UNIVERSIDAD POLITECNICA DE MADRID
ESCUELA TECNICA SUPERIOR DE INGENIEROS DE TELECOMUNICACIÓN
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA FOTÓNICA Y BIOINGENIERÍA

**CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO CARDIORRESPIRATORIO DE
LOS RATONES “CONEXINA-36 KNOCKOUT”: UN MODELO DE
MUERTE SÚBITA DE LA INFANCIA Y DE APNEAS
DE SUEÑO EN EL ADULTO**

TESIS DOCTORAL

Dirigida por el Doctor

LUIS CARLOS BARRIO CALVO

ING. LEONEL FRANCISCO PÉREZ ATENCIO
2017

UNIVERSIDAD POLITECNICA DE MADRID

AUTORIZACIÓN PARA LA DEFENSA DE LA TESIS DOCTORAL POR EL DIRECTOR DE LA TESIS

D. Luis Carlos Barrio Calvo, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICA:

Que D. LEONEL FRANCISCO PÉREZ ATENCIO ha realizado bajo mi dirección, y en la Unidad de Neurología Experimental del Hospital “Ramón y Cajal”, el trabajo de investigación de la tesis doctoral que lleva por título: **“Caracterización del Fenotipo Cardiorrespiratorio de los Ratones “conexina-36 knockout”: un Modelo de Muerte Súbita de la Infancia y de Apneas de Sueño en el Adulto”**.

Y que revisado el presente trabajo, expreso mi conformidad para la presentación y defensa ante el Tribunal correspondiente para optar al Grado de Doctor por esta Universidad.

En Madrid, a 28 de junio del 2017

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Barrio', is written over a horizontal line.

Fdo: Dr. Luis Carlos Barrio Calvo

A mis hijos

AGRADECIMIENTOS

En el año 2009 tomamos la decisión de cambiar nuestra vida por el futuro de nuestro hijos, Maryangelina y Leonel, en esa época contacté con el Dr. Francisco del Pozo quien me ayudó significativamente para emprender este nuevo camino, llamadas telefónicas casi a diario que él contestaba a pesar de todas sus ocupaciones. El día que llegó la carta de aceptación fue una gran alegría, pues implicaba que ese deseo de cambio y mejora iniciaría; al llegar a España en las clases del Dr. González-Nieto fue donde encontré mi vocación, la de investigador, me presento al Dr. Barrio en una reunión de laboratorio donde no tenía ni idea de lo que hablaban, conexinas, canales intercelulares, PCR, inmuno, era como chino para mí, pues mi formación era ingeniero mecánico. Durante estos siete años en la Unidad de Neurología Experimental del Hospital Ramón y Cajal estos conceptos han ido tomando sentido y he aprendido biología molecular, electrofisiología y análisis de señales desde la nada, y más importante aún, me he sentido gratamente acogido, y a pesar de estar muy lejos de mi familia, me he sentido muy querido por todas y cada una de las personas que forman parte de este laboratorio, porque además de ser compañeros de trabajo, en los momentos de dificultades, siempre estaban allí para darte un consejo. Para ellos todo mi agradecimiento.

Al **Dr. Luis Barrio**, porque a pesar de que me queda mucho por aprender, has sido un ejemplo de profesionalidad y dedicación, de verdad no sabes todo lo que he aprendido de ti, el conocimiento es algo efímero para mí, respecto al ejemplo de cómo debe enfocarse la vida, y a pesar de que muchas personas piensen que eres muy duro con los demás y contigo mismo, creo que es esa la clave para alcanzar el éxito, profesional y personal. Muchas gracias por todo el esfuerzo y tiempo que me has dedicado.

Al **Dr. Juan Barrios**, por ser mi amigo, por haberme enseñado todo lo que se de análisis de señales, por todos los momentos que dedicamos a hablar de ciencia y de cómo arreglar el mundo, por ser una persona en la que puedo confiar ciegamente y porque desde el principio sabías que podías lograrlo.

Al **Dr. Daniel González**, por todos los consejos que me ha dado durante el periodo que nos conocemos y por ser el partícipe de haber entrado en la Unidad de Neurología Experimental.

A **José Manuel Ibartz**, por toda la tecnología desarrollada para la obtención de los resultados de este trabajo y por todos los momentos gratos que pasamos en el laboratorio.

A **Amparo y María y al Dr. José María Gaztelu**, por toda la ayuda técnica en el desarrollo de los experimentos, y todo el cariño.

Al **Dr. Carlos Paíno y a Dra. Diana Raimer** por todo el conocimiento adquirido de ustedes y los momentos amenos.

A **M. Carmen**, por todos los consejos, por estar siempre cuando se presentaba un problema para resolverlo, y porque has hecho que me sienta como en casa.

A **María Ardaiz**, por haber participado en los experimentos y por todo los momentos gratos que pasamos durante su desarrollo.

A **Adela y a Ilaria**, por que han sido una familia para mí, durante todos estos años, por todos los espacios que nos tomábamos para hablar de presente y del futuro, por entenderme y por hacer gratos todos los momentos que pasamos en el laboratorio.

