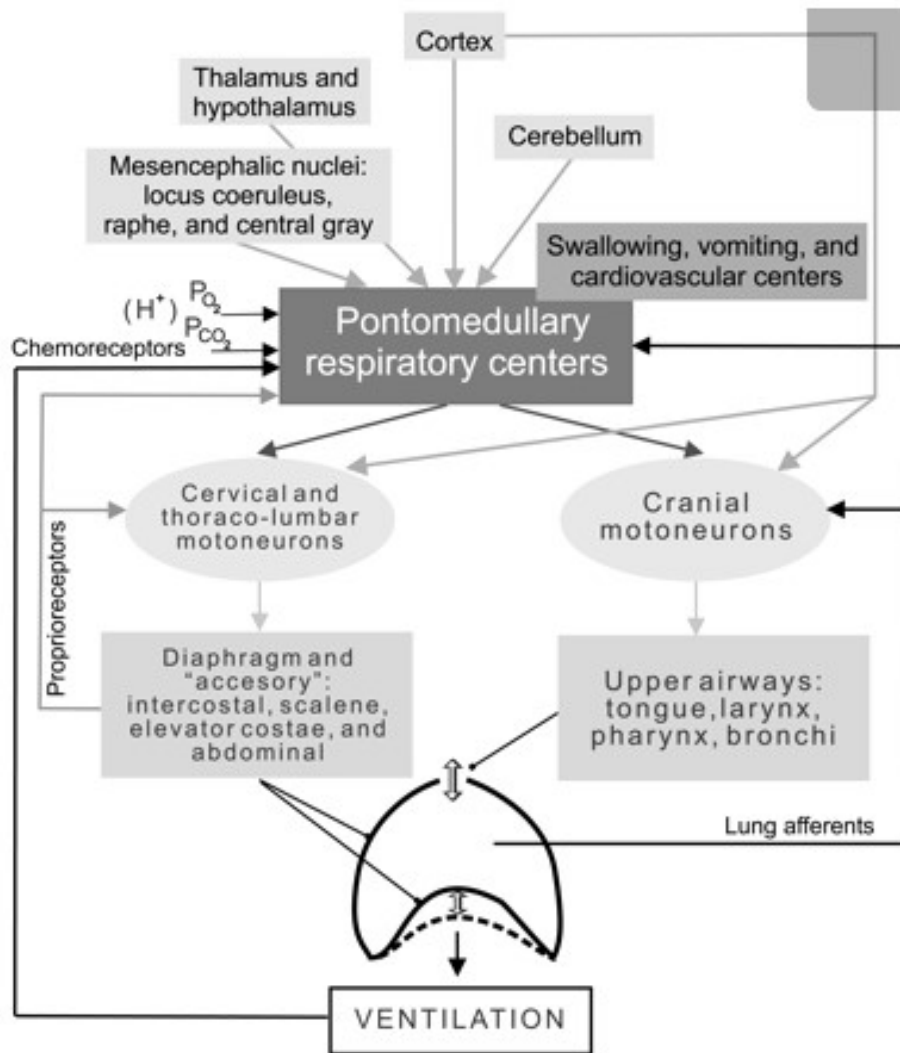


Figura 1: Esquema de aferencias y eferencias a y de los centros ponto-bulbares de control respiratorio, se incluyen vías sensoriales como propioceptivas y quimioceptivas, así como eferentes a motoneuronas de control diafragmático y músculos accesorios respiratorios. Tomado de Hilaire *et al* (39).

Los mecanismos neuronales responsables de la ritmogénesis respiratoria en los mamíferos se estudiaron en modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* tanto en

etapas maduras como neonatales usando técnicas electrofisiológicas, farmacológicas, y anatómicas (1).

Se han registrado la actividad eléctrica de varios miles de neuronas descargando en secuencia durante la respiración, así como la localización en los centros respiratorios en el tronco cerebral así como las respuestas de los nervios, los músculos respiratorios (42,43,44,45,46). Se han propuesto varios modelos de función de la red de control respiratorio sin embargo, los mecanismos reales responsables de la ritmogénesis respiratoria aún se encuentran en intensa investigación.

Estudios *in vitro* realizados en roedores neonatales mostraron que un conjunto especial de neuronas situado dentro del asta del bulbo raquídeo ventrolateral rostral con actividad marcapaso inspiratorio desempeña el papel principal de la ritmogénesis de las vías respiratorias (4,37,47).

Regulación neuronal respiratoria

Existen diversos factores que están involucrados la coordinación del comando central neuronal para satisfacer las necesidades fisiológicas y así proteger el sistema respiratorio de agentes externos.

El propósito de la respiración es el intercambio gaseoso pulmonar para proveer oxígeno a la sangre y esta a su vez a todo el cuerpo, cualquier hipoxia es detectada rápidamente por los cuerpos carotideos a nivel periférico, estos quimiorreceptores periféricos a su vez, ajustan el impulso respiratorio en las motoneuronas centrales en términos de su magnitud y frecuencia, si el resultante de ese ajuste de ventilación no puede restaurar el nivel de oxígeno óptimo en sangre, se desarrollará la depresión de la red respiratoria (48,49).

Los mecanismos de retroalimentación que sirven para mantener la respiración normal se basan en los niveles de CO_2 , así como los niveles de pH, aunque los cuerpos carotideos pueden participar en esta regulación, los quimiorreceptores centrales de CO_2 y/o de pH se encuentran en o cerca de la superficie de la médula ventrolateral rostral, aunque se ha sugerido que pueden tener un patrón de distribución anatómica más generalizada. El nivel de CO_2 constituye la base principal del marcapaso central de patrones respiratorios (50). Los cambios en la presión parcial de O_2 arterial también regulan la acción de las motoneuronas respiratorias a través de entradas por los quimiorreceptores a los centros respiratorios y a través de interacciones entre red central y cardiovascular respiratoria. Es de destacar que las redes respiratoria y cardiovascular están situadas en el tronco cerebral en estrecha interrelación (1,41,51).

Los pulmones aumentan de volumen durante la inspiración gracias a la entrada de aire, y esto activa receptores pulmonares de estiramiento, los cuales, a través del nervio vago, excitan interneuronas situado en el núcleo del tracto solitario y estas interneuronas, a su vez inhiben el centro inspiratorio central. Este bucle inhibitor, conocido como el reflejo de Hering-Breuer, ayuda a prevenir inflado excesivo, que puede dañar los pulmones (15). Los receptores que se activan por cualquier irritante traqueal, cuerpo extraño o sustancia presente en las vías respiratorias, también juegan un papel importante en la producción de tos o estornudo (1,5).

Los músculos respiratorios están involucrados en actividades no respiratorias como la vocalización o tragar, y las estructuras centrales controlan este tipo de acciones ejerciendo un control potente tanto en el centro respiratorio como en las motoneuronas respiratorias. Los otros casos en que los músculos respiratorios están involucrados en funciones no respiratorias son los vómitos, micción, defecación, y el parto. Al mismo tiempo, la respiración también es modulada por funciones complejas tales como la emoción, ejercicio, sueño, etc., que son controlados a nivel cortical y en otras partes del sistema nervioso central (1,34,39). Ver *Figura 1*.

Gaytán y colaboradores (53) llevaron a cabo el rastreo transneuronal del virus de la rabia mediante su inyección en los músculos respiratorios de ratones adultos, y los resultados confirmaron que varias estructuras, tales como núcleos del

rafe, locus coeruleus, área A5, área gris central del tálamo, núcleos del hipotálamo, el cerebelo, y algunas áreas corticales, están conectados a los centros respiratorios del tallo cerebral (53). Todo esto significa que los patrones de descarga de los músculos respiratorios, motoneuronas respiratorias, y el centro interneuronal son afectados por muchos factores distintos de la respiración. Por tanto, es difícil interpretar los cambios respiratorios inducidos experimentalmente mediante la estimulación de estructuras centrales o mediante la realización de las lesiones o la aplicación de medicamentos a estas estructuras. También es difícil determinar si las estructuras en cuestión pertenecen realmente a la red respiratoria o a los centros no respiratorios que interactúan con la respiración (1).

La complejidad general del acto de respiración puede de hecho explicar por qué los resultados de los estudios *in vivo* no han bastado para explicar la ritmogénesis respiratoria, tal como lo presenta la *Figura 1* (39).

Etapas de la ritmogénesis respiratoria.

1. Inspiración (I): entran en funcionamiento el diafragma y el resto de los músculos que conforman la caja torácica.
2. Inspiración-Espiración (I-E): los músculos inspiratorios comienzan progresivamente a cesar su contracción y los músculos laríngeos controlan la salida progresiva de aire de los pulmones.

3. Espiración (E): los intercostales externos y los abdominales se contraen.

Según estudios de las descargas neuronales del tronco encefálico (1,2) y de acuerdo con sus patrones de disparos, sus potenciales de acción y sus entradas sinápticas se pueden reconocer 6 tipos neuronas a saber (*Figura 2*):

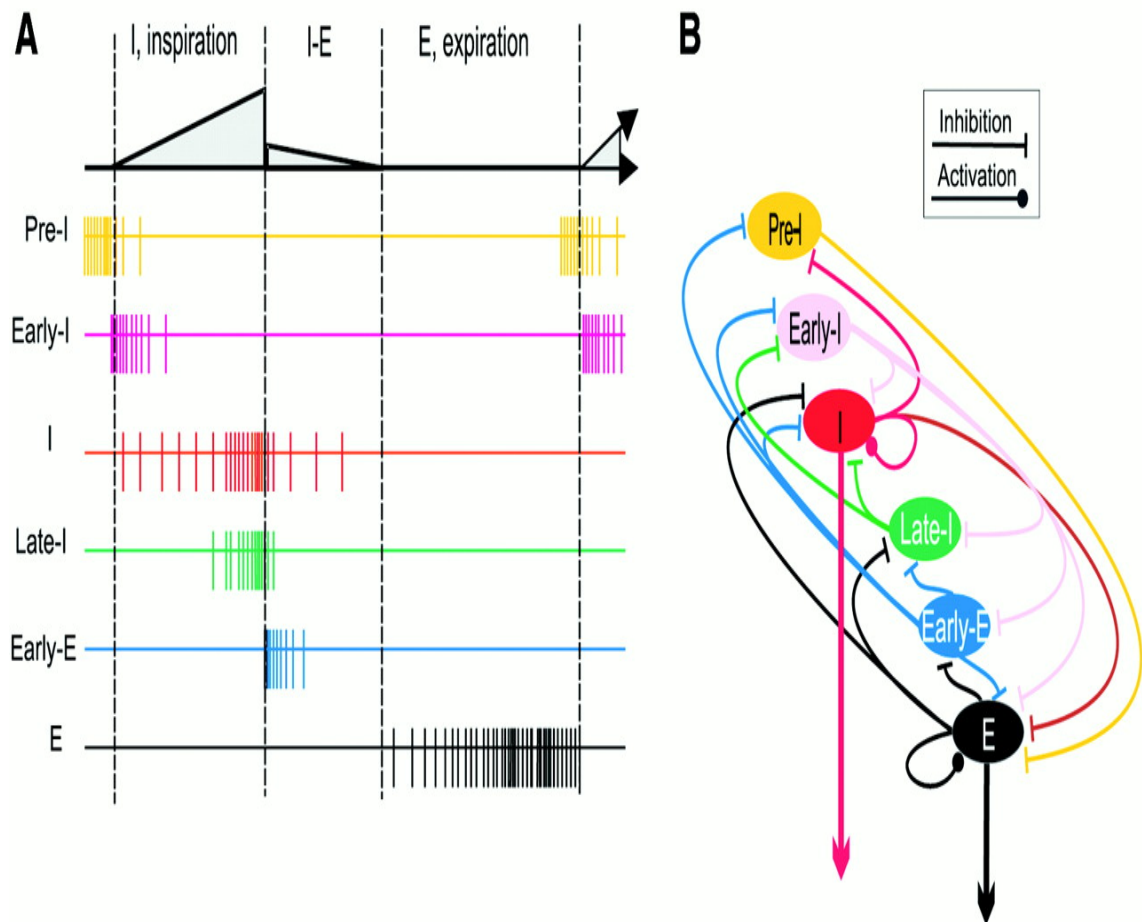


Figura 2. **A:** Etapas de la respiración con los patrones de descarga de los diferentes tipos neuronales de los centros de control respiratorio. Los potenciales de acción se representan con las líneas verticales coloreadas. **B:** Red neuronal y conexiones sinápticas excitatorias e inhibitorias entre los diferentes tipos de neuronas de control respiratorio del tallo cerebral. La salida inspiratoria (flecha roja descendente) y espiratoria (flecha negra descendente) corresponden a las vías eferentes motoras de la red de control respiratorio. Tomado de Hilaire y Pásaro (39).

- 1.- Neuronas Pre-Inspiratorias (Pre-I): Son neuronas que se disparan en la transición entre la espiración y la inspiración.
- 2.- Neuronas Inspiratorias Tempranas (Early-I): Son neuronas que se disparan desde el principio hasta el medio de la inspiración.
- 3.- Neuronas Inspiratorias (I): Son neuronas que se activan durante toda la inspiración.
- 4.- Neuronas Inspiratorias Tardías (Late-I): Son neuronas que se activan al final de la inspiración.
- 5.- Neurona Espiratoria temprana (Early-E): Son neuronas que se activan en la transición entre el final de la inspiración y al inicio de la espiración.
- 6.- Neuronas Espiratorias (E): Son aquellas que descargan durante la espiración.

A nivel del bulbo raquídeo, neuronas respiratorias de todos los tipos están reunidas en la proximidad del núcleo ambiguo y la formación reticular circundante, que constituyen el denominado grupo ventral respiratorio (GVR). Algunas neuronas espiratorias se encuentran más densamente concentradas en la parte rostral del GVR, formando el grupo Bötzingen.

Las neuronas inspiratorias bulboespinales excitan las neuronas motoras de inspiración a través de las interneuronas medulares, y numerosas neuronas bulboespinales espiratorias del grupo Bötzingen inhiben las motoneuronas del frénico durante la espiración. Algunas neuronas del GVR son las motoneuronas que inervan los músculos de las vías respiratorias superiores, hay algunas otras neuronas del GVR con sus axones enteramente localizados dentro del tronco cerebral, estas neuronas que se llaman interneuronas propiobulbares, podrían participar en la creación de la unidad central respiratoria (54)(55).

En la parte dorsal del bulbo raquídeo, un grupo denso de las neuronas inspiratorias forma el grupo dorsal respiratorio (GDR) en la vecindad del núcleo del tracto solitario, cerca de la entrada de los aferentes periféricos de los baro y quimiorreceptores de los pulmones. La mayoría de las neuronas GDR son neuronas bulboespinales inspiratorias que tienen efectos excitatorios post sinápticos en la motoneuronas del frénico (1).

Es poco probable que las neuronas inspiratorias del GDR sean simples neuronas "salida" de los centros respiratorios, porque a menudo excitan otras neuronas inspiratorias debido a su activación antidrómica masiva que afectan el ritmo los sistemas respiratorios (1).

Rekling y colaboradores (55) hacen referencia a un grupo bien definido de neuronas dentro del bulbo raquídeo denominándolas como Pre-BötC. El acoplamiento eléctrico y la transmisión química excitatoria entre las neuronas marcapasos juegan un importante papel en la generación y/o modulación del ritmo respiratorio (56). Otros investigadores están ahora tratando de analizar los mecanismos que subyacen a las propiedades de las membranas de las neuronas marcapasos y clasificarlas en varios subtipos, sin embargo, el bloqueo de la corriente de sodio persistente, postulado como responsable de la explosión rítmica de las neuronas marcapasos, no altera el ritmo *in vitro* (54).

El Pre-BötC está constituido básicamente por 2 tipos de neuronas, las neuronas Early-I y las Pre-I las cuales por su carácter excitatorio se consideran las células marcapaso del ritmo respiratorio (11) ya que tienen conexiones eferentes con las neuronas Early-I, con las neuronas inspiratorias de descarga progresiva llamadas Rampa-I, así como sinapsis aferentes con las neuronas de descarga tónica localizadas en el puente y el bulbo raquídeo. Las neuronas Late-E poseen aferencias de los mecano y quimiorreceptores provenientes de los pulmones y de la bifurcación de la tráquea y bronquios, demostrándose que participan en el mantenimiento del control homeodinámico de la respiración (57,58).

Por su parte, el núcleo Böttinger participa en la generación y organización del patrón respiratorio, recibiendo aferencias pulmonares que proveen señales de retroalimentación para el sistema de control respiratorio y cardiovascular, así como

otras funciones reflejas vitales asociadas a la respiración, como por ejemplo la tos (15).

En la fig. 3 se esquematiza el modelo de conectividad entre los diferentes centros de control respiratorio propuesto por Smith *et al.* (18) y en la actualidad se mantiene como el más ajustado a la anatomía y función de dichos centros.

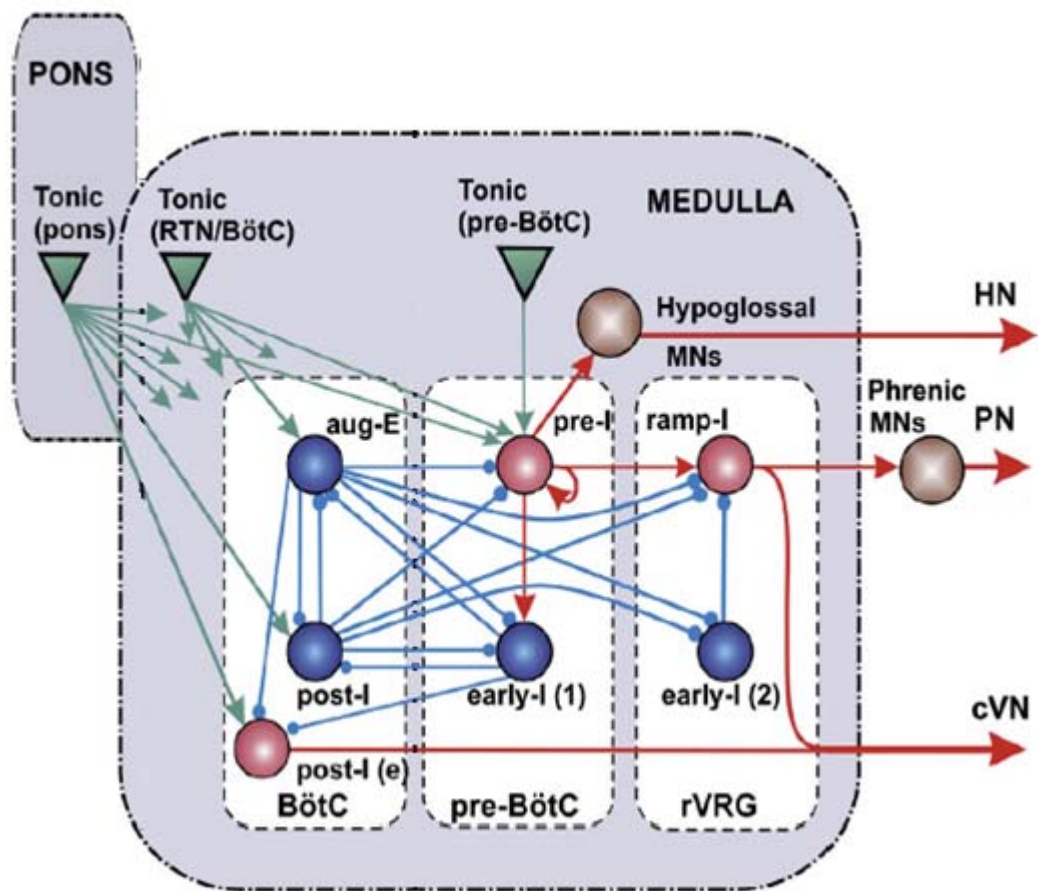


Figura 3. En el esquema del tallo cerebral propuesto por Smith *et al* se describen los centros de control respiratorio, su conectividad funcional y la interacción de los grupos neuronales de los diferentes compartimientos respiratorios como son el bulbo raquídeo (Medulla), puente (Pons),

Complejo Bötzinger (BötC), complejo pre-Bötzinger (pre-BötC) y la red del grupo rostral ventral (rVRG). Las esferas rojas esquematizan las neuronas excitatorias, las azules las inhibitorias y las marrones las neuronas motoras, los triángulos verdes representan neuronas de excitación tónica en los diferentes compartimientos transeccionales. Conexiones sinápticas inhibitorias y excitatorias se indican mediante flechas y círculos pequeños, respectivamente. Transecciones "simuladas" (líneas discontinuas) imitan las realizadas *in situ*. Tomado de Smith *et al.* 2007 (18).

Los parámetros funcionales de membrana y conductancias iónicas, de esta compleja red neuronal así como los pesos sinápticos de varias de las conexiones reportados hasta el presente (21,37) se presentan en la *Tabla 1*.

Tabla 1.

Peso de las conexiones sinápticas de la red de la neurona Pre-I según sea excitatoria o inhibitoria

Efecto sináptico	Conexión	Peso sináptico
Excitatoria	Drive (Puente)	0,03
	Drive (Rafe)	0,3
	Drive (RTN)	0,2
	PRE-I	0,03
	PUENTE-I	0,2
	PRE	0,025
Inhibitoria	POST-I	-0,1625
	AUG-E	-0,0275

De la misma manera todas las neuronas tienen niveles máximos de conductancia en sus canales iónicos (21,12) y particularmente los de la neurona Pre-

I con $g_{Na} = 170 \text{ nS}$, $g_{NaP} = 5 \text{ nS}$ y $g_K = 180 \text{ nS}$ siendo las unidades de conductancia expresadas en nanoSiemens (nS) (21).

Gracias a los últimos métodos *in vitro*, ahora es posible realizar estudios farmacológicos en condiciones satisfactorias, pudiendo ser eliminados los efectos periféricos y bucles, se han asociado también varias sustancias endógenas, como la serotonina, la sustancia P, noradrenalina, acetilcolina, y TRH, como agentes que afectan la actividad respiratoria (2,41). Estas sustancias pueden actuar en varios niveles de la red neuronal de las vías respiratorias y sus efectos sobre el GVR y las motoneuronas que modulan la amplitud de la actividad respiratoria.

Sin embargo, la aplicación local de medicamentos al Pre-BötC afecta el ritmo respiratorio ya que los hallazgos inmunohistológicos han confirmado la presencia de receptores para las sustancias endógenas mencionadas en el Pre-BötC (59) *figura 4*.

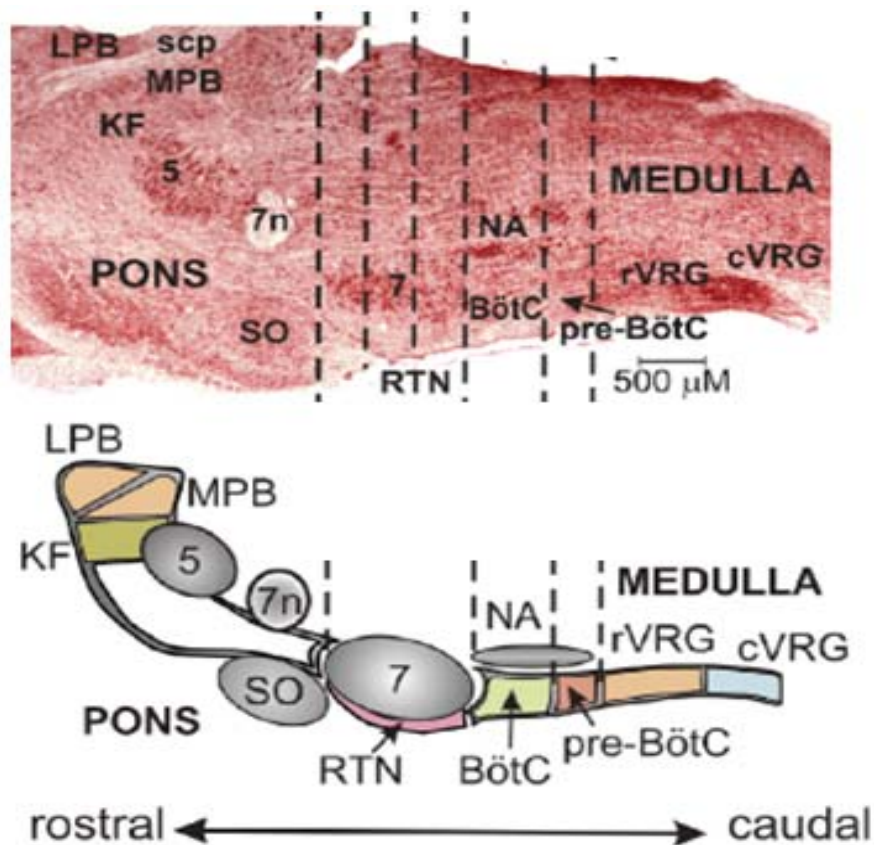


Figura 4: Corte histológico y esquema del tallo cerebral describiendo los centros de control respiratorio y su localización anatómica. Medulla (bulbo raquídeo), Pons (puente), BötC (núcleo Bötzing), pre-BötC (núcleo pre-Bötzing), 5 (núcleo trigeminal), 7 (núcleo facial), KF (núcleo Kölliker-Fuse), LPB (núcleo parabraquial lateral), MPB (núcleo parabraquial medial), RTN (núcleo retrotrapezoide), scp (pedúnculo cerebeloso superior), SO (oliva superior) las líneas verticales segmentadas corresponden a sitios de corte experimental para determinar interconexiones y funciones. Tomado de Smith *et al.*, 2007 (18).

Los numerosos controles ejercidos sobre la respiración in vivo pueden ser al menos, en parte mediados a través de las neuronas Pre-BötC, que incluso puede mediar la respuesta respiratoria a la hipoxia (49,60,61,62) *figura 5*.

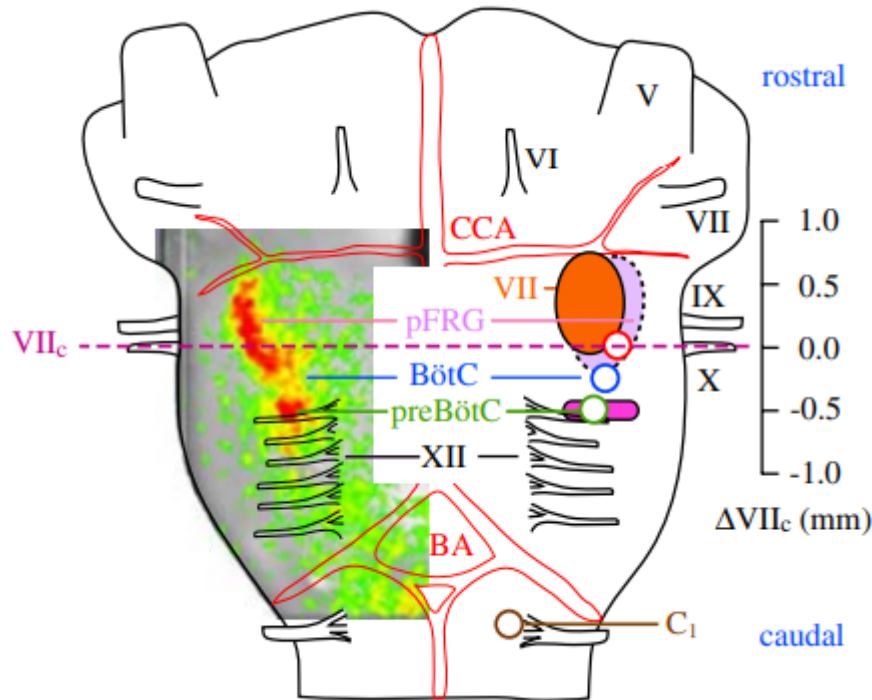


Figura. 5: Áreas del tallo cerebral, su relación con otras raíces nerviosas (derecha) y el registro de la actividad neuronal respiratoria (izquierda) mediante técnicas de marcaje óptico. Ubicación rostrocaudal del centro inspiratorio del Pre-BötC (óvalo magenta), se aprecian las raíces nerviosas del nervio hipogloso que está más rostral en relación al núcleo Pre-BötC (XII). El óvalo violeta indica la ubicación del centro espiratorio del grupo respiratorio parafacial (pFRG). En la parte izquierda del esquema se muestra la actividad neuronal óptica durante un ciclo respiratorio detectando el incremento de fluorescencia del colorante sensible al voltaje Di-2-ANEPEQ asociado a actividad neuronal incrementada en la rata. Tomado de Ballanyi K. *et al.* 2009 (28).

Modelo de mecanismos de reorganización de la generación del ritmo después de las transecciones del tallo cerebral.

La *figura 6, A, y B*, esquematiza el comportamiento del modelo de la red de control respiratorio en su forma simplificada. En la *figura 6B* está representada la

actividad de cada grupo neuronal por un histograma de frecuencia de descarga para cada célula. En la *figura 6A* se representa la población post-I del complejo BötC, estas neuronas inhiben la actividad de las otras poblaciones de neuronales del modelo excepto post-I(e) (*Figura 3*) durante la primera mitad de la espiración (fase post-inspiratoria). Una vez comenzada la disminución sistemática de la descarga de post-I que sería la adaptación a la inhibición por post-I, las neuronas aug-E (Células espiratorias aumentadas, es una población de neuronas inhibitorias que están en el compartimiento del BötC), comienzan a descargar después de la espiración y forma una última fase espiratoria. Al final de la espiración, la Pre-I que es una población neuronal del pre-BötC se libera de inhibición y activa la población early-I, que a su vez inhibe todas las poblaciones neuronales espiratorias en el BötC. Como resultado, la ramp-I (neuronas premotoras excitatorias de las motoneuronas del nervio frénico y vago cervical), y early-I población de rGVR se liberan de inhibición (con algo de retraso con respecto a Pre-I) e inicia la siguiente fase inspiratoria. (*Figura 6A*). Durante la fase inspiratoria, la actividad de la población de early-I del Pre-BötC disminuye provocando una desinhibición lenta de la descarga de post-I población del Complejo Bötzing. Una vez que la población post-I comienza a disparar, inhibe toda actividad inspiratoria completando así el ciclo inspiratorio.

En resumen, la ritmogénesis de tres fases del modelo surge de las interacciones inhibitorias mutuas entre early-I, post-I y aug-E, estos grupos de neuronas comprenden una estructura de anillo de tres poblaciones (marcada por el sombreado gris en la *figura 6A*), con las interacciones excitatorias de la población

Pre-I que participan en la descarga de inicio de la inspiración (*Figura 6A*).

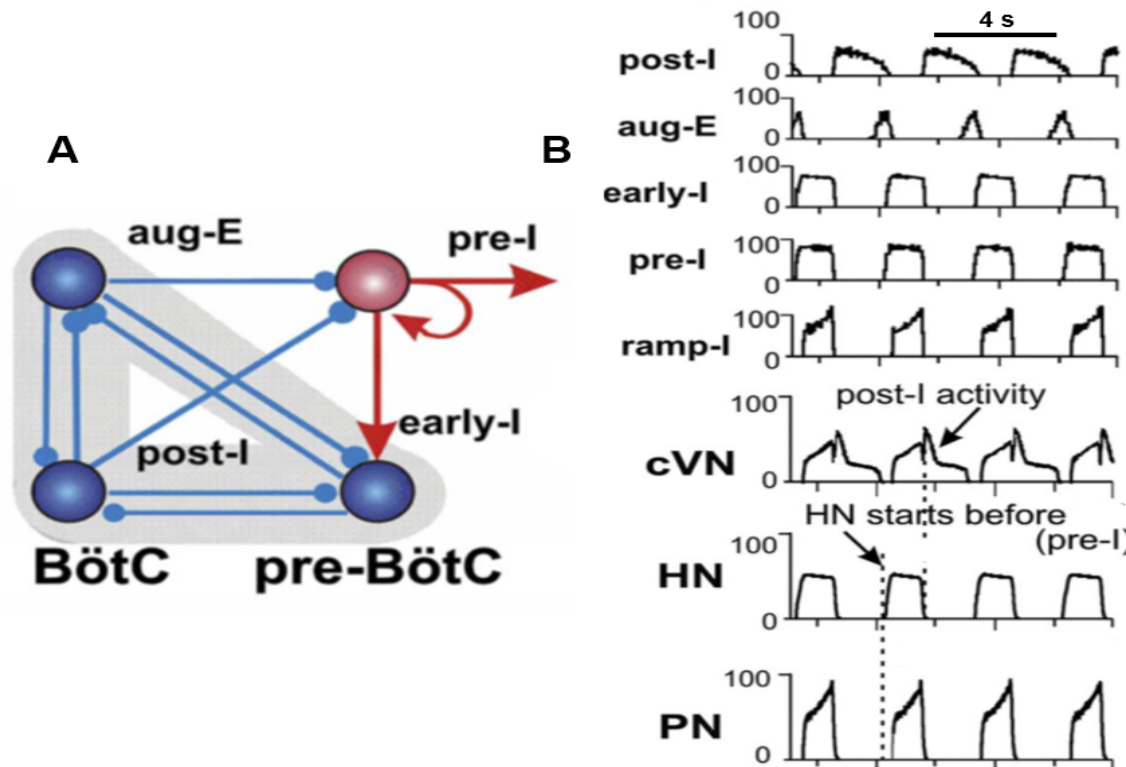


Figura 6.

A: Esquema de las neuronas y circuitos de la red de control y ritmogénesis respiratoria. Las esferas rojas son poblaciones neuronales excitatorias y las azules son inhibitorias. B: Histograma de frecuencia media de descarga neuronal de las poblaciones seleccionadas en el modelo y descargas Motoras del nervio Vago cervical (cVN), Hipogloso (HN) y Frénico (PN). Tomado con modificaciones de Smith *et al.* 2007 (18).

En este modelo se reproducen todas las características principales del patrón respiratorio experimental grabado en tres fases incluyendo:

1. El perfil de la neurona rampa-I y las descargas excitatorias del nervio frénico.

2. El inicio de las descargas Pre-Inspiratorias en la población neuronal Pre-I del Pre-BötC con las motoneuronas del nervio hipogloso y del nervio frénico.
3. La disminución de la actividad neuronal de post-I, neuronas del Complejo Bötzing y las post -I(e) que componen las descargas excitatorias del nervio vago cervical (cVN).
4. El aumento de actividad espiratoria de las neuronas aug-E del Complejo Bötzing.

Cuando al modelo citado en la *figura 3* se le elimina la unidad excitadora del puente, se confirman los postulados presentados en la *figura 6*. La estimulación de la parte dorsolateral del puente, compuesta por los núcleos Parabraquial (PB) y Kölliker-Fuse (KF) produce una fuerte estimulación de activación a las neuronas post-I, lo que indica que gran parte de la actividad tónica excitatoria de las neuronas post-I del BötC provienen del puente. (18,52,53,63,64).

La población de neuronas aug-E es menos dependiente de la actividad excitatoria del puente pero recibe una importante unidad excitatoria de la RTN y otras fuentes medulares. La eliminación de los estímulos del puente reduce la excitabilidad de las neuronas post-I en relación con las neuronas aug-E, que ahora exhiben un patrón descendente (definido por I_{CaL} y Cl, Ca).

La eliminación de los impulsos del puente reduce la excitabilidad y frecuencia de disparo de las poblaciones Pre-I y Ramp-I, así como la reducción de la amplitud de todas las descargas motoras de cVN, HN y PN (18). La reducción adicional a la unidad excitadora de la población Pre-I del pre-BötC y la pérdida de Inhibición fásica relacionados con la espiración pueden cambiar el estado operativo de la población Pre-I, que genera actividad endógena basada en la expresión del I_{NaP} y las interacciones excitatorias dentro de la misma población neuronal. (17,18,20,54,65).

Todas las neuronas usadas en éstos modelos siguen principios de Hodgkin-Huxley (con solo un compartimiento) incorporando propiedades conocidas y canales iónicos característicos de las neuronas respiratorias registradas *in vitro*. Específicamente, la cinética de canales rápidos de sodio (I_{Na}) y de canales de sodio persistente (slowly inactivating, I_{NaP}), descritos usando los datos experimentales obtenidos en los estudios de las neuronas del bulbo ventrolateral rostral de rata (17).

La cinética de alto voltaje dependiente de corrientes de Calcio (I_{CaL}) fue usado en estos modelos según los estudios de las corrientes de calcio en las neuronas de la VRG de rata (23), la dinámica del calcio intracelular se incorporó usando datos reportados por Frermann *et al.*(66). La inclusión de otros canales iónicos, como por ejemplo, el rectificador de potasio (I_K) y el canal de calcio dependiente de potasio ($I_{K,Ca}$), conductancias sinápticas y otros parámetros biofísicos de la membrana se basó en los reportes experimentales interespecies (11,17,23, 65,67,68).

Estos modelos de neuronas y de redes han permitido un avance significativo en la comprensión del control respiratorio y constituyen un método experimental validado multidisciplinariamente por diferentes grupos de investigación de diferentes países.

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

Bases Epistemológicas

Se abordó la investigación con una matriz epistémica dentro del positivismo lógico, con un enfoque cuantitativo y abordaje empírico-analítico que busca como fin último el control y explicación del fenómeno a estudiar.

La naturaleza de los cambios y reacciones de las células en estudio es producto de la relación causa-efecto en un fenómeno el cual es medible, comparable y verificable.

El origen del conocimiento es el sistema filosófico del positivismo lógico, cuya matriz epistémica responde a una visión mecanicista-reduccionista de la realidad, donde se aísla el objeto de estudio con la finalidad de analizarlo controlando las diferentes variables que pudieran afectar al individuo en estudio, y una vez hecho esto se procede a modificar las diferentes variables controladas para explicar su funcionamiento como unidad. Su fin último es controlar la realidad, comprenderla y dominarla (68).

La episteme de la investigación se basó en poner en práctica un modelo de simulación computacional para conocer los cambios de temperatura corporal durante la anestesia y los cambios que producen drogas como las benzodiazepinas, opioides y barbitúricos, con su denominador común de ser agonistas del receptor ionotrópico GABA_A de membrana y de la ketamina con su acción antagonista de los receptores ionotrópicos de glutamato del tipo NMDA, ambos receptores están presentes en las células Pre-I del Pre-BötC cuyas descargas desencadenan la ritmogénesis de la respiración.

En las ciencias biológicas es común el empleo de las palabras *in vivo* e *in vitro*, para la experimentación que se hace con organismos vivos o la que se realiza en tejidos o cultivos celulares extraídos de un ser vivo. En ese mismo orden de ideas y conforme avanza el siglo XXI, cada vez es más común el empleo del término *in silico* o su sinónimo *in machina*, que hace referencia a experimentos que se realizan mediante simulaciones en computadora.

La expresión *in silico* proviene de la palabra in silicio, material presente en los semiconductores de los dispositivos que se utilizan para almacenamiento o procesadores de las computadoras (59).

Debido a la versatilidad de los softwares, el bajo costo de los mismos y los grandes beneficios en ahorro de tiempo y dinero por la inmediatez de los resultados, escaso uso material, al igual que el poco espacio que se necesita para el desarrollo de investigaciones, su uso en centros de investigación y docencia en universidades

cada día va en aumento (35). Los resultados pueden ser corroborados por estudios *in vivo* o *in vitro*, sin tener que usar material biológico para las investigaciones y todo lo que ello conlleva, como personal idóneo para el manejo de los animales y tejidos, bioseguridad, bioética, consentimientos informados y un sin fin de implicaciones que conlleva la investigación en seres vivos y más aún en humanos, en vista que los resultados suelen ser casi inmediatos, listos para su análisis y comparación con otros estudios, los estudios *in machina* cada día son más rutinarios e incluso se hacen simposia exclusivos de investigaciones *in silico* (37,70,71,72).

Población y muestra:

Según estudios de las descargas neuronales del tronco encefálico (1,2) y de acuerdo con sus patrones de disparos, sus potenciales de acción y sus entradas sinápticas se pueden reconocer 6 tipos neuronas como vimos en la *Figura 2*. Sin embargo, para el desarrollo de este trabajo analizaremos el comportamiento *in machina* de la neurona Pre-I del Pre-BötC cuya estimulación desencadena la ritmogénesis respiratoria constituyendo la neurona marcapaso principal (2,6,19,20,48,73).

Diseño de la investigación.

Efecto *in machina* de benzodiazepinas, barbitúricos, opioides y ketamina.

Los experimentos *in machina* con el modelo de la neurona Pre-I del Pre-BötC, se llevaron a cabo con el simulador mono neuronal Current Clamp EOTN en su versión 2014a de la Universidad de Oxford (72), escrito en lenguaje C⁺⁺ compilado para correr en ambiente Windows^{MR} en versiones XP, Vista, 7, 8 y 10 con procesadores de 32 o 64 bits. Para el presente estudio se utilizó un computador Hewlet-Packard, Core i3, con 8GB de RAM y 256GB en disco duro.

El modelo neuronal siguió los parámetros descritos por Rybak *et al.* (65) y Smith *et al.* (73). Una vez verificado el Patrón de descarga neuronal descrito por estos autores, se modificó la actividad sináptica dependiente de receptores GABA_A como acción farmacológica de benzodiazepinas, opioides o barbitúricos. La acción de la ketamina se simuló modificando la actividad sináptica dependiente de receptores NMDA.

Descripción del modelo de neurona Pre-I del Pre-BötC:

La neurona se modeló siguiendo a Hodgkin-Huxley (HH) con compartimento único, lo cual se ajusta a la descripción anatómica y funcional (65,73) , según la ecuación clásica:

$$C \cdot \frac{dV}{dt} = -I_{Na} - I_{NaP} - I_K - I_{CaL} - I_{K,Ca} - I_L - I_{SynE} - I_{SynI}$$

Donde V es el potencial de membrana, C es la capacitancia de la membrana y t es el tiempo. Los términos de la parte derecha de esta ecuación representan las corrientes iónicas: I_{Na} , sodio rápido (con máxima conductancia \bar{g}_{Na}); I_{NaP} , (inactivación lenta) persistente de sodio (con máxima conductancia \bar{g}_{NaP}); I_K , potasio lento rectificativo (con máxima conductancia \bar{g}_K); I_{CaL} , alto voltaje activado por calcio (con máxima conductancia \bar{g}_{CaL}); $I_{K,Ca}$, calcio dependiente de potasio (con máxima conductancia $\bar{g}_{K,Ca}$). I_L , fuga (con constante de conductancia g_L); I_{SynE} (con conductancia g_{SynE}) e I_{SynI} (con conductancia g_{SynI}), corrientes sinápticas excitatoria e inhibitorias respectivamente. Cada corriente se describe específicamente a continuación:

$$I_{Na} = \bar{g}_{Na} \cdot m_{Na}^3 \cdot h_{Na} \cdot (V - E_{Na})$$

$$I_{NaP} = \bar{g}_{NaP} \cdot m_{NaP} \cdot h_{NaP} \cdot (V - E_{Na})$$

$$I_K = \bar{g}_K \cdot m_K^4 \cdot (V - E_K)$$

$$I_{CaL} = \bar{g}_{CaL} \cdot m_{CaL} \cdot h_{CaL} \cdot (V - E_{Ca})$$

$$I_{K,Ca} = \bar{g}_{K,Ca} \cdot m_{K,Ca}^2 \cdot (V - E_K)$$

$$I_L = g_L \cdot (V - E_L)$$

$$I_{SynE} = g_{SynE} \cdot (V - E_{SynE})$$

$$I_{SynI} = g_{SynI} \cdot (V - E_{SynI})$$

Donde E_{Na} , E_K , E_{Ca} , E_L , E_{SynE} , y E_{SynI} son los potenciales de equilibrio para cada canal correspondiente.