Al Hospital Ramón y Cajal por el uso de la infraestructura y a los proyectos BFU2012-33821 y BFU2015-71078-P cuya financiación durante estos años ha hecho posible este trabajo.

A la **Dra. Carolina Roberty y al Profesor Vicente Tena** por guiarme en el desarrollo de mis metas personales y profesionales, en la distancia siempre los tengo presentes.

A **Humberto y Juan José**, por enseñarme que el trabajo duro y el esfuerzo siempre tienen recompensa.

A **mis hermanos**, por haber estado siempre allí cuando más los necesite.

A **mis padres**, por todos los consejos, por ser un ejemplo a seguir, por todo el amor me han dado.

A **mis hijos**, porque son lo más grande que tengo, son mi estímulo y mi fuerza, no sé qué sería de mi vida sin ustedes, son lo más grande que me ha dado la vida, sus risas, su compañía, su cariño, su forma de entenderme, son la verdadera razón de existir. Ustedes son mi presente y mi futuro.

Finalmente, cuando dos personas se unen, se dice que uno es la mitad del otro y nunca mejor dicho, a ti **Marybel** te agradezco ser la otra mitad de mi ser, mi complemento para ser feliz, para tomar decisiones, para disfrutar de la vida, para emprender proyectos futuros, desde que somos novios hace 17 años no hemos hecho más que crecer profesional y personalmente y sé que seguirá siempre así, TE AMO.

ABREVIATURAS

AbN	Nervio abdominal
Aug-E	Patrón de descarga neuronal creciente inhibitorio durante la fase E2
BötzC	Complejo Bötzinger
CC	Cuerpos carotideos
CCHS	Síndrome de hipoventilación central congénita
CI	Canales intercelulares
CpF	Complejo parafacial
CPG	Patrón motor respiratorio
Cpi	Complejo Post-inspiratorio
CRPS	Sincronización de fase cardiorrespiratoria
CVLM	Núcleo presimpático caudoventrolateral de la medula
Cx	Conexina
Cx36KO	Ratón Cx36-Knockout
E	Espiración
E1	Fase de post-inspiratoria
E2	Fase de espiración activa
Early-I	Descarga inhibitorias durante la fase inspiratoria
EBT	Episodio de bradicardia transitoria
ECG	Electrocardiograma
EEG	Electroencefalograma
EMG	Electromiograma
FC	Frecuencia cardiaca
FR	Frecuencia respiratoria
GRPEcv	Grupo respiratorio pre-motor espiratorio caudoventral
GRPIrv	Grupo respiratorio pre-motor inspiratorio rostroventral
I	Inspiración
I_{CAN}	Corriente catiónica no-selectiva activada por calcio
I_{NaP}	Corriente persistente de sodio
IVLM	Núcleo presimpático ventrolateral intermedio de la medula
late-E	Descarga exitatorias durante la fase espiratoria E2
LC	Núcleo Locus coeruleus
NA	Núcleo ambiguos
NF	Núcleo del rafe
NK1R	Receptor de neuroquinina-1
NMDV	Núcleo motor dorsal del vago
NPVc	Neuronas pre-ganglionares vagales cardiacas
NREM	Sueño de onda lenta
NRT	Núcleo retrotrapezoidal
NSQ	Núcleo supraquiasmático
NTS	Núcleo del tracto solitario
Phox2b	Factor de transcripcion Phox2b
Post-I	Patrón de descarga neuronal durante la fase postinspiratoria E1
PPN	Núcleo pedunculopontino
Pre I/I	Patrón de descarga neuronal excitatorio durante la fase inspiratoria

preBötC	Complejo pre-Bötzinger
QRS	Onda de despolarización de los ventrículos del corazón
ramp-I	Patrón de descarga neuronal excitatorio en rampa durante la fase inspiratoria
REM	Sueño de movimiento rápido de ojos
RSA	Arritmia sinusal respiratoria
RVLM	Núcleo presimpático rostroventrolateral de la medula
SIDS	Síndrome de muerte súbita infantil
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso parasimpático
SNS	Sistema nervioso simpático
SUDEP	Síndrome de muerte súbita del adulto asociada a epilepsia
VII	Nervio vago