Las variables m_i y h_i con índices indican corriente iónica de activación e inactivación de los correspondientes canales iónicos.

La cinética de activación e inactivación es como se describe a continuación:

$$\tau_{mi}(V) \cdot \frac{d}{dt} m_i = m_{\infty i}(V) - m_i$$

$$\tau_{hi}(V) \cdot \frac{d}{dt} h_i = h_{\infty i}(V) - h_i$$

Las expresiones de las variables para estado estable de activación e inactivación, y las constantes de tiempo están contenidas en la *Tabla 2* (18).

TABLA 2

Estado estable de activación e inactivación, y constantes de tiempo para canales iónicos voltaje dependientes

Canal iónico	$m_{\infty}(V), V \text{ in } mV$ $\tau_m(V), ms;$ $h_{\infty}(V), V \text{ in } mV;$ $\tau_h(V), ms$
Sodio rápido Na	$m_{\infty Na} = 1/(1 + \exp(-(V + 43,8)/6));$ $\tau_{mNa} = \tau_{mNa \max} / \cosh((V + 43,8)/14), \tau_{mNa \max} = 0,252;$ $h_{\infty Na} = 1/(1 + \exp((V - 67,5)/10,8));$ $\tau_{hNa} = \tau_{hNa \max} / \cosh((V - 67,5)/12,8), \tau_{hNa \max} = 8,456$
Sodio persistente NaP	$m_{\infty NaP} = 1/(1 + \exp(-(V + 47,1)/3,1));$ $\tau_{mNaP} = \tau_{mNaP \max} / \cosh((V + 47,1)/6,2), \tau_{mNaP \max} = 1$ $h_{\infty NaP} = 1/(1 + \exp((V + 60)/9));$ $\tau_{hNaP} = \tau_{hNaP \max} / \cosh((V + 60)/9), \tau_{hNaP \max} = 5000$
Demorado y rectificadopor potasio, K	$\alpha_{\infty K} = 0,01 \cdot (V + 44) / (1 - \exp(-(V + 44)/5));$ $\beta_{\infty K} = 0,17 \cdot \exp(-(V + 49)/40);$ $m_{\infty K} = \alpha_{\infty K} / (\alpha_{\infty K} + \beta_{\infty K}).$ $\tau_{mK} = \tau_{mK \max} / (\alpha_{\infty K} + \beta_{\infty K}), \tau_{mK \max} = 1$
Alto voltaje calcio activado, Ca _L	$m_{\infty CaL} = 1 / (1 + \exp(-(V + 27,4)/5,7));$ $\tau_{mCaL} = 0,5;$ $h_{\infty CaL} = (1 + \exp((V + 52,4)/5,2));$ $\tau_{hCaL} = 18$
Calcio dependiente de Potasio K (Ca ²⁺)	$\alpha_{\infty K, Ca} = 1,25 \cdot 10^8 [Ca]_i^2, \beta_{\infty K, Ca} = 2,5;$ $m_{\infty K, Ca} = \alpha_{\infty K, Ca} / (\alpha_{\infty K, Ca} + \beta_{\infty K, Ca}).$ $\tau_{mK, Ca} = \tau_{mK, Ca \max} \cdot 1000 / (\alpha_{\infty K, Ca} + \beta_{\infty K, Ca}),$ $\tau_{mK, Ca \max} = 0,7 - 1,0$

Los valores de máxima conductancia de todos los tipos de neuronas se muestran en la *Tabla 3*, (18).

TABLA 3

Máximas conductancias de los canales iónicos en los diferentes tipos de neuronas

TIPO DE NEURONA	\bar{g}_{Na} nS	\bar{g}_{Nap} nS	\bar{g}_K nS	\bar{g}_{CaL} nS	$\bar{g}_{K,Ca}$ nS	\bar{g}_L nS
Pre-I	170	5,0	180			2,5
Post-I	400		250			6,0
otras	400		250	0,05	3,0 – 6,0	6,0

La cinética de la concentración de calcio intracelular es descrita a continuación tal como lo hizo Rybak et al. (22)

$$\frac{d}{dt} Ca = k_{Ca} \cdot I_{Ca} (1 - P_B) + (Ca_0 - Ca) / \tau_{Ca}$$

Donde el primer término constituye el influjo (con el coeficiente k_{Ca}) y el almacenamiento en búfer (con la probabilidad P_B), y el segundo término describe la cinética de la bomba y la concentración de descanso de calcio Ca_0 y la constante de tiempo T_{Ca} .

$$P_B = B/(Ca + B + K)$$

Donde B es la concentración total de buffer y K es la tasa del parámetro, el potencial de reversa del calcio está en función del Ca.

$$E_{Ca} = 13.27 \bullet \ln (4/Ca)$$

$$(Ca \text{ en reposo}) = Ca_0 = 5.10^{-5} \text{ mM and } E_{Ca} = 150 \text{ mV}$$

Donde Ca_0 es la concentración de Ca extracelular.

Las conductancias de sinapsis excitatoria (g_{SynE}) y la inhibitoria (g_{SynI}) son igual a cero en reposo y pueden ser activadas por impulsos o entradas activadoras o inhibitoras respectivamente.

$$g_{SynEi}(t) = \bar{g}_E \cdot \sum_i S\{w_{ji}\} \cdot \sum_{tkj < t} \exp[-(t - t_{kj})/\tau_{SynE}]$$

$$+ \bar{g}_{Ed} \cdot \sum_m S\{w_{dmi}\} \cdot d_{mi},$$

$$g_{SynIi}(t) = \bar{g}_I \cdot \sum_j S\{-w_{ji}\} \cdot \sum_{tkj < t} \exp[-(t - t_{kj})/\tau_{SynI}]$$

$$+ \bar{g}_I \cdot \sum_m S\{-w_{dmi}\} \cdot d_{mi},$$

Los pesos de las conexiones sinápticas modeladas en el presente estudio están contenidos en la *Tabla 4* (18).

TABLA 4

Peso de las conexiones sinápticas en la red neuronal, entre las cuales se encuentran las reportadas para la neurona Pre-I del Pre-BötC.

TIPO DE NEURONA Y UBICACION	IMPULSO EXITATORIO (PESO DE LA SINAPSIS) O PESO DE LA SINAPSIS DE CADA NEURONA
Ramp-I (rVRG)	(puente){2,0};(early-I(2){-0,275};(Pre-I){0,06}; (aug-E){-2,0};(post-I){-1,0}.
early-I(2) (rVRG)	(puente) {1,7}; (aug-E) {-0,25}; (post-I){-1,0}.
Pre-I (Pre-BötC)	(pre-BötC){0,3};(RTN/BötC){0,13};(Puente){0,55}; (Pre-I){0,03}; (aug-E) {-0,025};(post-I){-0,225}
early-I(1) (Pre-BötC)	(RTN/BötC){0,7};(puente){1,1};(Pre-I){0,0034}; (aug-E){-0,145}; (post-I){-0,225}
aug-E (BötC)	(RTN/BötC){1,0};(puente){0,4};(early-I(1){-0,115}; (post-I){-0,32}
post-I (BötC)	(RTN/BötC) {0,1};(puente){1,5}; (early-I(1){-0,04}; (aug-E){-0,01}
post-I(e) (BötC)	(RTN/BötC) {0,1};(puente){1,0}; (early-I(1){-0,2}; (aug-E){-0,15}

Las neuronas sinápticas en paréntesis y los valores de los pesos sinápticos en corchetes.

En el modelo de la neurona Pre-I del Pre-BötC implementado en el presente estudio, se indujo la actividad marcapaso rítmica mediante la inyección intracelular de 2 nA la cual generó el patrón de descarga tónica característica tanto en pulsos de estimulación con duraciones de 750 ms como de 1000ms. En vista que el número de potenciales de acción (espigas) y su amplitud son parámetros de cuantificación

(conteo de espigas por unidad de tiempo), se seleccionó para los experimentos la inducción de la actividad marcapaso mediante la inyección intracelular de 2 nA durante 1000 ms, esto debido a lograrse una mayor cantidad de eventos suficiente estadísticamente que los obtenidos con periodos de estimulación de 750ms.

Para la modificación experimental de la actividad sináptica dependiente de los receptores GABA_A se normalizó, según el modelo seguido, a 0,6 (60% de la máxima conductancia iónica). Las dosis progresivas de benzodiazepinas se equivalieron a incrementos en la actividad sináptica dependiente de GABA_A según la siguiente secuencia: 0,8; 1,0; 1,2; 1,4 y 1,6 que equivalen a la activación del receptor GABA_A en 20, 40, 60, 80 y 100%, como efecto de la administración de las dosis progresivamente mayores de estas drogas.

Para el escenario del efecto de la ketamina, se redujo progresivamente el peso de la sinapsis NMDA a 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1 y 0 equivalente al bloqueo progresivo por ketamina al 50, 40, 30, 20, 10 y 0% de actividad como efecto de dosis incrementales, realizándose los experimentos en tres temperaturas diferentes en las cuales se encontraría el receptor de membrana ya que estos receptores son termodependientes para evaluar el efecto adicional de esta variable en condiciones de hipo (35°C), normo (37°C) e hipertermia (40°C), situación clínica frecuente.

En ambas series de experimentos la membrana de la neurona Pre-I se modeló según reportes previos, con las siguientes conductancias: $\bar{g}_{Na} = 17 \mu S$, $\bar{g}_K = 18 \mu S$, peso sináptico Pre-I = 0,03 nS, $p_{Kfuga} = 0,25$ y $p_{Nafuga} = 0,01$. (TABLA 5) (18).

TABLA 5
Parámetros neuronales y de membrana la neurona Pre-I

TIPO DE NEURONA	\bar{g}_{Na} nS	\bar{g}_{Nap} nS	\bar{g}_K nS	Peso de sinapsis Pre - I	P Na	\bar{g}_L nS
Pre-I	170	5.0	180	0.03	0.01	2.5

La termodependencia se evaluó realizando todos los experimentos a tres temperaturas diferentes equivalentes a situaciones clínicas, es decir: 37°C como normotermia, 35°C como hipotermia y 40°C como hipertermia.

En cada experimento se procedió al conteo de los potenciales de acción (espigas) y de sus amplitudes durante la fase tónica de descarga neuronal. Para ello se obtuvo los valores mediante cuantificación digital expresado como conteo absoluto de las espigas durante los 1000 ms que duró la fase de descarga, mientras que la amplitud se expresó como la media aritmética de la amplitud del potencial de acción medido desde el nivel del potencial de reposo hasta el sobretiro expresado en milivoltios, de todos los potenciales registrados durante el mismo período.

Recolección de datos:

El número de espigas y amplitud de las mismas fueron recolectados junto con la actividad sináptica modificada según la dosis equivalente del fármaco y la temperatura en que se realizó el experimento, directamente en una hoja de datos digital en formato libre de texto (.txt) lo cual permite su lectura directa por el paquete de análisis estadístico usado (*vide infra*).

Estadística:

El procesamiento de los datos se realizó con el programa estadístico PAST Paleontological Statistics, Version 3.25 de la Universidad de Oslo (74), el cual es de libre disponibilidad.

Los valores obtenidos para cada serie de modificación del peso sináptico equivalente a dosis de cada droga se compararon multivariadamente mediante el test de distribución libre de Kruskal-Wallis con análisis post-hoc test de Mann-Whitney considerándose todas las combinaciones posibles. Las curvas dosis-respuesta fueron analizadas por regresión polinómica eligiéndose su orden (típicamente entre 1 y 2) de acuerdo a la curva de mejor ajuste. El criterio de mejor ajuste se basó en el mayor coeficiente de regresión de Pearson r , en caso de diferencias en r menores a 0,05 entre los valores de orden polinomial siempre se seleccionó el modelo lineal (orden 1) para la curva de ajuste. En caso de significancia estadística se calculó la ecuación

que define el mejor ajuste. Se asignó como nivel de significación $p < 0,05$ para todos los test.

Financiamiento

El Centro de Biofísica y Neurociencia de la Facultad de Ciencias de la Salud, de la Universidad de Carabobo dispuso de los recursos y capacidad instalada necesarios para el desarrollo del presente proyecto.

Conflicto de Interés

El Autor y el Tutor declaran la ausencia de conflictos de interés.

CAPITULO IV

RESULTADOS

En condiciones controles el modelo de neurona Pre-I generó potenciales de acción con la fase tónica característica de dicha neurona (*figura 7*) que se mantienen mientras perdure su asa de retroalimentación marcapaso y las aferencias excitatoria que en condiciones fisiológicas provienen de las neuronas aug-E y post-I (Fig. 6).

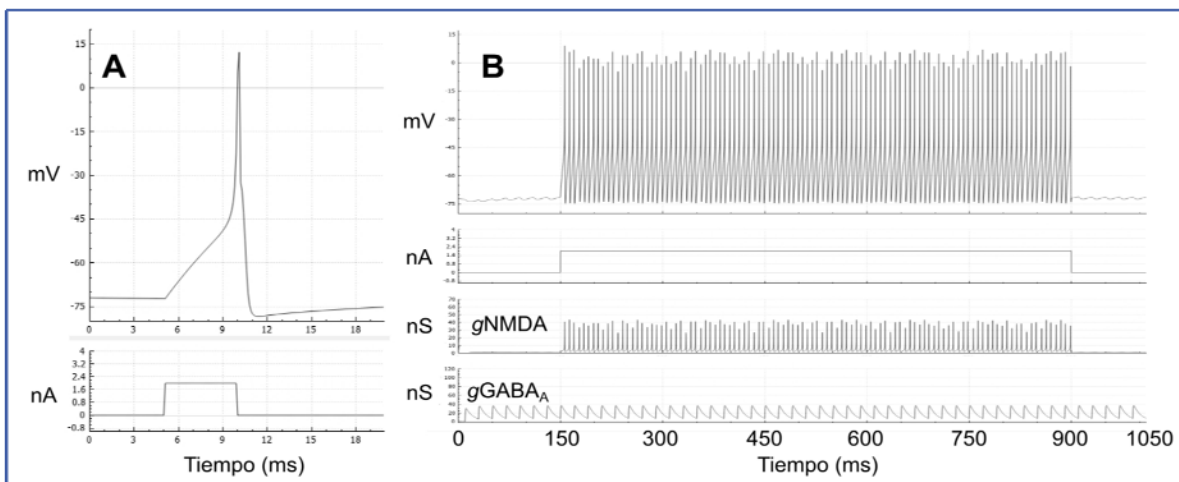


Figura 7. A: Morfología del potencial de acción generado *in machina* por el modelo de neurona Pre-I del Pre-BötC ante un pulso intracelular de corriente corto (5 ms; 2 nA) a 37°C y ausencia de medicación. B: Patrón de descarga tónica característica de la misma neurona en respuesta a una despolarización tónica de prueba de mayor duración (750ms; 2 nA), visualizándose en orden descendente, el pulso de estimulación (nA) y las conductancias (nS) NMDA y GABA_A de la membrana. Los parámetros del modelo se describen en la *Tabla 1*.

Efecto de dosis incrementales de agonistas GABA_A

Los patrones de descarga neuronal normal de la célula Pre-I se generaron con peso sináptico para los receptores GABA_A normalizado a 0,6 (60% máxima conductancia) y luego se registraron las descargas neuronales en dosis equivalentes progresivas de agonistas (benzodiazepinas, barbitúricos, opioides).

En la *figura 8* se representa los resultados de la descarga neuronal para el receptor GABA_A una vez introducido los datos y modificado las variables a estudiar, procediéndose entonces al contaje manual de las espigas y posterior medición en milivoltios.

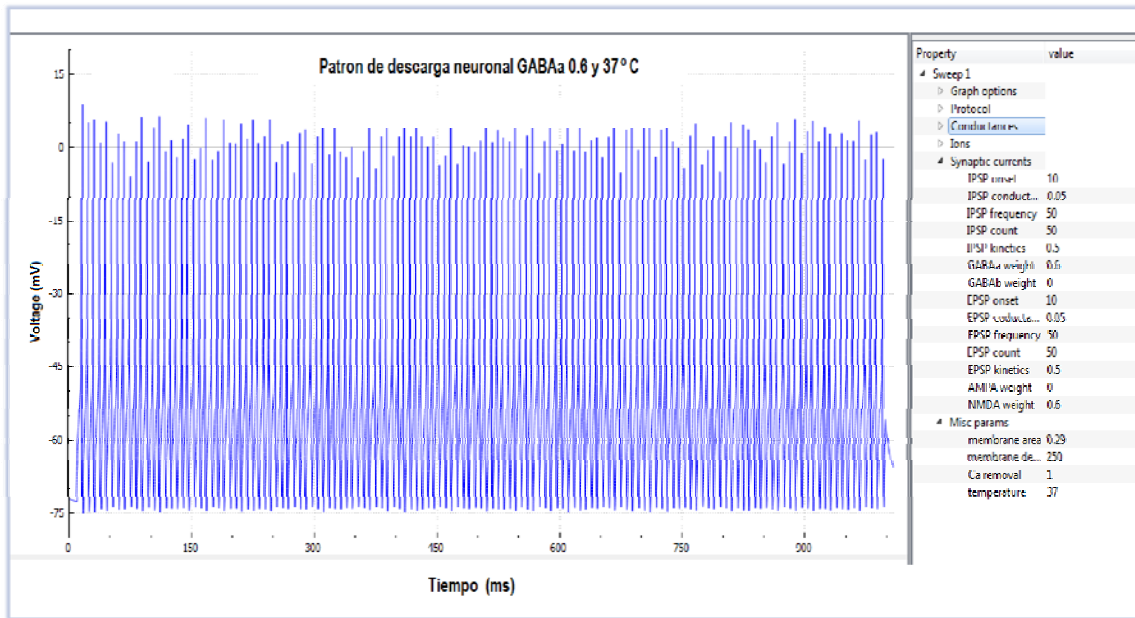


Figura 8: Patrón de descarga generada *in machina* por la neurona Pre-I del Pre-BötC durante su descarga fásica, con actividad sináptica dependiente de receptores GABA_A en condiciones normales (60%) y a 37°C. En el panel de la derecha se presentan los parámetros de corrientes sinápticas y de membrana neuronal utilizadas en el experimento.

El incremento del peso sináptico GABA_A indujo una reducción del número de espigas en la medida que se incrementa la actividad del receptor GABA_A, siendo más notorio en la hipotermia (*Figura 9*).

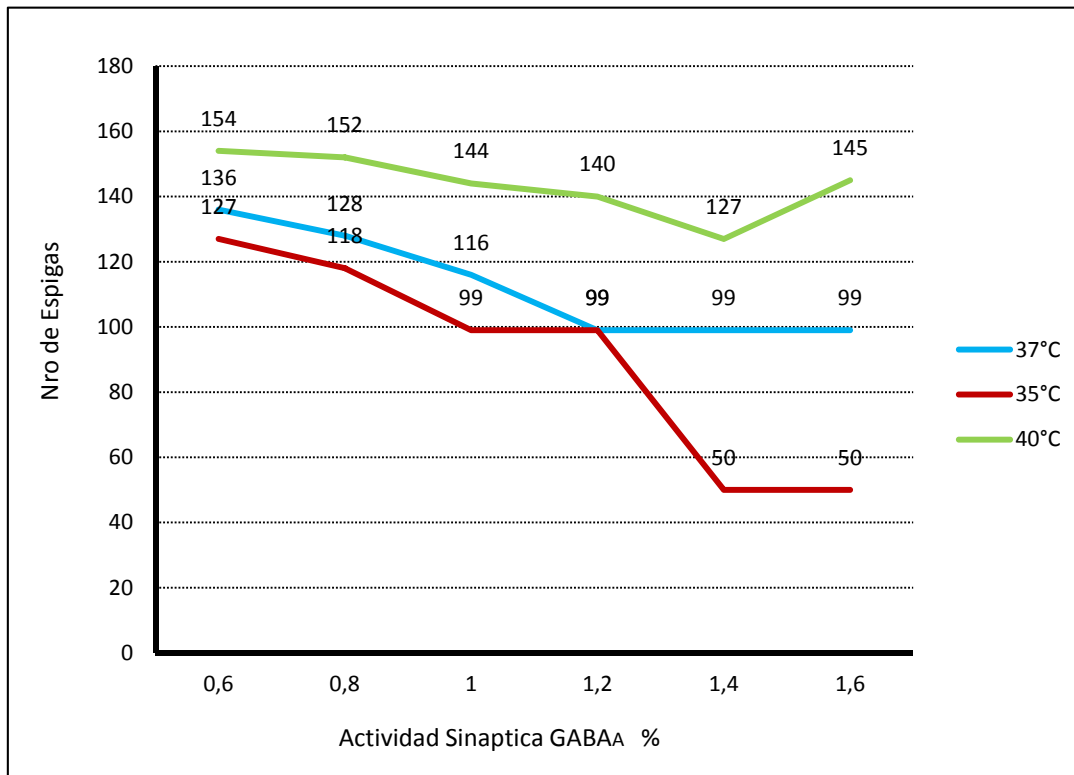


Figura 9: Efecto del aumento progresivo de la actividad sináptica dependiente de los receptores GABA_A (0,6 a 1,6 razón porcentual) a 37°C, 35°C o 40°C sobre el número de espigas generadas *in machina* durante la descarga fásica de la neurona Pre-I del Pre-BötC.