RESUMEN

La respiración es un proceso homeostático de origen neuronal cuyas alteraciones tienen graves consecuencias para la salud humana. Los circuitos neuronales del tronco encefálico que generan el ritmo respiratorio y controlan las respuestas a los cambios de O_2 y CO_2 están organizados en una serie de redes de neuronas excitadoras e inhibidoras interconectadas por sinapsis químicas y eléctricas. Connexin-36 (Cx36) es el componente principal de las sinapsis eléctricas que median el acoplamiento eléctrico entre las neuronas del centro respiratorio; la Cx36 alcanza su nivel máximo de expresión durante la lactancia y posteriormente disminuye hasta la edad adulta. Se desconoce el papel que desempeña el acoplamiento eléctrico mediado por la Cx36 en la fisiología y las patologías del centro respiratorio. Para abordar esta cuestión se ha caracterizado el fenotipo respiratorio de los ratones que carecen constitutivamente de Cx36 (*i.e.*, "ratones Cx36 knockout") durante la lactancia (P14) y en los adultos jóvenes. La mayoría de los ratones Cx36KO en P14 mostraron una frecuencia respiratoria más lenta con mayor variabilidad del ritmo, y en un menor porcentaje una respiración anormal tipo Cheyne-Stokes. Además, estos ratones respondieron a la hipoxia y la hipercapnia en el aire inhalado con un esfuerzo ventilatorio anormalmente aumentado, y tienen un riesgo significativamente elevado de sucumbir por un síndrome de muerte súbita infantil inducido por hipoxia-hipercapnia (*i.e.*, por "asfixia"). En la edad adulta, los ratones Cx36-KO en comparación con ratones silvestres respiraron más rápidamente en vigilia tranquila, pero la caída de frecuencia respiratoria durante el sueño NREM fue más pronunciada; durante el sueño REM la respiración se vuelve más arrítmica y aumentan de forma significativa el número de apneas. La gasometría realizada en los Cx36KO adultos reveló una acidosis respiratoria crónica. Basándose en este fenotipo respiratorio que muestran los ratones Cx36KO, se puede inferir que el acoplamiento eléctrico mediado por la Cx36 durante la lactancia protege contra el síndrome de muerte súbita infantil y en la edad adulta previene la aparición de las apneas del sueño.

SUMMARY

Breathing is a primal homeostatic neural process, which disturbances have severe consequences for human health. Brainstem neural circuits generating respiratory rhythm and controlling responses to O₂ and CO₂ changes are organized as serially arrayed networks of excitatory and inhibitory neurons interacting by chemical and electrical synapses. Connexin-36 (Cx36) is the principal component of electrical synapses in the respiratory center; Cx36 expression is upregulated at neonatal periods and then decreases during postnatal development. However, the role played by Cx36-mediated electrical coupling on the respiratory center is unknown. To address this issue we have characterized the respiratory phenotype of mouse lacking Cx36 (Cx36-knockout) during lactation (P14) and in young adults. Most of Cx36KO mice at P14 showed a slower respiratory rate with greater rhythm variability, and few of them an abnormal Cheyne-Stokes respiration. In addition, they responded to hypoxia and hypercapnia in the inhaled air with an abnormal enhanced ventilatory effort, and the risk of sudden infant death syndrome by “asfixia” (*i.e.*, by hypoxia-hypercapnia) was significantly elevated. In adulthood, Cx36-KO mice in comparison with WT mice breathed more rapidly in quite wakefulness. However, the decay of respiratory frequency at NREM sleep was more pronounced and during REM sleep breathing became more arrhythmic and showed an abnormal increased number of apneas. Blood gas analysis of Cx36KO revealed an acid-basic imbalance, a respiratory acidosis with renal compensation. Thus, based on the phenotype exhibited by Cx36KO phenotype, it can infer that the Cx36 expression protects against sudden infant death syndrome during lactation and in adulthood of sleep apneas.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Ritmicidad respiratoria: modelo de los “tres osciladores”	1
1.1.1 Oscilador inspiratorio.....	3
1.1.2. Oscilador espiratorio.....	4
1.1.3. Oscilador post-inspiratorio.....	5
1.2. Quimiorrecepción central y periférica.....	6
1.3. Coordinación cardiorrespiratoria.....	7
1.3.1. Regulación parasimpática cardiovascular.....	7
1.3.2. Regulación simpática cardiovascular.....	8
1.3.3. Acoplamiento cardiorrespiratorio.....	9
1.3.3.1. Arritmia sinusal respiratoria.....	9
1.3.3.2. Sincronización de fase cardiorrespiratoria (CRPS).....	10
1.4. Modulación de la respiración durante el sueño.....	10
1.5. Síndrome de muerte súbita de la infancia (SIDS).....	12
1.6. Hipótesis sobre el papel de la conexinas-36 en la ritmogénesis respiratoria, la quimiorrecepción, y el acoplamiento cardiorrespiratorio.....	14
II. OBJETIVOS.....	19
III. MATERIALES Y METODOS.....	20
3.1. Animales de experimentación.....	20
3.2. Genotipado.....	22
3.3. Estudios de la respiración durante el sueño.....	22
3.3.1. Implantación de los electrodos.....	22
3.3.2. Registros crónicos en animales sin restricción de movimiento.....	23
3.3.3. Estadiaje del sueño.....	24
3.3.4. Cadenas de Markov.....	25
3.3.5. Detección de las apneas de sueño.....	25
3.4. Estudio de la ritmicidad respiratoria y cardiaca, de los quimiorreflejos respiratorios y de los mecanismos de acoplamiento.....	26
3.4.1. Procedimiento experimental.....	26
3.4.2. Procesamiento de las señales electrofisiológicas.....	28
3.4.3. Análisis de la arritmia respiratoria sinusal (RSA).....	28
3.4.4. Sincronización de fase cardiorrespiratoria (CPRS).....	29
3.4.5. Diagrama de Poincaré de pares de intervalos sucesivos.....	29
3.4.6. Diagramas de fase-cofase.....	29
3.4.7. Diagrama de transferencia de frecuencias.....	31
3.5. Equilibrio ácido-base y pH del líquido cefalorraquídeo.....	31
3.6. Análisis estadístico.....	31
IV. RESULTADOS.....	33
4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA RITMICIDAD RESPIRATORIA Y DEL ACOPLAMIENTO CARDIORRESPIRATORIO EN LOS RATONES	