La disminución progresiva del número de espigas al aumentar la actividad GABA_A, encontrada en cada temperatura fué 35°C (-60,6%), 37°C (-27,2%) y 40°C (-5,8%).

La amplitud de las espigas de descargas de la neurona Pre-I también se redujo en la medida en que aumentó el peso sináptico GABA_A. Este efecto fue proporcional a la temperatura. Llama la atención una caída brusca de la amplitud de

las espigas a 5 mV, con el peso sináptico de 1.0 a 40°C, recuperándose la amplitud a 1.2 y 1.4 para luego volver a caer a 15 mV en el peso sináptico 1.6. (Figura 10). La amplitud de las espigas también se redujo siendo más variable y más intensa a 40°C (-75%) que a 35°C (-33,7%) y 37°C (-7,4%).

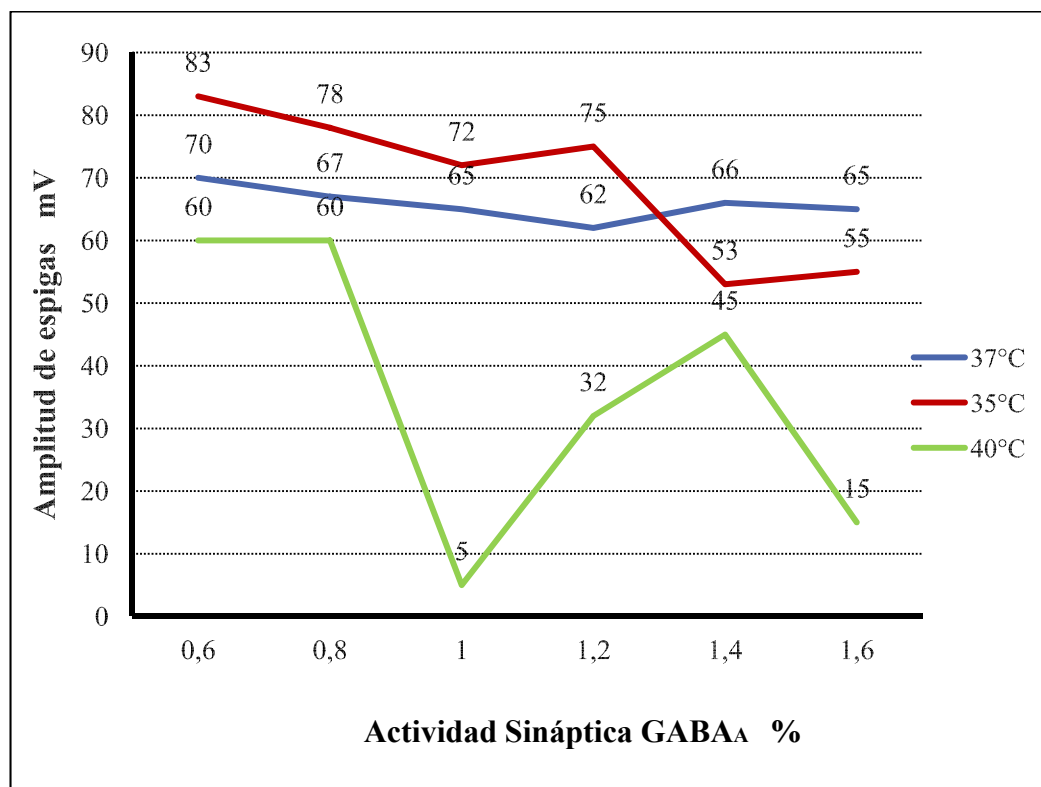


Figura 10: Efecto del aumento progresivo de la actividad sináptica dependiente de los receptores GABA_A (0,6 a 1,6 razón porcentual) a 37°C, 35°C o 40°C sobre la amplitud de las espigas generadas *in machina* durante la descarga fásica de la neurona Pre-I del Pre-BötC.

Efecto de dosis incrementales de antagonista NMDA

En la *Figura 11* presenta los resultados de los registros de la descarga neuronal Pre-I durante los experimentos de bloqueo progresivo de los receptores NMDA, iniciando con el patrón en condiciones normales de activación de dicho receptor (0,6) equivalente a 60% de actividad.

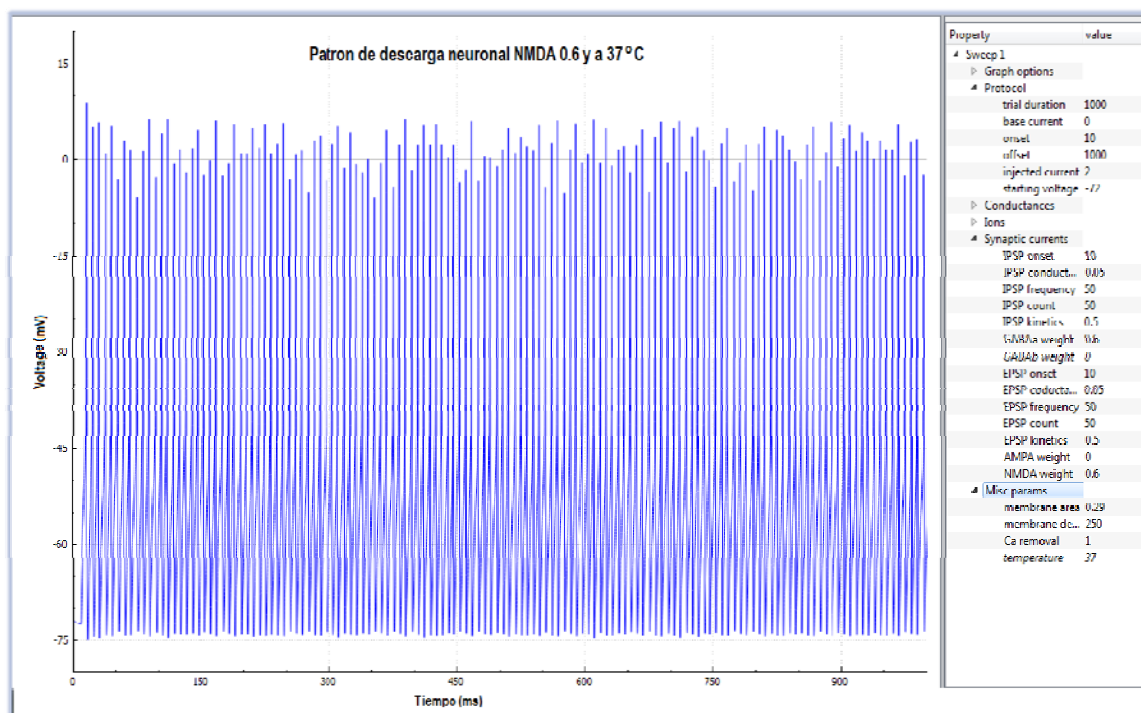


Figura 11: Patrón de descarga generada *in machina* por la neurona Pre-I del Pre-BötC durante su descarga fásica, con actividad sináptica dependiente de receptores NMDA en condiciones normales (60%) y a 37°C. En el panel de la derecha se presentan los parámetros de corrientes sinápticas y de membrana neuronal utilizadas en el experimento.

Apreciándose una disminución progresiva del número de espigas en la medida que disminuye el peso sináptico (*Figura 12*). Este efecto es inversamente proporcional a la temperatura (*Figura 12*). El antagonismo NMDA redujo menos intensamente el número de espigas siguiendo la secuencia: 35°C (-8,7%), 37°C (-7,2%) y 40°C (-3,9%).

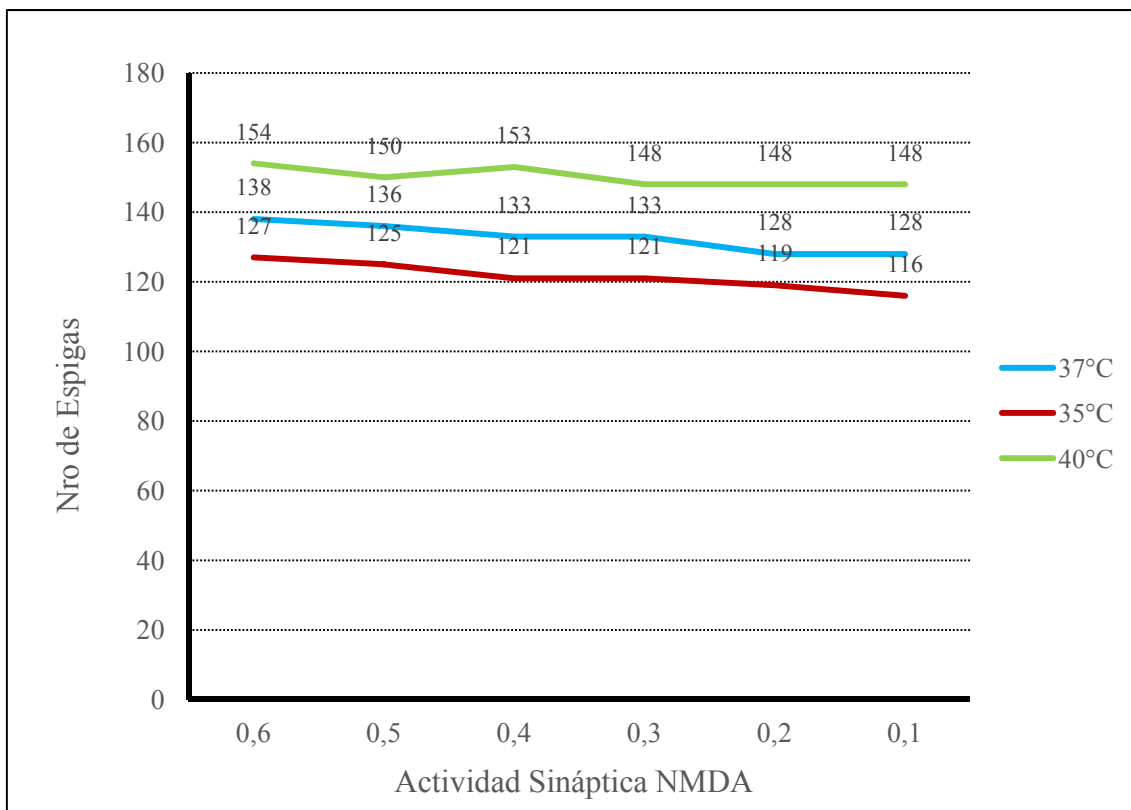


Figura 12: Efecto del bloqueo progresivo de la actividad sináptica dependiente de los receptores NMDA (0,6 a 0 razón porcentual) a 37°C, 35°C o 40°C sobre el número de espigas generadas *in machina* durante la descarga fásica de la neurona Pre-I del Pre-BötC.

Se evaluó la amplitud de las espigas de respuesta neuronal según el peso de la sinapsis y la modificación de la temperatura, observándose un aumento de la amplitud de las espigas con la hipotermia, y disminuyendo la amplitud con la temperatura. (*Figura 13*). La amplitud de las espigas se redujo siguiendo la secuencia de intensidad siguiente: 35°C (-9,6%), 37°C (-4,1%) y sin cambios a 40°C.

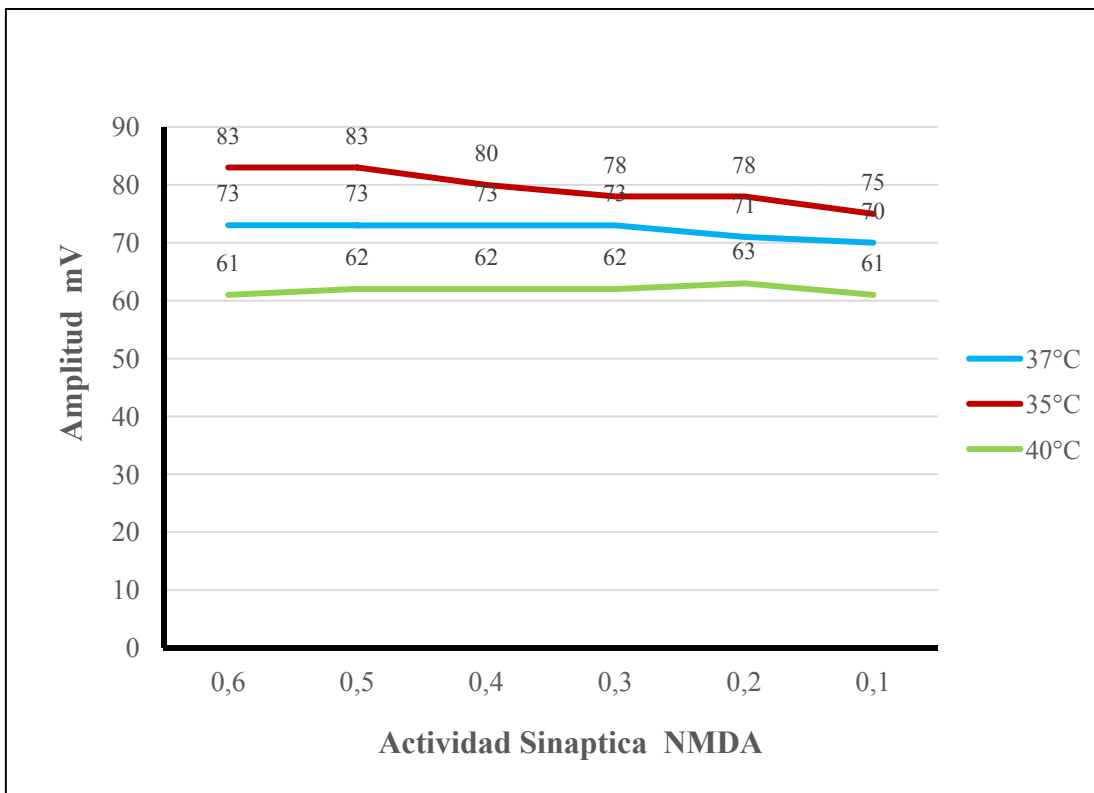


Figura 13: Efecto del bloqueo progresivo de la actividad sináptica dependiente de los receptores NMDA (0,6 a 0 razón porcentual) a 37°C, 35°C o 40°C sobre la amplitud de las espigas generadas *in machina* durante su descarga fásica de la neurona Pre-I del Pre-BötC.

Efectos de las benzodiazepinas y su termodependencia

En las *figuras 14, 15 y 16* se presenta el efecto de dosis progresivas de benzodiazepinas definidos mediante el aumento del peso sináptico relativo del receptor $GABA_A$, y debido a su termodependencia se tomó en cuenta las condiciones de normo (37°C), hipo (35°C), e hipertermia (40°C) sobre el número de espigas generadas por la descarga de la neurona Pre-I del Pre-BötC, apreciándose una disminución del número de espigas generadas de manera proporcional al incremento del tono gabaérgico, de igual manera la reducción de la temperatura genera una reducción progresiva de las espigas, mostrando curvas de ajuste polinomiales de segundo orden cuyas ecuaciones y pruebas estadísticas se presentan en la *Tabla 6*.

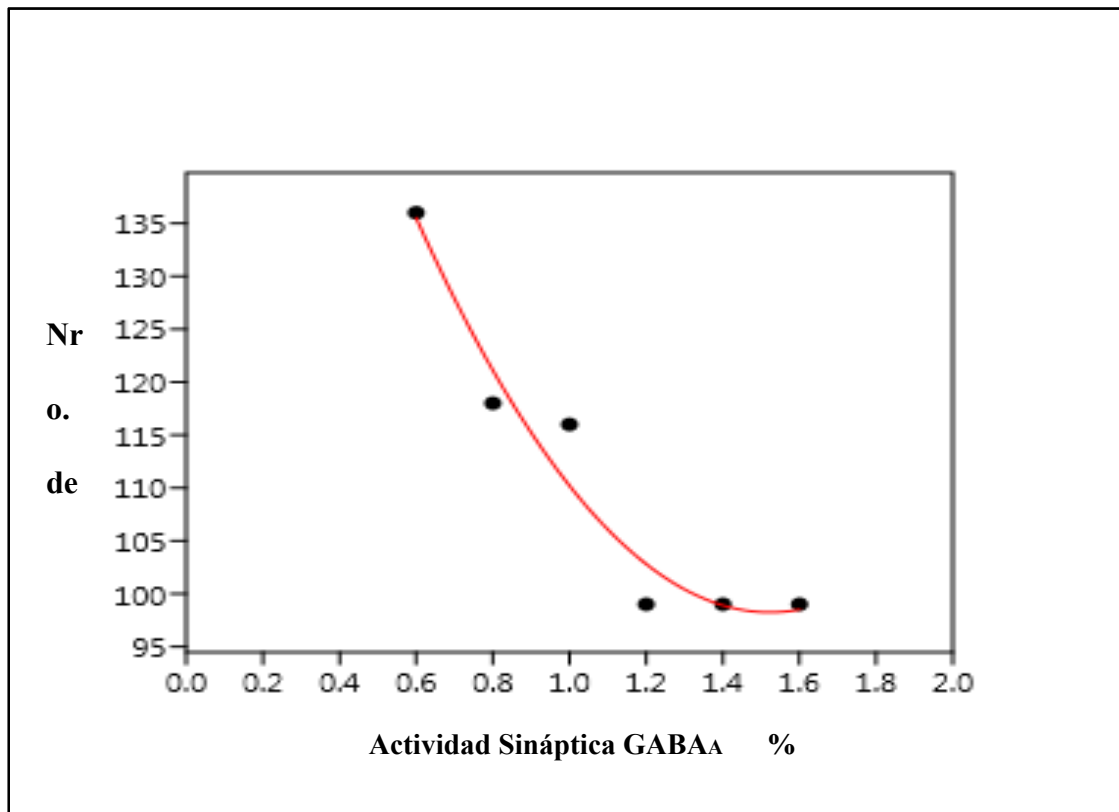


Figura 14: Regresión polinomial entre el número de espigas generadas por la neurona Pre-I del Pre-BötC durante su descarga fásica, y el aumento progresivo de la actividad sináptica dependiente de los receptores GABA_A (0,6 a 1,6 razón porcentual) a 37°C.

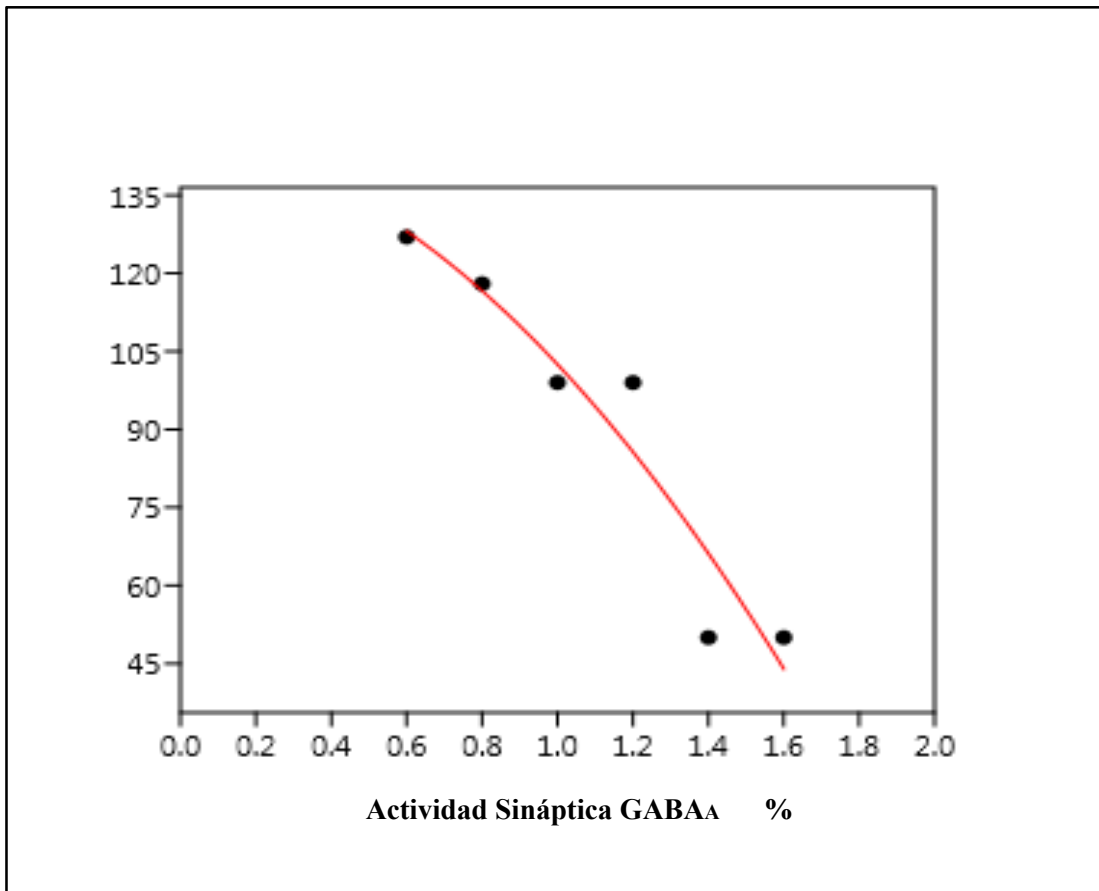


Figura 15: Regresión polinomial entre el número de espigas generadas por la neurona Pre-I del Pre-BötC durante su descarga fásica, y el aumento progresivo de la actividad sináptica dependiente de los receptores GABA_A (0,6 a 1,6 razón porcentual) a 35°C.

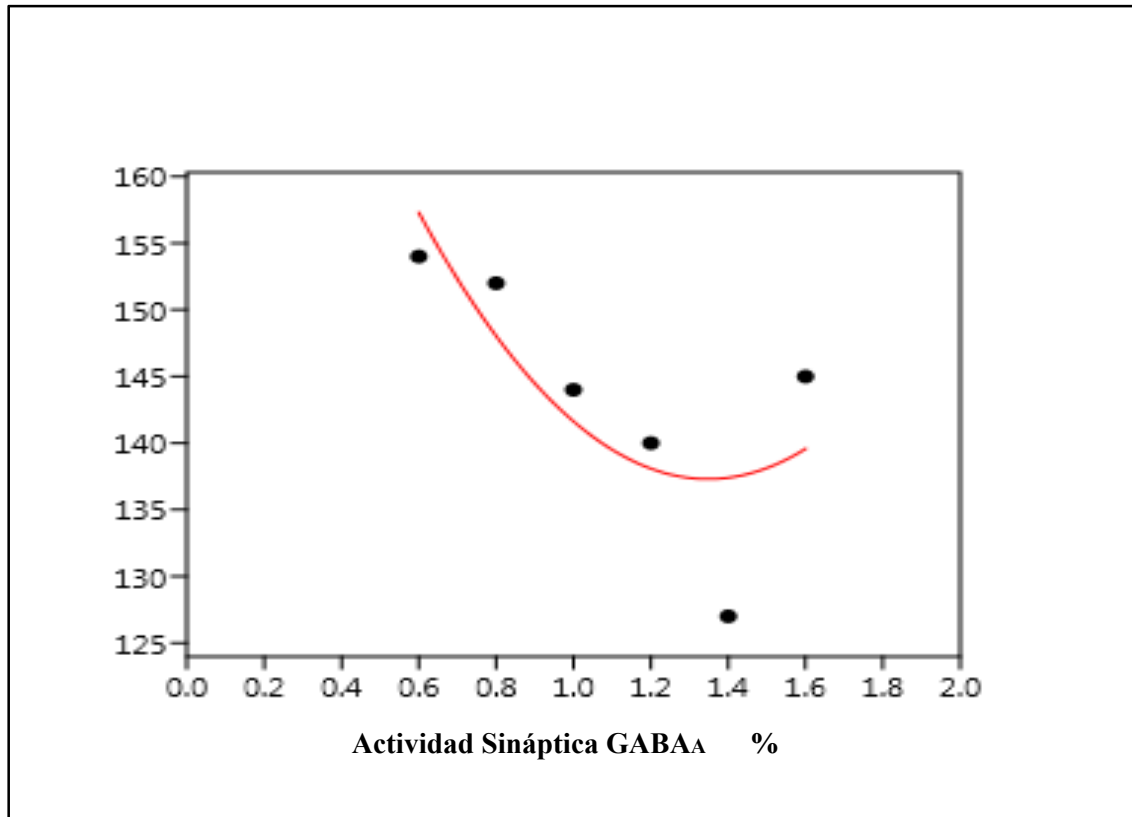


Figura 16: Regresión polinomial entre el número de espigas generadas por la neurona Pre-I del Pre-BötC durante su descarga fásica, y el aumento progresivo de la actividad sináptica dependiente de los receptores GABA_A (0,6 a 1,6 razón porcentual) a 40°C.

El análisis de la regresión polinomial al contaje de espigas de respuesta de los receptores GABA_A a 37, 35 y 40°C es estadísticamente significativos para 37 y 35°C $p < 0,011$ y $p < 0,02$ respectivamente, no así para 40°C. (Tabla 6)

Tabla 6: Análisis del ajuste polinomial entre el contaje de espigas de la neurona Pre-I ante la actividad aumentada de los receptores GABA_A (x en la ecuación de regresión)

Tipo de receptor y temperatura	Ecuación GABA _A /espigas	r	p
GABA _A 37°C	$43,73x^2 - 133,2x + 199,7$	0,95	0,01
GABA _A 35°C	$-33,48x^2 - 18,48x + 146,5$	0,91	0,02
GABA _A 40°C	$35,71x^2 - 96,29x + 202,2$	0,63	0,22 n.s.

En las *figuras* 16, 17 y 18 se presenta el efecto de dosis progresivas de benzodiazepinas definidos mediante el aumento del peso sináptico relativo del receptor GABA_A, y debido a su termodependencia se tomó en cuenta las condiciones de normo (37°C), hipo (35°C), e hipertermia (40°C) sobre la amplitud en mV de las descargas generadas por la neurona Pre-I del Pre-BötC. Al igual que con la frecuencia de las espigas, la amplitud de los potenciales de acción también se vió disminuida por el aumento del peso sináptico relativo del GABA_A a las temperaturas estudiadas

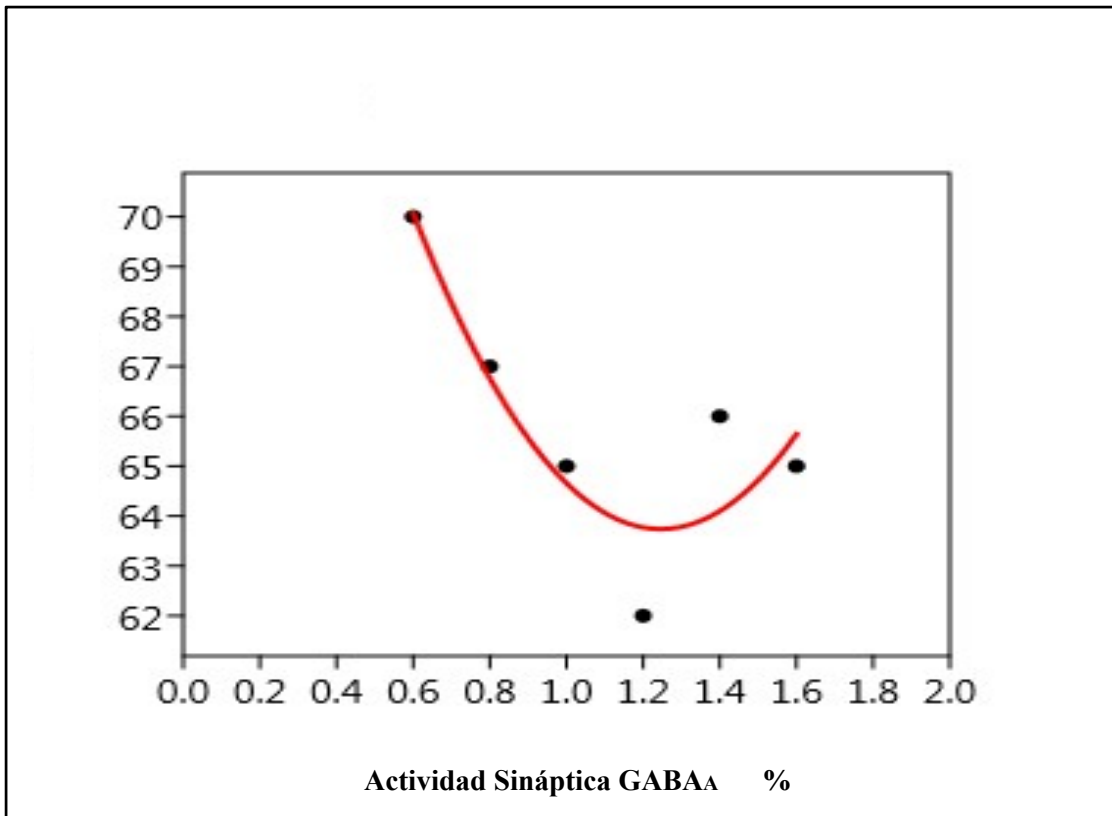


Figura 16: Regresión polinomial entre la amplitud de las espigas generadas por la neurona Pre-I del Pre-BötC durante su descarga fásica, y el aumento progresivo de la actividad sináptica dependiente de los receptores GABA_A (0,6 a 1,6 razón porcentual) a 37°C.

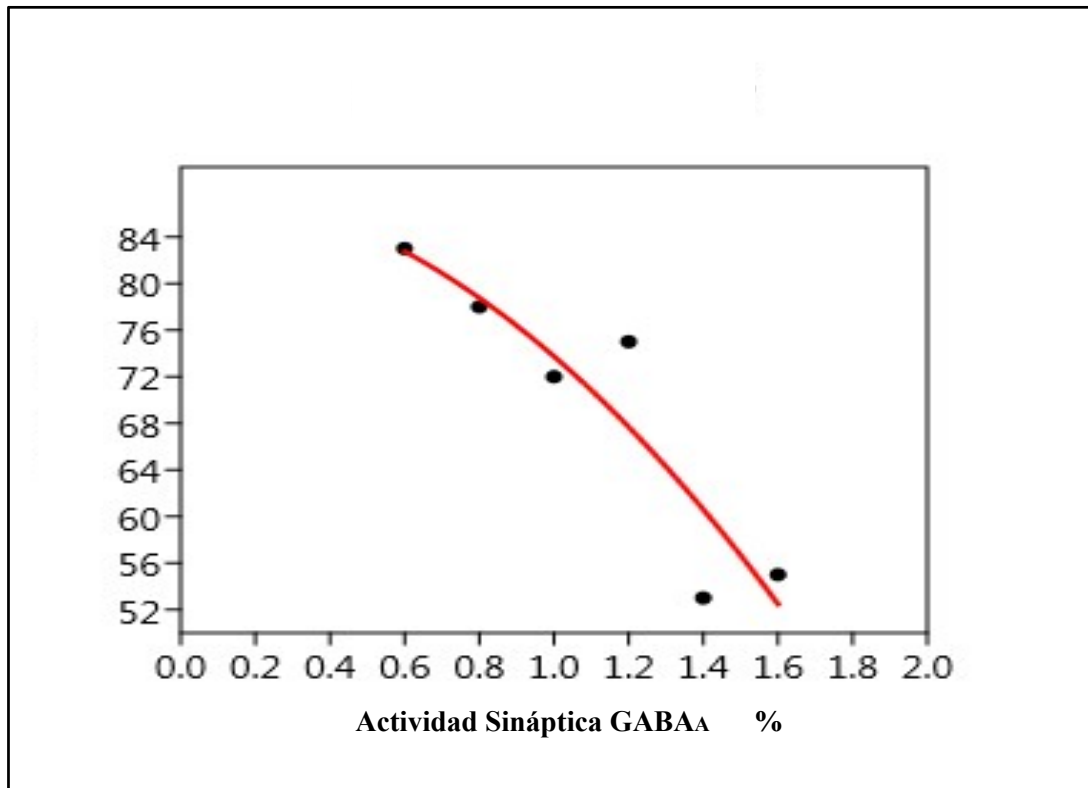


Figura 17: Regresión polinomial entre la amplitud de las espigas generadas por la neurona Pre-I del Pre-BötC durante su descarga fásica, y el aumento progresivo de la actividad sináptica dependiente de los receptores GABA_A (0,6 a 1,6 razón porcentual) a 35°C

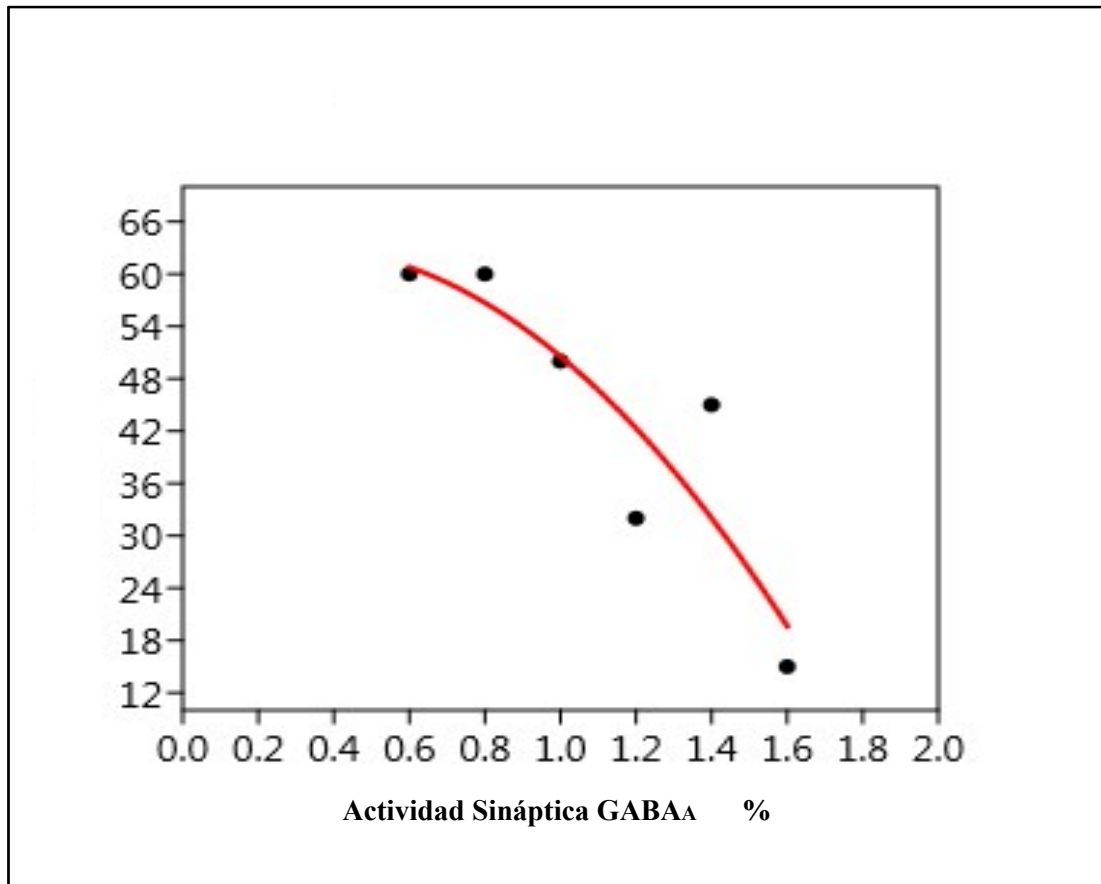


Figura 18: Regresión polinomial entre la amplitud de las espigas generadas por la neurona Pre-I del Pre-BötC durante su descarga fásica, y el aumento progresivo de la actividad sináptica dependiente de los receptores GABA_A (0,6 a 1,6 razón porcentual) a 40°C

De igual manera la reducción de la temperatura genera una aparente reducción progresiva de ambos parámetros, mostrando curvas de ajuste polinomiales de segundo orden, sin embargo sólo la curva correspondiente a los experimentos realizados a 35°C fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$) no así para las obtenidas a 37°C ó 40°C. (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis del ajuste polinomial entre la amplitud de las espigas de descarga neuronal de Pre-I ante la actividad aumentada de los receptores GABA_A (x en la ecuación de regresión)

Tipo de receptor y temperatura	Ecuación GABA _A /mV	r	p
GABA _A 37°C	$15,18x^2 - 37,82x + 87,3$	0,79	0,09 n.s.
GABA _A 35°C	$-12,95x^2 - 1,804x + 88,49$	0,84	0,042
GABA _A 40°C	$-25,89x^2 + 15,82x + 60,61$	0,80	0,09 n.s.

A manera de resumen la *figura 19* muestra los cambios en el patrón de descarga tónica (número de espigas) y amplitud del potencial de acción (mV) de la neurona Pre-I del Pre-BötC ante la simulación de dosis progresivas de benzodiazepinas (modificación del peso sináptico relativo de GABA_A) en condiciones de hipo (35°C), normo (37°C) e hipertermia (40°C). Las escalas se presentan similares con fines de comparación. Es de hacer notar que en condiciones de hipo o hipertermia las curvas de cambio tanto de amplitud como del número de descargas, mostraron una mayor pendiente al compararlas con los mismos cambios

sinápticos en normotermia. La hipertermia se caracterizó por la combinación de una reducción en la amplitud del potencial de acción así manteniéndose la frecuencia de descarga para el receptor $GABA_A$.

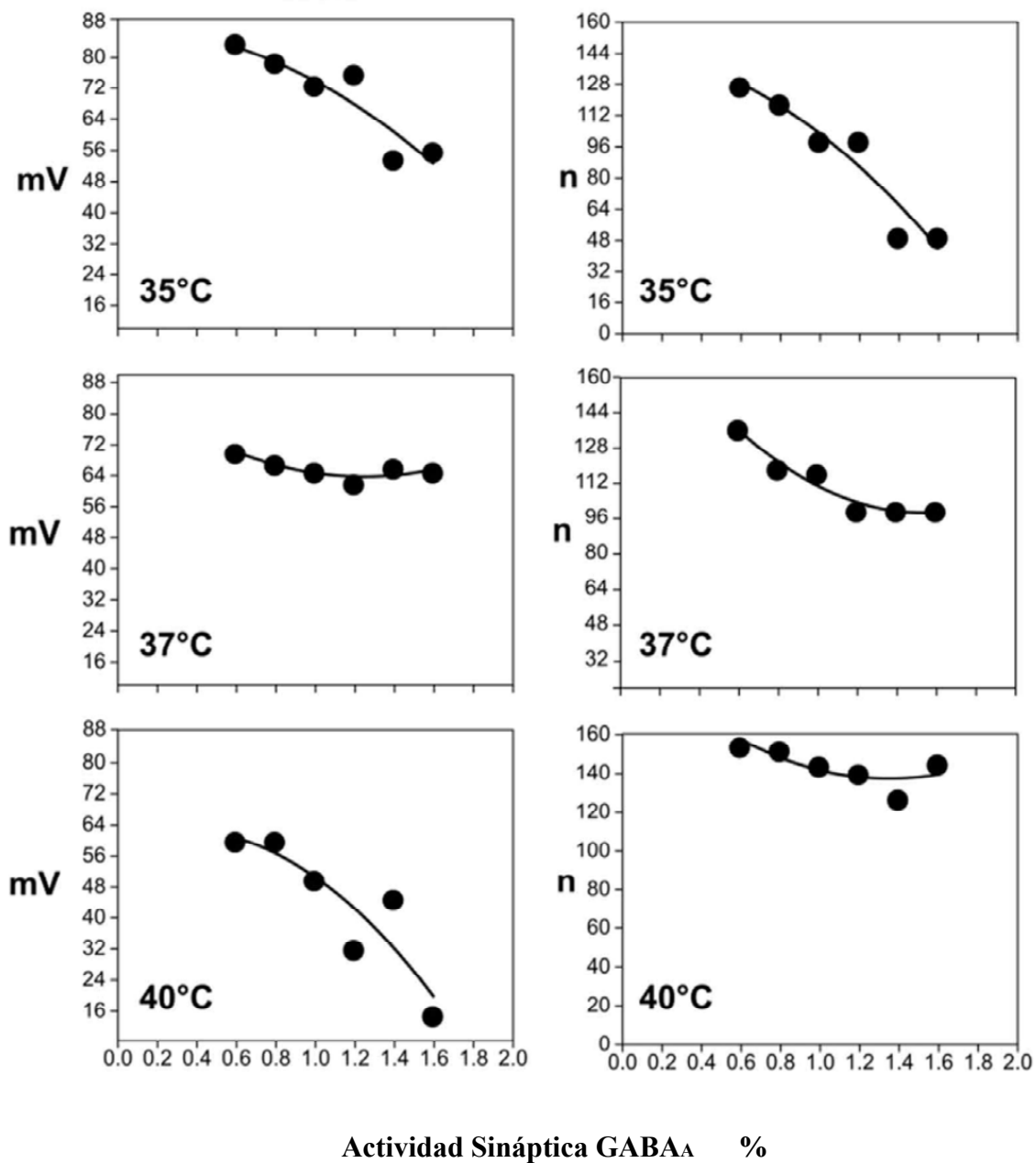


Figura 19: Efecto del incremento progresivo de la actividad sináptica dependiente de receptores GABA_A sobre la amplitud del potencial de acción (mV) la cantidad de espigas generadas (n) por la neurona Pre-I en condiciones de hipo (35°C), normo (37°C) e hipertermia (40°C). La actividad sináptica se expresa como razón porcentual de la máxima conductancia iónica (cloruro) siendo el valor normal 0,6. Las líneas negras corresponden a las curvas de mejor ajuste.

Efecto de la ketamina y su termodependencia

En las *Figuras 20, 21 y 22* se presenta el efecto de dosis progresivas de ketamina definidas mediante la disminución del peso sináptico relativo del receptor NMDA, y debido a su termodependencia se tomó en cuenta las condiciones de normo (37°C), hipo (35°C), e hipertermia (40°C) sobre el número de espigas generadas por la descarga de la neurona Pre-I del Pre-BötC. Se observa una disminución del número de espigas manera proporcional a la disminución del tono glutamatérgico.