DEFICIENTES EN CONEXINA-36.....	33
4.1.1. Ritmicidad respiratoria y cardiaca.....	33
4.1.1.1. Ritmicidad respiratoria durante la lactancia.....	33
4.1.1.2. Cambios madurativos de la ritmicidad respiratoria y cardiaca durante el desarrollo postnatal.....	36
4.1.1.3. Mecanismos de acoplamiento cardiorrespiratorio.....	37
4.1.1.3.1. Arritmia respiratoria sinusal.....	37
4.1.1.3.2. Sincronización de fase cardiorrespiratoria.....	37
4.1.2. Modulación de la ritmicidad respiratoria durante el sueño en los ratones deficientes en conexina-36.....	43
4.1.2.1. Caracterización del ciclo vigilia-sueño en los ratones deficientes en la Cx36.....	43
4.1.2.2. Modulación de la ritmicidad respiratoria en función del estado de vigila, sueño NREM y REM.....	47
4.1.2.3. Regulación del equilibrio ácido-base en los ratones adultos deficientes en Cx36.....	51
4.1.2.3.1. Presión transcutánea de CO ₂ y saturación de oxígeno arterial.....	51
4.1.2.3.2. pH del líquido cefalorraquídeo.....	51
4.1.2.3.3. Gasometría sanguínea y analítica de orina.....	51
4.2. ESTUDIO DE LOS QUIMIORREFLEJOS CARDIORRESPIRATORIOS A LA HIPOXIA Y A LA HIPERCAPNIA EN LOS RATONES DEFICIENTES EN LA CONEXINA-36.....	54
4.2.1. Quimiorreflejos a la hipoxia.....	54
4.2.1.1. Respuesta cardiorrespiratoria a la hipoxia en los ratones lactantes.....	54
4.2.1.2. Cambios madurativos durante el desarrollo postnatal del quimiorreflejo a la hipoxia.....	56
4.2.2. Quimiorreflejos a la hipercapnia.....	58
4.2.2.1. Respuesta cardiorrespiratoria a la hipercapnia en los ratones lactantes.....	58
4.2.2.2. Cambios madurativos durante el desarrollo postnatal del quimiorreflejo a la hipercapnia.....	60
4.2.3. Mecanismos de acoplamiento cardiorrespiratorio implicados en la respuesta a la hipoxia y la hipercapnia en los ratones lactantes silvestres y deficientes en la Cx36.....	63
4.2.3.1. Mecanismos de acoplamiento cardiorrespiratorio durante los quimiorreflejos a la hipoxia.....	63
4.2.3.1.1. Arritmia sinusal respiratoria.....	63
4.2.3.1.2. Sincronización de fase cardiorrespiratoria.....	63
4.2.3.1.3. Función de transferencia de las frecuencias respiratorio-cardíacas.....	65
4.2.3.1.4. Oximetría pulso-a-pulso.....	65
4.2.3.2. Mecanismos de acoplamiento cardiorrespiratorio durante los quimiorreflejos a la hipercapnia.....	68
4.2.3.2.1. Episodios de bradicardia transitoria.....	68

4.2.3.2.2. Sincronización de fase cardiorrespiratoria	72
4.2.3.2.3. Función de transferencia de las frecuencias respiratorio- cardiacas.....	74
4.2.3.2.4. Oximetría pulso-a-pulso.....	74
4.3. EFECTO DE LA AUSENCIA DE EXPRESIÓN DE LA CONEXINA-36 SOBRE LA SUSCEPTIBILIDAD A LA MUERTE SÚBITA DE LA INFANCIA POR ESTRÉS RESPIRATORIO.....	78
4.3.1. Respuesta cardiorrespiratoria de los ratones lactantes silvestres y Cx36KO a la “asfixia”	78
4.3.2. Mecanismos de acoplamiento cardiorrespiratorio durante los quimiorreflejos a la asfixia en los ratones lactantes silvestres y Cx36KO.....	82
4.3.2.1. Episodios bradicardia transitoria (EBT).....	82
4.3.2.2. Sincronización de fase cardiorrespiratoria (CPRS).....	85
4.3.2.3. Función de transferencia de las frecuencias respiratorio- cardiacas.....	87
4.3.2.4. Oximetría pulso-a-pulso durante la asfixia.....	87
4.3.3. Susceptibilidad de los ratones Cx36KO lactantes a sufrir muerte súbita por estrés respiratorio. Mecanismos fisiopatogénicos.....	89
V. DISCUSIÓN.....	96
5.1. Alteraciones en la ritmicidad respiratoria en los ratones deficientes en la Cx36 neuronal.....	96
5.2. Alteraciones en los quimiorreflejos y en los mecanismos de acoplamiento cardiorrespiratorio en los ratones lactantes deficientes en la Cx36 neuronal.....	100
5.3. Ausencia de los cambios madurativos en los sistemas respiratorio y cardíaco en los ratones deficientes en la Cx36 neuronal.....	105
5.4. Síndrome de muerte súbita de la infancia.....	106
VI. CONCLUSIONES.....	110
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	112