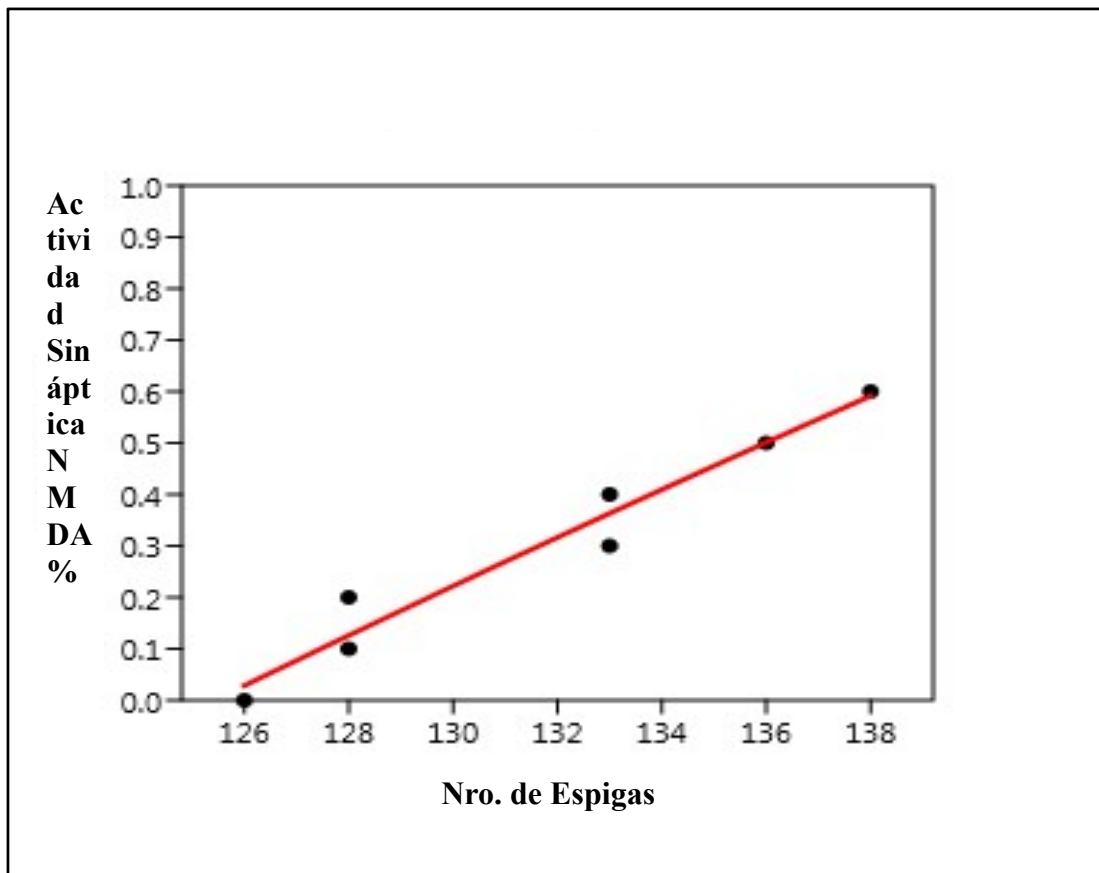


Figura 20: Regresión polinomial entre del número de espigas generadas por la neurona Pre-I del Pre-BötC durante su descarga fásica, y la disminución progresiva de la actividad sináptica dependiente de los receptores NMDA (0,0 a 0,6 razón porcentual) a 37°C.

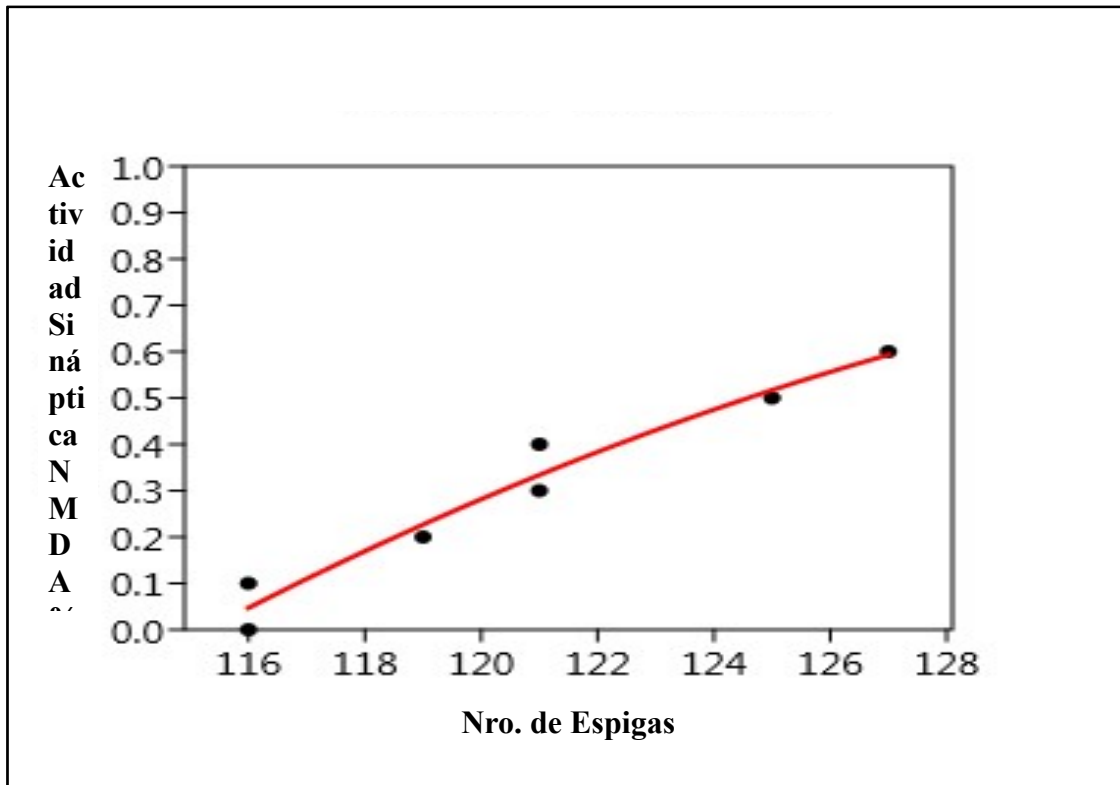


Figura 21: Regresión polinomial entre del número de espigas generadas por la neurona Pre-I del Pre-BötC durante su descarga fásica, y la disminución progresiva de la actividad sináptica dependiente de los receptores NMDA (0,0 a 0,6 razón porcentual) a 35°C.

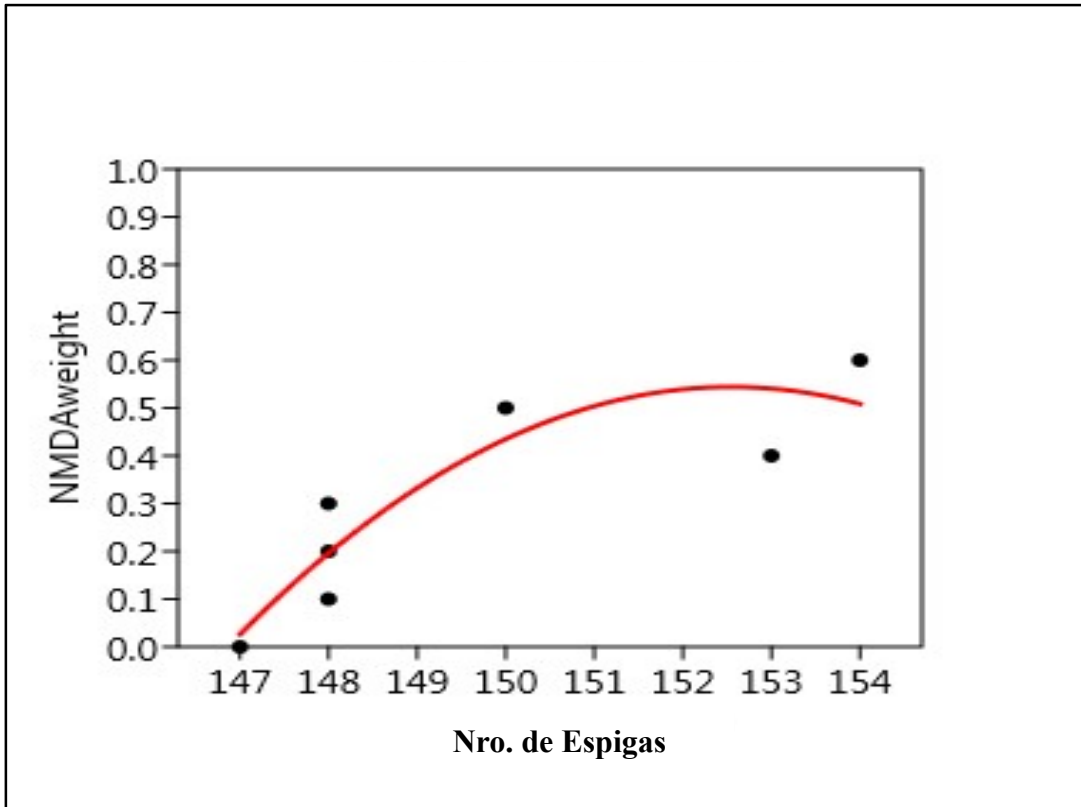


Figura 22: Actividad sináptica del NMDA durante su descarga fásica, y la disminución progresiva de la actividad sináptica dependiente de los receptores NMDA (0,0 a 0,6 razón porcentual) a 40°C.

ona Pre-I del Pre-BötC durante su descarga fásica, y la disminución progresiva de la actividad sináptica dependiente de los receptores NMDA (0,0 a 0,6 razón porcentual) a 40°C.

De igual manera la reducción de la temperatura genera también una reducción de las descargas de la neurona, mostrando curvas de ajuste polinomiales de segundo orden siendo altamente significativa para 37 y 35°C $p < 0,001$ en ambas pero no significativo para 40°C, las ecuaciones y pruebas estadísticas se presentan en la *tabla 8*.

Tabla 8: Análisis del ajuste polinomial entre el conteje de espigas de la neurona Pre-I (x en la ecuación) y el bloqueo progresivo de los receptores NMDA.

Tipo de receptor y temperatura	Ecuación NMDA/espigas	<i>r</i>	p
NMDA 37°C	$5,952x^2+16,79x+125,9$	0,96	0,001
NMDA 35°C	$13,1x^2+11,07x+115,7$	0,97	0,001
NMDA 40°C	$11,9x^2+3,571x+147,1$	0,73	0,071 n.s.

En la *figura 23, 24 y 25*, se presenta el efecto de dosis progresivas de la ketamina definidas mediante la disminución del peso sináptico relativo del receptor NMDA, y debido a su termodependencia se tomó en cuenta las condiciones de normo (37°C), hipo (35°C), e hipertermia (40°C) sobre la amplitud en mV de las descargas generadas por la neurona Pre-I del Pre-BötC. Se aprecia una disminución de la amplitud de las descargas neuronales a 35 y 37°C, que no se vio en la hipertermia.

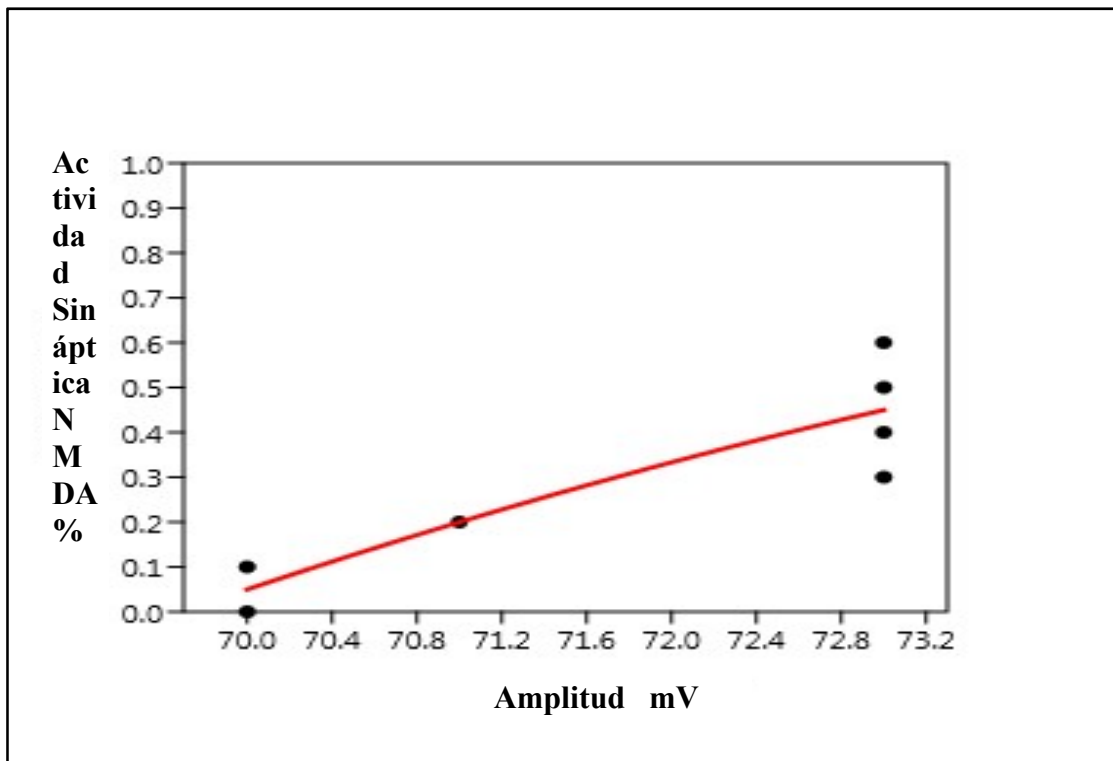


Figura 23: Regresión polinomial entre la amplitud de las espigas generadas por la neurona Pre-I del Pre-BötC durante su descarga fásica, y la disminución progresiva de la actividad sináptica dependiente de los receptores NMDA (0,0 a 0,6 razón porcentual) a 37°C.

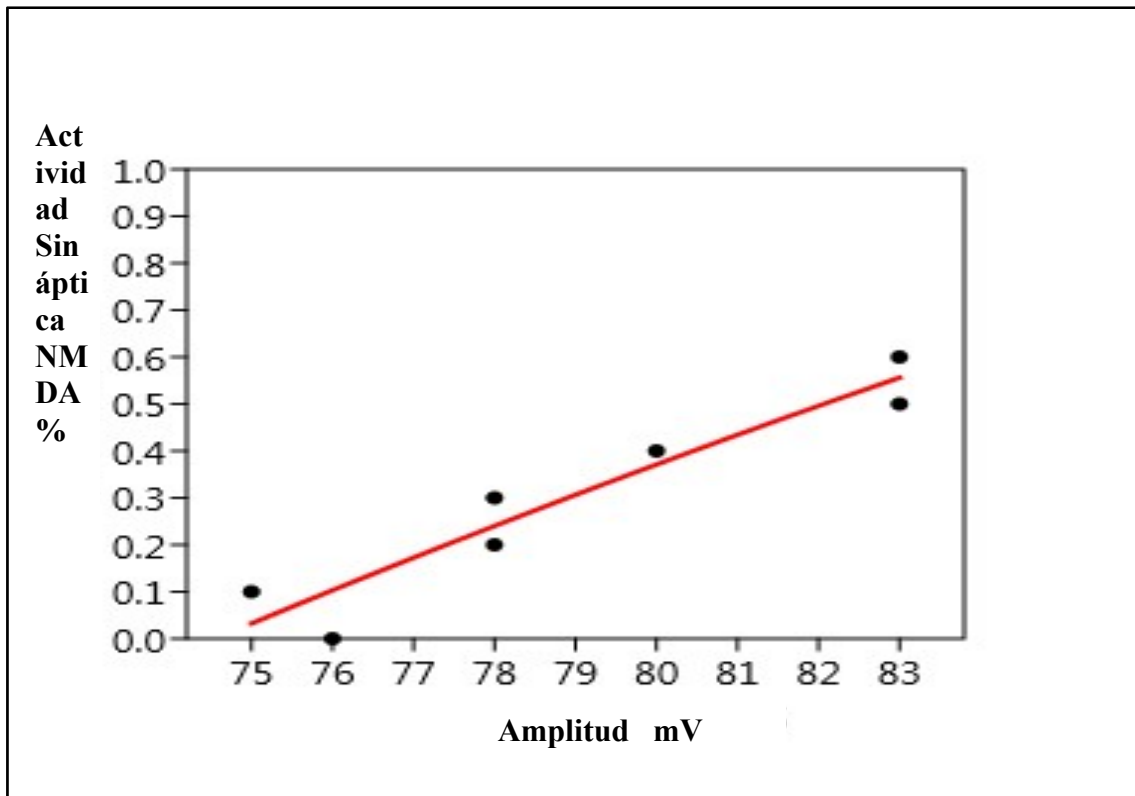


Figura 24: Regresión polinomial entre la amplitud de las espigas generadas por la neurona Pre-I del Pre-BötC durante su descarga fásica, y la disminución progresiva de la actividad sináptica dependiente de los receptores NMDA (0,0 a 0,6 razón porcentual) a 35°C.

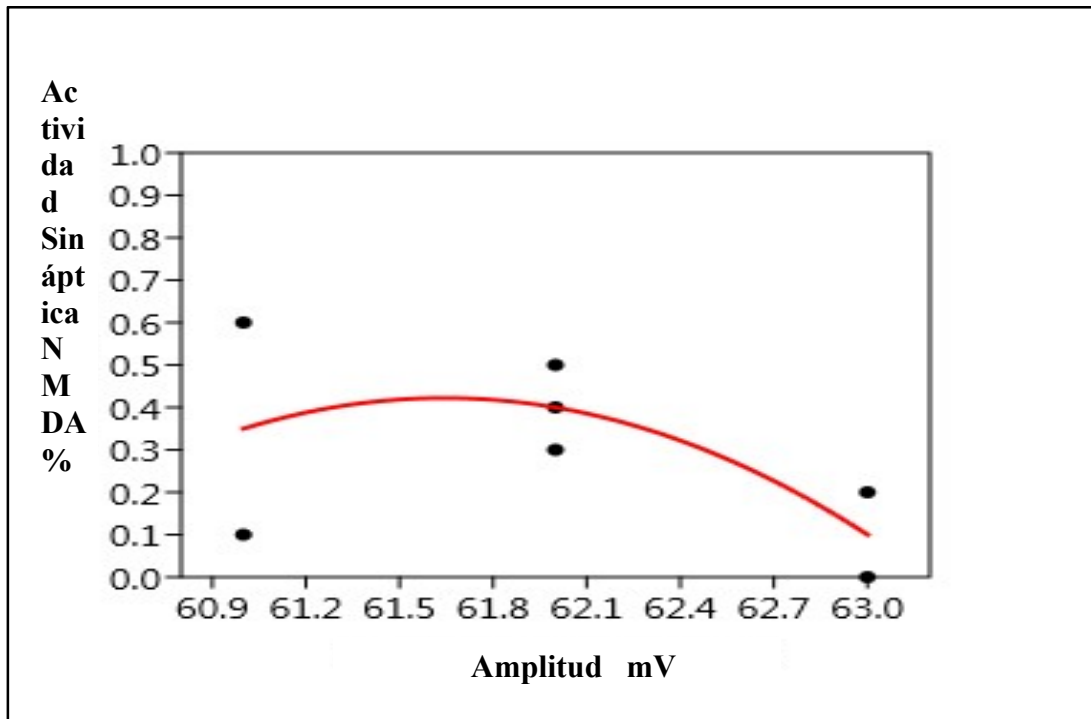


Figura 25: Regresión polinomial entre la amplitud de las espigas generadas por la neurona Pre-I del Pre-BötC durante su descarga fásica, y la disminución progresiva de la actividad sináptica dependiente de los receptores NMDA (0,0 a 0,6 razón porcentual) a 40°C.

En cuanto a la amplitud mostrada por las espigas generada por la neurona Pre I al modificar los receptores NMDA se pudo apreciar que fue significativo a 37°C $p < 0.03$ y altamente significativo a 35°C $p < 0.008$, no así para 40°C $p < 0.56$, mostrando curvas de ajuste polinomiales de segundo orden, cuyas ecuaciones y pruebas estadísticas se presentan en la *tabla 9*.

Tabla 9: Análisis del ajuste polinomial entre la amplitud de las espigas de la neurona Pre-I (x en la ecuación) y el bloqueo progresivo de los receptores NMDA.

Tipo de receptor y temperatura	Ecuación NMDA/mV	r	p
NMDA 37°C	$-10,71x^2 + 12,5x + 69,5$	0,88	0,015
NMDA 35°C	$10,71x^2 + 7,5x + 75,36$	0,92	0,006
NMDA 40°C	$-3,571x^2 + 0,3571x + 62,36$	0,25	0,562 n.s.

A manera de resumen en la *figura 26* se muestran los cambios en el patrón de descarga tónica (número de espigas) y amplitud del potencial de acción (mV) de la neurona Pre-I del Pre-BötC ante la simulación de dosis progresivas de Ketamina (peso sináptico relativo de NMDA) en condiciones de hipo (35°C), normo (37°C) e hipertermia (40°C). Las escalas se presentan similares con fines de comparación. Es de hacer notar que en condiciones de hipotermia las curvas de cambio tanto de amplitud como del número de descargas, mostraron una mayor pendiente al

compararlas con los mismos cambios sinápticos en normotermia, sin embargo este efecto no se observó en la manipulación del peso sináptico en hipertermia (40°C).

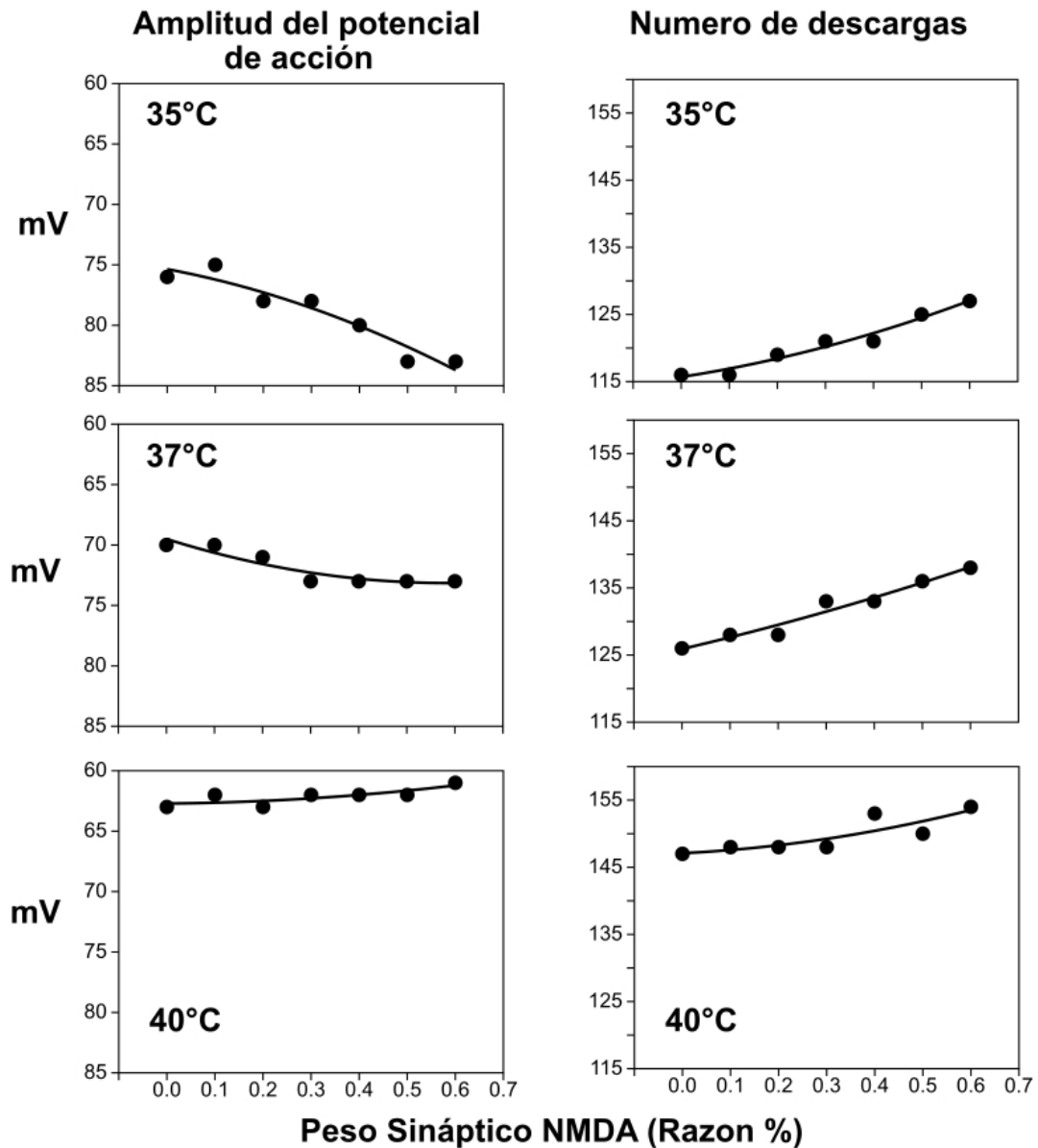


Figura 26: Efecto del bloqueo progresivo de la actividad sináptica dependiente de receptores NMDA sobre la amplitud del potencial de acción (mV) la cantidad de espigas generadas (n) por la neurona Pre-I en condiciones de hipo (35°C), normo (37°C) e hipertermia (40°C). La actividad sináptica se expresa como razón porcentual de la máxima conductancia iónica (Na^+ y Ca^{++}) siendo el valor normal 0,6. Las líneas negras corresponden a las curvas de mejor ajuste.

La evaluación de la termodependencia de los efectos de todos los incrementos en la actividad GABA_A o de todas las reducciones en la actividad NMDA sobre las espigas generadas por la neurona Pre-I en fase tónica de excitación se presenta en la figura 27, determinándose un mayor y significativo efecto de las dosis agonistas GABA_A o de antagonista NMDA en condiciones de hipertermia (40°C) tanto para el número como la amplitud de las espigas generadas por la neurona Pre-I. Paradójicamente, este efecto reduce la acción hiperpolarizante tanto de los agonistas GABA_A como del antagonista NMDA (Figura 27).

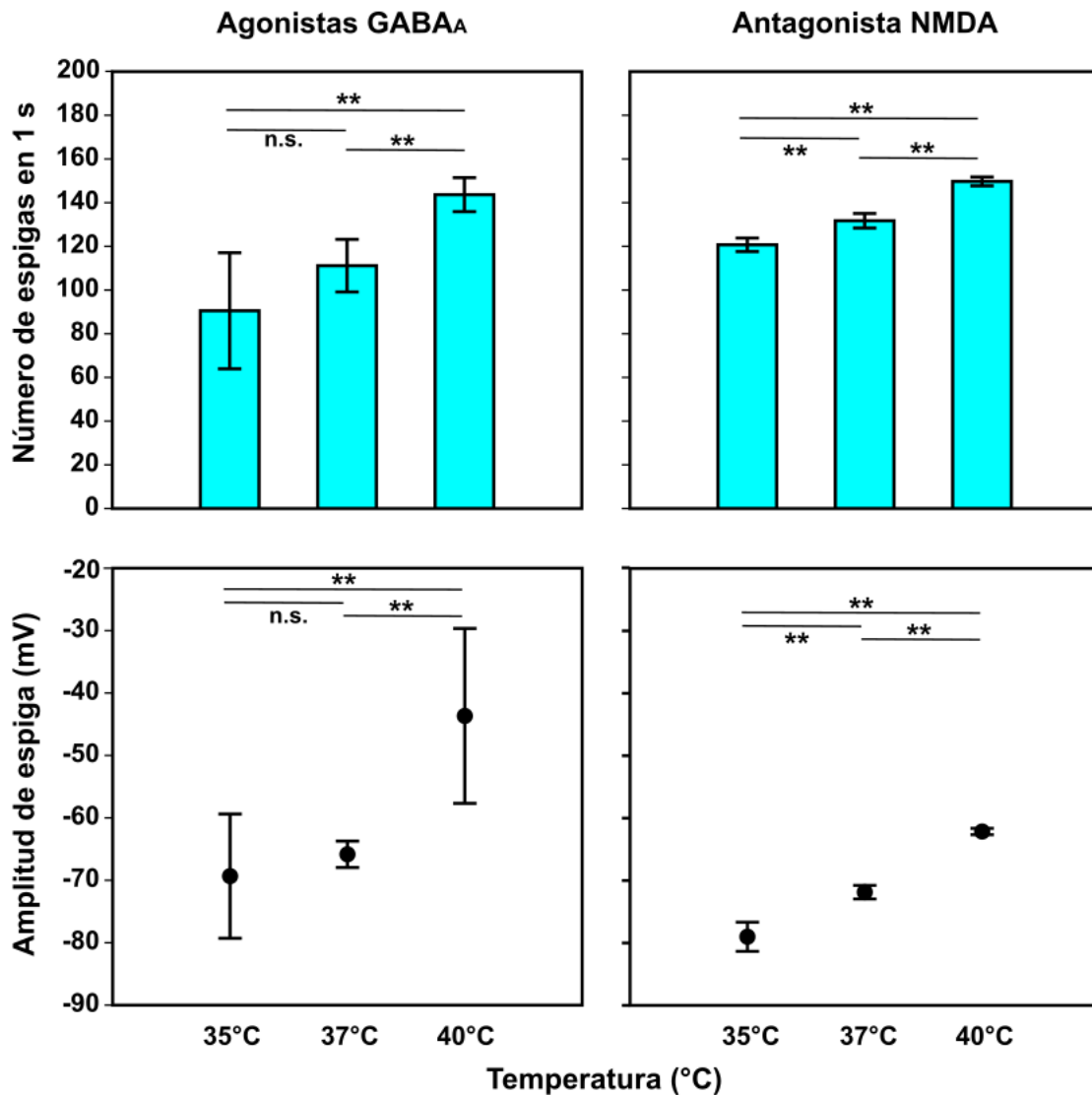


Figura 27: Efecto de todos los incrementos en la actividad GABA_A (panel izquierdo) o de todas las reducciones en la actividad NMDA (panel derecho) sobre el número (panel superior) y amplitud (panel inferior) de las espigas generadas por la neurona Pre-I en fase tónica de excitación, evaluadas en hipotermia (35°C), normotermia (37°C) e hipertermia (40°C). En todos los gráficos se representa la media aritmética con los intervalos de confianza al 95%. Las comparaciones se realizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis con test de Mann-Whitney como post hoc. *** p<0,01; * p<0,05; n.s. no significativo.

En contraste, el receptor NMDA durante la hipotermia generó incrementos significativos, pero de menor intensidad. En condiciones de hipertermia, el efecto sobre $GABA_A$ denota nuevamente un intenso cambio a partir de incremento en 20% del peso sináptico tanto en las curvas de amplitud del potencial de acción como del número de descargas, sin embargo este efecto no se observó en la manipulación del peso sináptico del receptor NMDA.

CAPITULO V

DISCUSION

En el presente estudio se evaluó *in machina* un modelo de neurona funcional del tipo Pre-I del Pre-BötC del tallo cerebral, como blanco farmacológico de dosis incrementales de drogas agonistas del receptor GABA_A como las benzodiazepinas, barbitúricos u opioides, o de una droga antagonista de los receptores NMDA, en ambos casos de uso clínico frecuente en especial en anestesiología en condiciones de hiper, normo o hipotermia para emular condiciones que frecuentemente se presentan durante el acto anestésico clínico y así describir los cambios en los patrones de descarga neuronal que pueden afectar el ritmo y patrón respiratorio.

Los efectos hipnóticos y sedativos de las benzodiazepinas se pueden contrastar con los efectos eufóricos e hipnóticos del alcohol etílico y de barbitúricos, que están mediados por una activación en la neurotransmisión inhibitoria, vía receptor ionotrópico GABA_A, produciendo un aumento del influjo intracelular del ion cloruro, teniendo como resultado un incremento del potencial negativo y conduciendo a la hiperpolarización neuronal. Este efecto inhibitorio afecta centros corticales provocando sedación, sueño profundo, inconciencia, estupor, llegando al coma semejante a la anestesia general, (75,76,77). Adicionalmente, se deprimen los centros bulbares (vasomotor y respiratorio) causando depresión respiratoria que

podiese llegar hasta la apnea hecho muy temido en medicina si no se sabe o no se cuentan con los medios adecuados para dar soporte ventilatorio a los pacientes que súbita o progresivamente puedan presentar la apnea (78).

En el control del ciclo respiratorio, la inhibición de los receptores para glutamato, N-metil-D-aspartato (NMDA) como el que podemos apreciar en los pacientes que están bajo los efectos de la ketamina, las neuronas del núcleo Bötzinger del tipo Post-inspiratorias (Post-I) ejercen una acción inhibitoria de carácter GABAérgica sobre las neuronas Pre-I del Pre-BötC, (1) desacelerando las descargas neuronales y retrasando la activación de este tipo de neuronas, (28,60) que tienen una acción excitatoria de carácter glutamatérgica (NMDA) tanto sobre neuronas motoras del nervio hipogloso como sobre las neuronas excitatorias de rampa inspiratoria del núcleo respiratorio rostral (27,29).

En relación al mecanismo de acción de los opioides, tienen capacidad de activar tres tipos de receptores del tipo metabotrópico: μ , κ , δ . La acción sobre el receptor μ , activa una proteína G acoplada intracelularmente, incrementando la actividad de la enzima adenilciclasa y los niveles de AMPc el cual, aumenta la apertura de los canales de potasio y el eflujo de éste con el efecto hiperpolarizante, simultáneamente cierra el canal de calcio reduciendo el influjo de éste, generando un efecto hiperpolarizante (79) por lo cual en el presente estudio se consideraron potencialmente agonistas del efecto hiperpolarizante causado por las

benzodiazepinas, los barbitúricos y mediante un mecanismo diferente pero con el mismo efecto final hiperpolarizante, los opioides. Sin embargo, existen reportes que los opioides también ejercen efecto sobre activador del sistema dopaminérgico mesolímbico (80).

El modelo neuronal implementado en el presente estudio fue generado incorporando valores morfofuncionales reportados previamente y obtenidos de experimentos *in vivo e in vitro* tratando de lograr la mayor fidelidad a la realidad. A este respecto la morfología del potencial de acción del modelo y su respuesta ante la inyección de corriente despolarizante tanto de corta como de larga duración, las cuales emulan las aferencias tónicas del tallo cerebral, se ajustaron a los registros reportados por Ryback, Molkov entre otros autores (21,22,23) lo cual respalda la validez del modelo implementado.

La neurona Pre-I expresa en su membrana receptores tanto del tipo GABA_A como NMDA (17,18) que son precisamente los blancos farmacológicos de drogas como las benzodiazepinas, barbitúricos y ketamina de uso rutinario en la clínica anestesiológica. La adecuada función e interacción entre los diferentes núcleos de control respiratorio dependen del equilibrio entre la excitación generada primordialmente por el glutamato mediante sus receptores NMDA y la contraparte inhibitoria aportada por el GABA a través de sus receptores GABA_A (21,22,23). Si bien el efecto buscado durante el acto anestésico es el de disminuir el estado de conciencia al reducir la actividad cortical cerebral, la presencia de los mismos

receptores de membrana en el tallo cerebral y especialmente en los centros de control respiratorio como el Pre-BötC y sus neuronas Pre-I, hace que el efecto de estas drogas afecte el patrón respiratorio.

La reducción de la actividad neuronal podría expresarse ya sea con una reducción en la amplitud del potencial de acción y/o en la reducción del número de descargas generadas durante una estimulación tónica.

Desde el punto de vista neurofisiológico, el mismo efecto puede ser consecuencia de un incremento de la inhibición (agonismo GABA al incrementar el influjo de cloruro vía receptor $GABA_A$) o una disminución en la excitabilidad (antagonismo NMDA al bloquear el influjo de sodio y calcio) o de una combinación de ambos en el caso de utilizarse combinaciones de agonistas $GABA_A$ y antagonistas NMDA (72).

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que la amplitud del potencial de acción y/o el número de descargas generadas durante la estimulación tónica de la neurona Pre-I se reducen al activar progresivamente al receptor $GABA_A$ (efecto de las benzodiazepinas y barbitúricos) con una clara termodependencia ya que en las tres condiciones de temperatura evaluadas, hipo (35°C) normo (37°C) e hipertermia (40°C) hubo respuestas diferenciales, salvo en el caso de la normotermia en la amplitud del potencial de acción y en la hipertermia para el número de descargas. Estos casos pueden ser explicados por la termodependencia

diferencial de los componentes de activación y desactivación de los canales iónicos de sodio, potasio y cloro y a sus componentes no lineales (81).

El bloqueo de los receptores NMDA (efecto de la ketamina) también provoca una reducción de la amplitud de los potenciales de acción y del número de descargas neuronales, que son menores en condiciones de hipo y normotermia, y mayores en hipertermia donde se detectaron cambios en el análisis multivariado. Es de hacer notar que el efecto final sobre la actividad eléctrica de la neurona Pre-I depende del balance entre las actividades GABA_A y NMDA, sin embargo, entre ambas, la actividad inhibitoria es la que más se modificó, lo cual sugiere su relevancia en el patrón de descarga de esta neurona.

Los resultados obtenidos muestran un correlato clínico ya que los efectos hipnóticos y sedativos de las benzodiazepinas se evidencian en la medida que se aumenta la dosis de las drogas, generando desde la hipoventilación o depresión respiratoria hasta la apnea en los pacientes medicados o con intoxicación por estas drogas, hecho que se puso de manifiesto en el presente trabajo cuando con la estimulación de los receptores GABA_A se tuvo un efecto inhibitorio evidente tanto en la frecuencia de las espigas como en el potencial de acción de la neurona Pre-I del Pre-BötC.

En el mismo sentido, la hipoventilación y/o depresión respiratoria se presenta por la inhibición de los receptores para glutamato, N-metil-D-aspartato

(NMDA) como el que podemos apreciar en los pacientes que están bajo los efectos de la ketamina ya que en el control del ciclo respiratorio, las neuronas del núcleo Bötzing del tipo Post-inspiratorias/inspiratorias (Post-I/I) ejercen una acción inhibitoria de carácter gabaérgica sobre las neuronas Pre-I y las Early-I del Pre-BötC (1) que tienen una acción excitatoria de carácter glutamatérgica (NMDA) tanto sobre neuronas motoras del nervio hipogloso como sobre las neuronas excitatorias de rampa inspiratoria del núcleo respiratorio rostral (18,22).

El agonismo sobre los receptores $GABA_A$ mostró cambios más intensos en la amplitud y número de los potenciales de acción de la neurona Pre-I que los mismos cambios porcentuales realizados en antagonismo sobre los receptores NMDA, lo cual evidencia el predominio del sistema gabaérgico en el Pre-BötC. Y hecho que se evidencia en la clínica diaria cuando se aprecia mayor depresión respiratoria en los pacientes bajo efecto de las benzodiazepinas que en los pacientes que están bajo efecto de la ketamina. Adicionalmente, el ajuste de las curvas dosis-respuesta a funciones polinomiales de segundo orden sugieren el comportamiento no lineal de la cinética de ambos canales cuyas pendientes se exacerban en hipo e hipertermia, lo cual denota la participación de múltiples factores, entre los cuales se encuentran los inherentes a la cinética de cada canal iónico.

El reporte de las ecuaciones de estas curvas de ajuste plantea la posibilidad de calcular el impacto sobre el patrón de descarga neuronal en la neurona Pre-I de una dosis específica del agonista o del antagonista, lo cual reviste especial

importancia para líneas futuras de investigación donde se evalúen no solo cambios cualitativos, sino también cuantitativos en las pendientes de las curvas dosis-respuesta.

Estos efectos evaluados en normotermia mostraron curvas dosis-respuesta con cinéticas polinomiales de segundo orden cuyas pendientes se incrementaron considerablemente durante hipo o hipertermia lo cual evidencia la gran termodependencia (25,82) que son acordes con valores de coeficiente de Arrhenius (Q_{10}) mayores de 2,5.

En la gran mayoría de las células excitables en mamíferos el Q_{10} es de aproximadamente 2,5 y la permeabilidad iónica de membrana en reposo para el sodio es mayor que para el potasio. Al aumentar la temperatura, se produce una despolarización, aumenta la excitabilidad y el número de descargas (83,84,85).

A baja temperatura, la desactivación del canal sodio dependiente de voltaje es menos intensa que el proceso de activación, lo que da como resultado tiempos de apertura más largos y más despolarización y excitabilidad de la membrana. A temperaturas superiores a 40°C, los procesos de activación y desactivación se aceleran, reduciendo tanto el tiempo de apertura del canal como la excitabilidad neuronal (82,84). Adicionalmente se ha reportado que el incremento de la temperatura es capaz de acortar el tiempo de activación del canal de sodio y de incrementar la tasa de hidrólisis de neurotransmisores en la sinapsis (84).

Los resultados referidos a la termodependencia del proceso, son de especial importancia ya que fueron obtenidos en rangos clínicos de temperatura, es decir desde la hipo hasta la hipertermia, realzando aún más, la importancia de esta variable en la evaluación del patrón respiratorio del paciente

El presente estudio evaluó el efecto de benzodiazepinas y de ketamina sobre los receptores GABA_A y NMDA así como su termodependencia debido a la disponibilidad de los parámetros reportados de éstas variables en la neurona Pre-I. Es muy probable que los canales catiónicos sensibles a temperatura llamados TRP (Transient Receptor Potential) que se expresan a lo largo del sistema nervioso central y periférico (85,86), también se encuentren en las neuronas de los núcleos de control respiratorio del tallo cerebral.

Específicamente el TRPV1 y TRP3 poseen muy alta termodependencia con $Q_{10} > 10$, sin embargo; la apertura de canales para el sodio y calcio característica de estos canales ocurre por arriba de 42°C y por debajo de 33°C respectivamente, lo cual produciría la despolarización neuronal (86,85). Es de hacer notar que estos umbrales térmicos son muy específicos y se encuentran alejados de las temperaturas en rango clínico a las que puede llegar el centro corporal y especialmente alejadas de las tres temperaturas 35°C, 37°C y 40°C probadas en el presente estudio, por lo que las curvas de termodependencia reportadas aquí *in machina* probablemente se acerquen a la realidad con Q_{10} de 2,5. Estos resultados son de utilidad en el cálculo

del impacto y/o riesgo anestésico en pacientes sometidos a cirugía y que por circunstancias de emergencia se realiza la intervención en condiciones febriles o de hipotermia.

Aquí hay que hacer una mención especial a la instauración de la depresión respiratoria progresiva que se puede ver en pacientes con infecciones sistémicas y/o del sistema nervioso central bien sea bacteriana o viral, como en la actualidad estamos viendo en pacientes infectados por COVID19 los cuales pueden presentar insuficiencia respiratoria por condensación neumónica uni o bilateral que modifican la retroalimentación neuronal del reflejo de Hering-Breuer (5). Si el paciente presenta hipertermia, signo que caracteriza al cuadro, se pone en evidencia la necesidad de conocer los cambios en el sistema inducidos por la fiebre, especialmente en torno a la cinética de canales y las respuestas neuronales especialmente de la célula marcapaso principal del ritmo respiratorio.

La evidencia creciente muestra que las infecciones por los coronavirus no siempre se limitan al tracto respiratorio sino que también pueden invadir el sistema nervioso central, induciendo enfermedades neurológicas y en especial el tallo cerebral, pudiendo ser esta otra de las causas de depresión respiratoria que se ven en estos pacientes (16). En la infección por SARS-CoV o MERS, se ha reportado una densa presencia viral en los cerebros y el tronco encefálico de pacientes y animales experimentales (87,88,89), así como otros agentes virales como el de la rabia

(53). Además, se ha demostrado que algunos coronavirus pueden propagarse transinápticamente hasta el centro cardiorrespiratorio medular desde los mecanorreceptores y quimiorreceptores en el pulmón y las vías respiratorias inferiores y superiores (89,88), pudiendo modificar el proceso de transcripción genética de las proteínas integrales de membrana, en especial la de receptores evaluados en el presente estudio.

Los resultados reportados aquí permiten continuar con la evaluación de otras drogas con impacto en el sistema de control respiratorio o aún más interesante las mezclas e interacciones entre ellas, estos necesarios temas se sustentan en la cada vez más relevante y de alto impacto clínico de la polifarmacia y toxicología con blanco en el centro de control respiratorio.