I. INTRODUCCIÓN

La respiración es la función neural vital que regula los niveles de O_2 , CO_2 y pH necesarios para mantener el metabolismo celular y el equilibrio ácido-base del organismo. El centro respiratorio del tronco del encéfalo es el responsable de generar la actividad marcapasos que confiere el automatismo a la respiración y el patrón motor respiratorio (CPG: “Central Pattern Generation”) que comanda la musculatura inspiratoria y espiratoria. También es el responsable de sensar los niveles de CO_2 /pH e integrar esta información con la procedente de los quimiorreceptores periféricos, y en función de ello modificar la frecuencia y amplitud del CPG. De esta forma el centro respiratorio es capaz, variando la tasa ventilatoria, de mantener casi inalterables los niveles de O_2 y CO_2 /pH en distintos estados fisiológicos y metabólicos.

Este ritmo respiratorio se coordina con otras funciones, como son la deglución, la vocalización, la tos o las respuestas de “escape y defensa”. El patrón respiratorio también varía entre vigilia, el sueño lento (NREM) y el sueño paradójico (REM: “Rapid Eye Movements”). Además, la respiración sufre cambios fisiológicos más lentos como los que ocurren durante el desarrollo postnatal, el embarazo y durante el envejecimiento. Entre las patologías que cursan con alteraciones en el control neuronal de la respiración cabe destacar las apneas de sueño, el síndrome de muerte súbita infantil (SIDS: “Sudden Infant Death Syndrome”), el síndrome de muerte súbita del adulto asociada a epilepsia (SUDEP: “Sudden Unexplained Death in Epilepsy”) y el síndrome de hipoventilación central congénita (CCHS: “Congenital Central Hypoventilation Syndrome”; también conocido como la “maldición de Ondina”). La parada respiratoria es una causa frecuente de muerte súbita durante el sueño especialmente en pacientes con enfermedades neurodegenerativas, como la atrofia sistémica múltiple, y durante la vejez.

1.1. Ritmicidad respiratoria: modelo de los “tres osciladores”.

En la actualidad se ha propuesto un modelo de tres osciladores en el cual las tres fases de la respiración, la inspiratoria (I), la post-inspiratoria (E1) y la espiratoria activa (E2), se generan respectivamente en tres microcircuitos ritmogénicos excitatorios distintos, el complejo preBötzinger (preBötzc), el complejo post-inspiratorio (CPi) y el complejo formado por el núcleo retrotrapezoidal y el grupo respiratorio parafacial (NRT/CpF), que se coordinan

Figura 1. Esquema estructural y funcional del centro respiratorio y del control cardiovascular. Disposición e interacciones entre los distintos compartimentos implicados en la generación del ritmo respiratorio: el oscilador inspiratorio de los complejos preBötzing y Bötzing (preBötC y BötC), el oscilador espiratorio del núcleo retrotrapezoide y el complejo parafacial (NRT/CpF) y el oscilador post-inspiratorio (CPI); en la generación de distintos patrones pre-motor respiratorio por los grupos inspiratorios rostral ventral (GRPIrv) y espiratorios caudal ventral (GRPEcv); en la quimiorrecepción central por el núcleo del tracto solitario (NTS), el NRT/CpF, los núcleos del rafe (NR) y el locus coeruleus (LC) y de la quimiorrecepción periférica procedente de los cuerpos carotídeos (CC), y en la coordinación cardiorrespiratoria parasimpática, a través del núcleo ambiguo (NA) y del núcleo motor dorsal del vago (NMDV), y simpática por los núcleos pre-simpáticos rostral, intermedio y caudal ventrolaterales de la médula (RVLM, CVLM, IVLM). (Modificado de Anderson *et al.*, 2016; Condorelli *et al.*, 1998; Deuchars, 2007; Guyenet *et al.*, 20013; Natarajan y Morrison, 2002; Parenti *et al.*, 2000; Schreihöfer y Sved, 2011; Smith *et al.*, 2009; Solomon, 2003; Rash *et al.*, 2007). *, neuronas Cx36(+).

temporalmente mediante interacciones recíprocas inhibitorias/excitatorias (Anderson, *et al.*, 2016) (Fig. 1). La existencia de tres redes excitatorias segregadas espacialmente que facilita el control dinámico y diferencial de la ventilación y de los comportamientos no-ventilatorios relacionados con la respiración.