CONCLUSIONES

En el presente estudio se modeló el comportamiento neurofisiológico de la célula Pre-I del pre-BötC que es el marcapaso principal del ritmo respiratorio. Sobre este modelo se probó dosis crecientes de agonistas GABA_A o de antagonistas NMDA evaluándose el número y amplitud de las descargas neuronas en condiciones de hipo, normo e hipertermia.

Se apreció que el número de espigas disminuye con la temperatura en la medida que se activa el receptor GABA_A siendo estadísticamente significativo a 35 y 37°C $p < 0,02$ y $0,01$ respectivamente, no así con la hipertermia.

La amplitud de las espigas de la neurona Pre I también se redujo en la medida que aumento el peso sináptico, siendo proporcional a la temperatura, llamando la atención la caída brusca a 5 mV con un peso sináptico de 1,0 a 40°C recuperándose la amplitud a 1,2 para luego volver a caer a 15 mV en el peso sináptico 1,6 solo siendo significativa la curva correspondiente los experimentos realizados a 35°C $p < 0,05$.

El número de espigas disminuye en la medida que disminuye el peso sináptico del receptor NMDA, siendo inversamente proporcional a la temperatura y estadísticamente significativos para los estudios a 35°C y 37°C $p < 0,001$ en ambos, no así para los de 40°C. Hay un aumento de la amplitud de las espigas en la

inhibición del receptor NMDA, con la disminución de la temperatura siendo este aumento estadísticamente significativo en hipo y normotermia $p < 0,006$ y $p < 0,01$ respectivamente, no así en la hipertermia.

Sin embargo cuando vemos el efecto de las dosis de los agonistas $GABA_A$ o de antagonista NMDA en condiciones de hipertermia ($40^{\circ}C$) se aprecia un mayor y significativo efecto tanto para el número como la amplitud de las espigas generadas por la neurona Pre-I.

BIBLIOGRAFIA

1. Bianchi AL, Denavit-Saubie M, Champagnat J. Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiol Rev* [Internet]. 1995 Jan 1 [cited 2016 Apr 6];75(1):1–45. Available from: <http://physrev.physiology.org/content/75/1/1>
2. Richter DW. Neural Regulation of Respiration: Rhythmogenesis and Afferent Control. In: *Comprehensive Human Physiology* [Internet]. 1996. p. 2079–95. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-60946-6_106
3. Cohen MI. Neurogenesis of respiratory rhythm in the mammal. *Physiol Rev*. 1979;59:1105–1173.
4. Hilaire G, Duron B. Maturation of the Mammalian Respiratory System. *Physiol Rev* [Internet]. 1999 Apr 1 [cited 2016 Apr 6];79(2):325–60. Available from: <http://physrev.physiology.org/content/79/2/325>
5. Feldman JL. *Fundamental Neuroscience*. fourth edi. Squire L, editor. Massachusetts, USA: Academic Press, Elsevier; 1986.
6. Smith, J.C., Ellenberger HH, Ballanyi, K., Richter, D.W. A, Feldman JL. Pre-Bötzinger complex: abrainstem may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* (80-). 1991;254:726–729.
7. Koshiya N, Smith JC. Neuronal pacemaker for breathing visualized in vitro. *Nature*. 1999;400(6742):360–3.
8. Ikeda K, Kawakami K, Onimaru H, Okada Y, Yokota S, Koshiya N, et al. The respiratory control mechanisms in the brainstem and spinal cord: integrative views of the neuroanatomy and neurophysiology. *Journal of Physiological Sciences*. 2017.
9. Ezure K. Synaptic connections between medullary respiratory neurons and considerations on the genesis of respiratory rhythm. *Prog Neurobiol*. 1990;35:429–450.
10. Ezure, K., Tanaka, I., and Saito Y. Brainstem and spinal projections of augmenting expiratory neurons in the rat. *Neurosci Res* [Internet]. 2003;45(1):41–51. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(02\)00197-9](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(02)00197-9)
11. Rybak IA, Paton JFR, Schwaber JS. I Modeling Neural Mechanisms for Genesis of Respiratory Rhythm and Pattern. I. Models of Respiratory Neurons. *J Neurophysiol*. 2017 Dec 25;77(4):1994–2006.
12. Rybak IA. Late expiratory activity emergence and interactions with the respiratory CPG. *J Neurophysiol*. 2010;104:2713–2729.
13. Rybak, Ilya A. Molkov, Yuroslav. Paton, Julian. Abdala, A. Zoccal D. Modeling the autonomic nervous system, in primer on the autonomic nervous system. 3ER Editio. Robertson, Biagioni, Burnstock, Lowe P, editor. Oxford Academic Press; 2012. 681–

7 p.

14. Bautista TG, Dutschmann M. Inhibition of the pontine Kölliker-Fuse nucleus abolishes eupneic inspiratory hypoglossal motor discharge in rat. *Neuroscience*. 2014;
15. Loewy, A.D., and Spyer KM. *Central Regulation of Autonomic Functions*. [Internet]. New York,,: Oxford University Press,; 1990. Available from: [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=Oow8w12CHwgC&oi=fnd&pg=PR11&dq=Central+regulation+of+autonomic+functions&ots=dxzSuE5EoM&sig=jNeUs4dmoz2qLCAqwNpGS9PusGU#v=onepage&q=Central regulation of autonomic functions&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=Oow8w12CHwgC&oi=fnd&pg=PR11&dq=Central+regulation+of+autonomic+functions&ots=dxzSuE5EoM&sig=jNeUs4dmoz2qLCAqwNpGS9PusGU#v=onepage&q=Central+regulation+of+autonomic+functions&f=false)
16. Li YC, Bai WZ, Hashikawa T. The neuroinvasive potential of SARS-CoV2 may be at least partially responsible for the respiratory failure of COVID-19 patients. *J Med Virol*. 2020;(February):24–7.
17. Rybak, IA. Ptak, K. Shevtsova, NA. McCrimmon D. Sodium currents in neurons from the rostroventrolateral medulla of the rat. *J Neurophysiol*. 2003;90:1635–42.
18. Smith JC, Abdala a PL, Koizumi H, Rybak I a, Paton JFR. Spatial and functional architecture of the mammalian brain stem respiratory network: a hierarchy of three oscillatory mechanisms. *J Neurophysiol* [Internet]. 2007;98(6):3370–87. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2225347&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
19. Butera, RJ. Rinzal, JR. Smith J. Models of respiratory rhythm generation in the pre-Bötzinger complex: I. Populations of coupled pacemaker neurons. *J Neurophysiol*. 1999;82:382–97.
20. Butera, RJ. Rinzal, JR. Smith J. Models of respiratory rhythm generation in the pre-Bötzinger complex: II. Populations of coupled pacemaker neurons. *J Neurophysiol*. 1999;82:398–415.
21. Molkov YI, Bacak BJ, Dick TE, Rybak IA. Control of breathing by interacting pontine and pulmonary feedback loops. 2013;7(February):1–18.
22. Rybak, IA. Paton, JFR. Schwaber J. Modeling neural mechanisms for genesis of respiratory rhythm and pattern: II. Network models of the central respiratory pattern generator. *J Neurophysiol*. 1997;77:2007–26.
23. Elsen, FP. Ramirez J. Calcium currents of rhythmic neurons recorded in the isolated respiratory network of neonatal mice. *J Neurosci*. 1998;18:10652–62.
24. Rybak IA, Paton JFR, Schwaber JS. III Modeling Neural Mechanisms for Genesis of Respiratory Rhythm and Pattern. III. Comparison of Model Performances During Afferent Nerve Stimulation. *J Neurophysiol*. 2017;77(4):2027–39.
25. Martinez, H. Eblen-Zajjur A. Termodependencia en rango clinico de las descargas neuronales individuales y colectivas en el complejo nuclear pre Bötzingler responsable del ritmo respiratorio. *LXV Conv Anu ASOVAC*. 2015;

26. Alvarez-Ríos J et al. Ketamina: 35 Años Después. *Anest en México*. 2004;1:60–8.
27. Mellen NM, Janczewski WA, Bocchiaro CM, Feldman JL. Opioid-induced quantal slowing reveals dual networks for respiratory rhythm generation. *Neuron*. 2003;37(5):821–6.
28. Ballanyi K, Ruangkittisakul A, Onimaru H. Opioids prolong and anoxia shortens delay between onset of preinspiratory (pFRG) and inspiratory (preBötC) network bursting in newborn rat brainstems. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2009;458(3):571–87.
29. Janczewski WA, Onimura H, Homma I, Feldman JL. Opioid-resistant respiratory pathway from the preinspiratory neurones to abdominal muscles: In vivo and in vitro study in the newborn rat. *Journal of Physiology*. 2002.
30. Acuña B. JP. Intoxicación grave por psicofármacos TT - Psychotropic drugs poisoning. *Rev Méd Clín Condes* [Internet]. 2011;22(3):332–9. Available from: http://www.clc.cl/clcprod/media/contenidos/pdf/MED_22_3/332-339-dr-acuna.pdf
31. F. B. Me van a anestesiar. Las respuestas a sus dudas sobre la anestesia. 1ra edicio. buenos aires; 2006.
32. Nickerson D, Buist M. Interactive reference descriptions of cellular electrophysiology models. In: Proceedings of the 30th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBS'08 - "Personalized Healthcare through Technology." 2008.
33. Sachs L. *Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden*, 8. Auflage. Biometrics. 1998;
34. Fone D, Hollinghurst S, Temple M, Round A, Lester N, Weightman A, et al. Systematic review of the use and value of computer simulation modelling in population health and health care delivery. *Journal of Public Health Medicine*. 2003.
35. Eblen-Zajjur A. Uso de programas de simulación como herramientas de docencia e investigación en ciencias de la salud. *Rev Tecnol Inf y Comun en Educ*. 2010;4(1):37–49.
36. Medina-Maldonado V, Eblen-Zajjur A, Medina-Maldonado V, Eblen-Zajjur A. Effects of estradiol or progesterone on principal cells from amygdala complex evaluated &ITin silico &IT. *Rev Mex Neurocienc*. 2018;19(1):44–55.
37. Martínez-Reyes H, Eblen-Zajjur A. Evaluación in silico del efecto de benzodiazepinas, ketamina y termodependencia sobre los patrones de descarga neuronal pre-Bötzing de control respiratorio. *Arch Neurociencias*. 2018;23:25–35.
38. Koizumi H, Smith JC. Persistent Na⁺ and K⁺-dominated leak currents contribute to respiratory rhythm generation in the pre-Bötzing complex in vitro. *J Neurosci*. 2008;28(7):1773–85.
39. Hilaire G, Pásaro R. Genesis and control of the respiratory rhythm in adult mammals. *News Physiol Sci* [Internet]. 2003;18:23–8. Available from:

<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=12531928&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers2://publication/doi/10.1152/nips.01406.2002>

40. Ruangkittisakul A, Schwarzacher SW, Secchia L, Poon BY, Ma Y, Funk GD, et al. High sensitivity to neuromodulator-activated signaling pathways at physiological [K⁺] of confocally imaged respiratory center neurons in on-line-calibrated newborn rat brainstem slices. *J Neurosci*. 2006;26(46):11870–80.
41. Ruangkittisakul A, Schwarzacher SW, Secchia L, Ma Y, Bobocea N, Poon BY, et al. Generation of eupnea and sighs by a spatiochemically organized inspiratory network. *J Neurosci*. 2008;28(10):2447–58.
42. Berger AJ. Phrenic motoneurons in the cat: Subpopulations and nature of respiratory drive potentials. *J Neurophysiol*. 1979;42(1):76–90.
43. Holstege, G. van Neerven J. Spinal cord location of the motoneurons innervating the abdominal, cutaneous maximus, latissimus dorsi and longissimus dorsi muscles in the cat. *Exp Brain Res*. 1987;67(1):179–94.
44. Nomura, S. Mizuno N. Central distribution of afferent and efferent components of the glossopharyngeal nerve: An HRP study in the cat. *Brain Res*. 1982;236(1):1–13.
45. Iscoe, S. Grélot, L. Bianchi A. Responses of inspiratory neurons of the dorsal respiratory group to stimulation of expiratory muscle and vagal afferents. *Brain Res Vol 507, Issue 2, 22 January 1990, Pages 281-288*. 1990;507(2):281–8.
46. Hwang, J. Bartlett Jr, D. St John W. Characterization of respiratory-modulated activities of hypoglossal motoneurons. *J Appl Physiol Respir Env Exerc Physiol* . 1983;55(3):793–8.
47. Rekling, J.C., andFeldman JL. PreBotzinger complex and pacemaker neurons hypothesized site and kernel for respiratory rhythm generation. *AnnuRevPhysiol*. 1998;60:385–405.
48. Feldman JL, Del Negro CA. Looking for inspiration: New perspectives on respiratory rhythm. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(3):232–42.
49. Fazekas JF, Alexander FAD, Himwich HE. Tolerance of the newborn to anoxia. *Am J Physiol Content*. 1941;
50. Nattie E. CO₂, brainstem chemoreceptors and breathing. *Prog Neurobiol [Internet]*. 1999;59(4):299–331. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10501632>
51. Remmers JE, Torgerson C, Harris M, Perry SF, Vasilakos K, Wilson RJA. Evolution of central respiratory chemoreception: A new twist on an old story. *Respir Physiol*. 2001;129(1–2):211–7.
52. Bianchi AL, Denavit-Saubié M, Champagnat J. Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters. *Physiol Rev [Internet]*. 1995 Jan 1 [cited 2017 Nov 6];75(1):1–45. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7831394>

53. Gaytán. SP, Pasaro. R, Patrice Coulon., Michelle Bevengut. GH. Identification of central nervous system neurons innervating the respiratory muscles of the mouse: a transneuronal tracing study. *Brain Res Bull* [Internet]. 2002;57(3–4):335–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0361923001006748>
54. Del Negro CA, Morgado-Valle C, Feldman JL. Respiratory rhythm: An emergent network property? *Neuron*. 2002;34(5):821–30.
55. Reikling JC, Shao XM, Feldman JL. Electrical coupling and excitatory synaptic transmission between rhythmogenic respiratory neurons in the preBötzinger complex. *J Neurosci*. 2000;20(23):20–3.
56. Degennaro M, Hurd TR, Siekhaus DE, Biteau B, Jasper H, Lehmann R. Electrical Coupling and Excitatory Synaptic Transmission between Rhythmogenic Respiratory Neurons in the PreBötzinger Complex. 2013;20(2):233–43.
57. Molkov YI, Abdala APL, Bacak BJ, Smith JC, Paton JFR, Rybak IA. Late-expiratory activity: emergence and interactions with the respiratory CpG. *J Neurophysiol*. 2010;
58. Fietkiewicz C, Loparo K a, Wilson CG. Drive latencies in hypoglossal motoneurons indicate developmental change in the brainstem respiratory network. *J Neural Eng* [Internet]. 2011;8(6):065011. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22056507>
59. Paul A. Gray,. Wiktor A. Janczewski., Nicholas Mellen., Donald R. McCrimmon. JLF. Normal breathing requires preBötzinger complex neurokinin-1 receptor-expressing neurons. *Nat Neurosci* [Internet]. 2001;4:927–30. Available from: <http://www.nature.com/neuro/journal/v4/n9/pdf/nn0901-927.pdf>
60. Gray PA, Reikling JC, Bocchiaro CM, Feldman JL. Modulation of respiratory frequency by peptidergic input to rhythmogenic neurons in the preBotzinger complex. *Science* (80-). 1999;
61. Guyenet PG, Wang H. Pre-Bötzinger Neurons With Preinspiratory Discharges \textbackslashhemphin vivo Express NK1 Receptors in the Rat. *J Neurophysiol*. 2001;86:438–46.
62. Shao XM, Feldman JL. Acetylcholine modulates respiratory pattern: effects mediated by M3-like receptors in preBötzinger complex inspiratory neurons. *J Neurophysiol* [Internet]. 2000;83(3):1243–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10712452>
63. Poon CS. Optimal interaction of respiratory and thermal regulation at rest and during exercise: Role of a serotonin-gated spinoparabrachial thermoafferent pathway. *Respir Physiol Neurobiol*. 2009;169(3):234–42.
64. Cohen MI, Shaw CF. Role in the inspiratory off-switch of vagal inputs to rostral pontine inspiratory-modulated neurons. *Respir Physiol Neurobiol*. 2004;

65. Rybak IA, Shevtsova NA, Paton JFR, Dick TE, St.-John WM, Mörschel M, et al. Modeling the ponto-medullary respiratory network. *Respir Physiol Neurobiol.* 2004;143(2-3):307-19.
66. Frermann, D. Keller, BU. Richter D. Calcium oscillations in rhythmically active respiratory neurones in the brainstem of the mouse. *J Physiol.* 1999;515:119-31.
67. Rybak IA, Shevtsova NA, St-John WM, Paton JFR, Pierrefiche O. Endogenous rhythm generation in the pre-Bötzinger complex and ionic currents: modelling and in vitro studies. *ogenous rhythm generation in the pre-B??tzinger complex and ionic currents: Modelling and in vitro studies.* *Eur J Neurosci.* 2003;18(2):239-57.
68. Leal J. La Autonomía del Sujeto Investigador y la Metodología de Investigación. 2012;124. Available from: www.jleal.tk
69. Filizola, M. Dopazo J. Cuarto Simposio DCEXS. Estrategias innovadoras en silico en investigación biomédica. In Barcelona, España Filizola; 2007. Available from: https://eventum.upf.edu/event_detail/2612/detail/fourth-dcexs-symposium.-innovative-in-silico-strategies-in-biomedical-research.html
70. Fina BL, Lombarte M, Rigalli A. Investigación de un fenómeno natural: ¿Estudios in vivo, in vitro o in silico? *Actual osteol.* 2013;9(3):294-9.
71. Scior, T. Martinez, E. Salinas E. Los modelos in silico , una herramienta. 2007;14(January):45-8.
72. Huguenard J.; McCormick D. *Electrophysiology of the Neuron.* New York Oxford: OXFORD UNIVERSITY PRESS; 1994.
73. Smith, JC. Butera, RJ. Koshiya, N. Del Negro, C. Wilson, CG. Johnson S. Respiratory rhythm generation in neonatal and adult mammals: the hybrid pacemaker-network model. *Respir Physiol Neurobiol.* 2000;122(2-3):131-47.
74. Øyvind Hammer. *PAleontological STatistics past* [Internet]. oslo: University of Oslo; 2015. Available from: <https://folk.uio.no/ohammer/past/>
75. Crossland L. *pharmacology.* Livingstone C, editor. Londres; 1980.
76. Macdonald, robert. olsen R. GABAA Receptor Channels. *AnnuRev.neurosci.* 1994;17:569-602.
77. Medina G. Efecto del Alcohol la Actividad Especifica de Aminopeptidasas Reguladoras de Neuropeptidos en Neuronas y Astroglias en Cultivos. *Fac ciencias Exp y la salud Univ jaen* [Internet]. 2006;1-61. Available from: http://www.ujaen.es/investiga/cvi296/TercerCiclo/Memoria_GMC.pdf
78. Guerri C. Mechanisms of ethanol actions on the brain. *elsevier.es* [Internet]. 2000;2(1). Available from: <http://www.elsevier.es/es-revista-trastornos-adictivos-182-articulo-como-actua-el-alcohol-nuestro-10016452>
79. Eblen-Zajjur A. Neurofisiología de la nocicepción. *Gac Med Caracas* [Internet]. 2005 [cited 2020 Jun 13];113(4):466-73. Available from: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0367-

47622005000400003&lng=es&nrm=iso&tlng=es

80. Mayas maria dolores. Alcohol etílico y aminopeptidasas cerebrales. Un estudio in vitro e in vivo [Internet]. facultad de ciencias experimentales y de la salud. universidad de Jaen. universidad de Jaen; 2003. Available from: <http://ruja.ujaen.es/bitstream/10953/394/1/8484391906.pdf>
81. Vasilenko V. Thermosensitivity: An intrinsic property of hypothalamic neurons. *J Therm Biol.* 1994;19(4):219–36.
82. Alfonsi, E. Merlini, GP. Giorgetti, A. Ceroni, M. Piccolo, G. Agostinis, C. Savoldi F. Temperature-related changes in sensory nerve conduction: studies in normal subjects and in patients with paraproteinaemia. *Electromyogr Clin Neurophysiol.* 1987;27(5):277–82.
83. Belluzzi O, Sacchi O. A five-conductance model of the action potential in the rat sympathetic neurone. *Prog Biophys Mol Biol.* 1991;55(1):1–30.
84. Rutkove, Seward. Kothari, Milind. Shefner J. Nerve, muscle, and neuromuscular junction electrophysiology at high temperature. *Muscle Nerve.* 1997;20(4):431–6.
85. Montell C, Caterina MJ. Thermoregulation: Channels that Are Cool to the Core. *Curr Biol.* 2007;17(20):885–7.
86. Bevan S. TRP Channels as Thermosensors. *Curr Top Membr.* 2006;57:199–239.
87. Li K, Wohlford-Lenane C, Perlman S, Zhao J, Jewell AK, Reznikov LR, et al. Middle east respiratory syndrome coronavirus causes multiple organ damage and lethal disease in mice transgenic for human dipeptidyl peptidase 4. *J Infect Dis.* 2015;212(11):712–22.
88. McCray PB, Pewe L, Wohlford-Lenane C, Hickey M, Manzel L, Shi L, et al. Lethal Infection of K18-hACE2 Mice Infected with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *J Virol.* 2007;81(2):813–21.
89. Netland J, Meyerholz DK, Moore S, Cassell M, Perlman S. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection Causes Neuronal Death in the Absence of Encephalitis in Mice Transgenic for Human ACE2. *J Virol.* 2008;82(15):7264–75.