1.1.1. Oscilador inspiratorio.

Los principales componentes implicados en la generación del ritmo respiratorio y del CPG son tres estructuras que forman las columnas respiratorias ventrales en la zona ventrolateral del bulbo, el complejo Bötzinger (Bötzc), el complejo preBötzinger y el grupo respiratorio pre-motor inspiratorio rostro-ventral (GRPIrv) (Smith *et al.*, 2009) (Fig. 1). El ritmo y el patrón respiratorio emerge de las interacciones dinámicas entre: i) las poblaciones de neuronas excitadoras del preBötzc tipo pre-I/I y del GRPIrv tipo ramp-I, activas durante la inspiración y que generan el patrón motor inspiratorio, ii) las poblaciones de neuronas inhibitorias del preBötzc tipo early-I que aportan la inhibición durante la inspiración al resto de la circuitería, y iii) la población de neuronas inhibitorias del Bötzc tipos post-I y aug-E activas durante la espiración que aportan la inhibición durante la fase espiratoria. El preBötzc es esencial en la generación del ritmo inspiratorio, ya que contienen neuronas con actividad marcapasos intrínseca, que en unos casos está generada por una corriente persistente de sodio (I_{NaP} , bloqueada por riluzole) y en otras por una corriente catiónica no-selectiva activada por calcio (I_{CAN} ; bloqueada por el ácido flufenámico) (McKay *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 1991; Tan *et al.*, 2008). En los Bötzc y preBötzc existe una extensa población de neuronas inhibitorias GABAérgicas y glicinérgicas (Paton y Richter, 1995), tanto de tipo inspiratorio como espiratorio, conectadas de forma recíproca entre sí, formando lo que se ha denominado el “anillo inhibitorio” (Fig. 1), que se han implicado en la generación de la propia ritmicidad y en la coordinación temporal de los patrones de descarga de las diferentes subpoblaciones neuronales (Belykh y Shilnikov, 2008).

Las propiedades ritmogénicas endógenas de las neuronas del preBötzc junto con interacciones de otras entradas circuitales permiten generar varios modos de oscilación que dan lugar a distintos CPGs en función del estado metabólico (*i.e.*, de los niveles de CO_2/pH y O_2); el patrón respiratorio eupneico en condiciones de normoxia-normocapnia consta de tres fases: una de inspiración (I) y dos de espiración, una fase de post-inspiración o espiración pasiva (post-I/E1) y otra de espiración tardía (E2); durante la fase I se activa la musculatura inspiratoria y

durante la fases post-I/E1 se produce la espiración pasiva (Smith *et al.*, 2009). En condiciones de hipocapnia se genera un patrón en “dos fases I/E” (Sun *et al.*, 2001), mientras que en condiciones de extrema hipoxia (*i.e.*, “anoxia”) se genera un patrón monofásico (Paton y Dutschmann, 2002; Peña *et al.*, 2004). Estos distintos patrones respiratorios se han podido generar en preparaciones *in vitro* eliminando progresivamente entradas procedentes de distintas estructuras (Rybak *et al.*, 2007); cuando se eliminan las entradas excitadoras tónicas proceden de los núcleos respiratorios de la protuberancia en la región dorsal y en la región ventral, el núcleo Kölliger-Fuse, el locus coeruleus y el complejo parafacial (CpF); el patrón respiratorio pasa de “tres fases” a otro de “dos fases”, en el que desaparece la fase post-I, las descargas motoras inspiratorias se vuelven tónicas y el desfase entre ellas; si además se secciona la región más rostral del bulbo en la que se ubica el núcleo retrotrapezoidal (NRT) y los núcleos del rafé (NR), ambos involucrados en la quimiorrecepción central, y el núcleo del tracto solitario (NTS), que recibe información procedente de los quimiorreceptores periféricos, y el Bötzc la preparación genera un patrón de “una fase” inspiratoria con descargas sincronizadas y decrecientes en los nervios frénicos. Estos estudios indican que las neuronas del preBötzc desempeñan un papel crítico en la ritmogénesis respiratoria de actividad inspiratoria. Dicho papel del preBötzc como oscilador “inspiratorio” se ha confirmado también en los estudios *in vivo* en las ratas adultas mediante el silenciamiento progresivo bilateral selectivo de la población de neuronas somatostatina (+) de este complejo (Tan *et al.*, 2008); en estos ratones se originan apneas frecuentes y prolongadas, primero en sueño REM, luego en sueño NREM y finalmente se produce ataxia respiratoria en vigilia. En el hombre, las neuronas del preBötzc parecen ser especialmente vulnerables a la neurodegeneración en los pacientes con atrofia múltiple, en los que se produce una importante destrucción de las neuronas NK1R y somatostatina (+) del preBötzc (Schwarzacher *et al.*, 2011), lo que podría explicar las importantes apneas durante el sueño que sufren estos pacientes (Benarroch *et al.*, 2003).

1.1.2. Oscilador espiratorio.

Posteriormente se identificó en condiciones de hipercapnia un patrón I/E de alta amplitud y frecuencia ventilatoria que se genera por la interacción recíproca entre los complejos BötC/pre-BötC y un segundo oscilador espiratorio tardío (late-E) localizado en NRT/CpF, rostralmente al BötC (Burke *et al.*, 2014; Onimaru y Homma

1987; Onimaru y Homma, 2003) (Fig. 1). El acoplamiento entre estos dos osciladores ocurre directamente por las proyecciones excitadoras glutamatérgicas del NRT al preBötzC y por la retroalimentación inhibitoria del preBötzC sobre NRT (Thoby-Brisson *et al.*, 2009). El oscilador del NRT/CpF comanda la actividad motora respiratoria fundamentalmente a nivel abdominal mediante la activación de descargas late-E en el grupo respiratorio pre-motor respiratorio caudoventral (GRPEcv), y marca el inicio y final de la fase de inspiración del preBötzC mediante una descarga pre-inspiratoria o una bifásica (pre-inspiratoria y post-inspiración) (Janczewski y Feldman, 2006). El oscilador espiratorio NRT/CpF se activa en condiciones de hipercapnia en normoxia e hiperoxia por la estimulación directa de las neuronas quimiosensibles del NRT/CpF, por el efecto excitador dependiente de los astrocitos en respuesta a la acidosis y por las aferencias excitatorias que recibe de otros núcleos quimiorreceptores centrales y de los quimiorreceptores periféricos (*i.e.*, de los cuerpos carotídeos (CCs) vía NTS) (Guyenet y Bayliss, 2015); sin embargo, se inhiben en condiciones de hipoxia hipocapnia (Basting *et al.*, 2015). Los dos osciladores, el “inspiratorio” (BötzC/preBötzC) y el “espiratorio” (NRT/CpF) responden diferencialmente a los estímulos pulmonares, la insuflación pulmonar incrementa la actividad del oscilador “espiratorio” y deprime la actividad del oscilador “inspiratorio” para reducir el volumen pulmonar, mientras que la depleción pulmonar tiene el efecto opuesto (Tomori *et al.*, 2010). Los opiáceos deprimen la función del preBötzC pudiendo originar apneas prolongadas y muerte súbita, pero no afectan sustancialmente a la ritmicidad del oscilador NRT/CpF (Janczewski y Feldman 2006) (Feldman y Del Negro 2006). Como las neuronas del complejo NRT/CpF muestran ritmicidad respiratoria intrínseca durante el nacimiento y el periodo postnatal (Guyenet y Mulkey 2010; Lazarenko *et al.*, 2011) se ha propuesto que, coincidiendo con el incremento de los opiáceos durante el parto, el oscilador “espiratorio” podría ponerse en marcha evitando la muerte súbita del recién nacido.

1.1.3. Oscilador post-inspiratorio.

El oscilador formado por complejo post-inspiratorio (CPi) recientemente identificado se ubica rostral al preBötzC y dorsomedial al núcleo ambiguo (NA) (Anderson *et al.*, 2016). Este oscilador lo conforman una red de neuronas glutamatérgicas, colinérgicas y GABAérgicas que en presencia de norepinefrina descargan rítmicamente en la fase post-inspiratoria del ciclo respiratorio. Esta actividad ritmogénica desaparece en presencia de bloqueantes glutamatérgicos, y

no depende de mecanismos colinérgicos, ni GABAérgicos. Los osciladores inspiratorio y post-inspiratorio interactúan entre sí; la actividad del CPi se inhibe por la fotoestimulación del preBötzC y la fotoestimulación del CPi produce el retardo de la descarga inspiratoria del preBötzC, sugiriendo que este oscilador post-inspiratorio podría contribuir a coordinar la respiración con otros comportamientos motores, como la vocalización o la deglución.

1.2. Quimiorrecepción central y periférica.

El concepto de que la presión arterial de CO_2 (PaCO_2) es el principal factor que determina la amplitud y la frecuencia de la respiración se estableció hace ya más un siglo (Haldane y Priestley, 1905). La precisa homeostasis de la presión arterial de CO_2 (PaCO_2) requiere de un poderoso y eficaz mecanismo de control que está mediado por los quimiorreceptores de CO_2 localizados en los cuerpos carotídeos a nivel periférico y por los quimiorreceptores centrales de la respiración (Guyenet *et al.*, 2013). La tasa de CO_2 se detecta fundamentalmente vía los cambios de pH que produce (*i.e.*, acidosis) (Loeschcke, 1982). La respuesta inducida por los CC_s es más rápida que la de los quimiorreceptores centrales, y podría por tanto modular de una forma rápida y eficaz la ganancia de los quimiorreceptores centrales, que actuarían en este caso como centros integradores de la quimiorrecepción. La respuesta ventilatoria al O_2 depende casi exclusivamente de los quimiorreceptores periféricos que están conformados por células glómicas de los CC_s y que envían sus aferencias respectivamente a través del nervio de Hering al nervio glosofaríngeo y del nervio vago hasta al NTS (Daly, 1997; Heymans y Neil, 1958).

A nivel central se han identificado numerosas neuronas quimiosensibles al CO_2 , como son: las de neuronas catelaminérgicas del locus coeruleus (LC) (Pineda *et al.*, 1997), las neuronas serotoninérgicas de los núcleos caudales del rafe (NR) (Dreshaj *et al.*, 1998), las neuronas del núcleo del tracto solitario (NTS) y del núcleo motor dorsal del vago (NMDV) (Nichols *et al.*, 2008; Trapp *et al.*, 1996), así como en otras regiones más rostrales, como las neuronas orexinogénicas del hipotálamo (Williams *et al.*, 2007), y las neuronas del NRT/CpF (Guyenet y Bayliss, 2015). En contra de la teoría de una quimiorrecepción central ampliamente distribuida está la evidencia obtenida a partir de los estudios del síndrome de hipoventilación central congénita (CCHS); en esta patología, las neuronas glutamatérgicas del núcleo NRT que expresan el gen homeobox *Phox2b* mutado desaparecen y se produce una pérdida casi completa de la quimiosensibilidad

respiratoria, de la sensación de asfixia y aparece una apnea de sueño completa, pero la respiración es prácticamente normal en vigilia y durante el ejercicio (Amiel *et al.*, 2003). Estos estudios indican claramente que la ritmicidad respiratoria no está significativamente afectada en esta patología y que la quimiorrecepción central depende fundamentalmente de la población de neuronas *Phox2b* del NRT. Este núcleo contiene neuronas que responden a la acidificación *in vitro* con una alta sensibilidad, incrementando monotónicamente su frecuencia de descarga con el grado de acidificación (Mulkey *et al.*, 2004) y envían sus proyecciones excitatorias glutamatérgicas al preBötzC y a las neuronas del grupo respiratorio pre-motor espiratorio caudoventral (GRPEcv) (Fig. 1). En relación con el mecanismo de quimiorrecepción, las neuronas del NRT expresan canales TASK-2 activados por alcalosis y receptores GPR4 que se activan por protones que son esenciales en la quimiorrecepción del CO₂ (Guyenet *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2013). El grupo de astrocitos localizados ventralmente al NRT y próximos a la superficie del cuarto ventrículo también podrían estar contribuyendo a la quimiorrecepción central del CO₂; se despolarizan por acidificación (Wenker *et al.*, 2010) incrementan su concentración intracelular de Ca²⁺ y liberan ATP, bien por exocitosis o a través de los hemicanales astrocitarios de Cx43 (Huckstepp *et al.*, 2010; Kasymov *et al.*, 2013; Meigh *et al.*, 2013), y finalmente despolarizan las neuronas del NRT vía receptores P2 (Gourine *et al.*, 2010).

1.3. Coordinación cardiorrespiratoria.

El centro respiratorio actúa de forma coordinada con el sistema cardiovascular; dicha integración tiene lugar fundamentalmente a través del sistema nervioso autonómico central simpático (SNS) y parasimpático (SNP): que ajustan la actividad cardíaca a la respiración y regulan las fluctuaciones en la presión arterial. En general se admite que los efectos del sistema simpático y parasimpático son antagónicos y que los cambios en el tono de ambos sistemas varía en sentido opuesto (Porges, 1995).

1.3.1. Regulación parasimpática cardiovascular.

En el tronco encefálico se han identificado dos distintas poblaciones de neuronas preganglionares vagales cardíacas (NPVc) localizadas respectivamente en el núcleo ambiguo (NA) y en núcleo motor dorsal del vago (NMDV); las dos poblaciones de NPVc tienen un distinto patrón de actividad y ejercen distintos

efectos sobre la actividad cardiaca (Gourine *et al.*, 2016). Las principales aferencias al NA proceden de las neuronas glutamatérgicas del subnúcleo dorsolateral del NTS que reciben la información procedente de los barorreceptores y de los quimiorreceptores periféricos (Chan y Sawchenko, 1998; Guyenet *et al.*, 1987; McAllen y Spyer 1978) y de la respiración a través del preBötzC (Neff *et al.*, 2004) (Fig. 1); la actividad del NA se inhibe durante la fase inspiratoria (I) y la fase espiratoria E2 y se excita durante la fase post-inhibitoria E1 (Mendelowitz, 1999), mientras que la activación de los barorreceptores y quimiorreceptores periféricos ejerce un potente efecto excitador sobre las neuronas del NA durante la fase espiratoria E1 de la respiración y resultan ineficaces si ocurren durante la fase inspiratoria y espiratoria E2 (Daly, 1997), indicando que la respiración ejerce un efecto de compuerta (*i.e.*, “gating”) sobre las otras entradas al NTS. Las NPVc del NA fundamentalmente controlan la actividad del nodo auricular y la conducción auricular, regulando de forma precisa la frecuencia cardiaca.

Las neuronas preganglionares de vagales del NMDV descargan tónicamente activas a baja frecuencia (0,5 - 5 Hz) (Ballanyi *et al.*, 1996; McTigue *et al.*, 1997), y reciben aferencias glutamatérgicas, GABAérgicas y catecolaminérgicas del NTS de los núcleos hipotalámicos y otras áreas del prosencéfalo (Powley, 2000). La actividad tónica de las NPVcs del NMDV es responsable de la modulación parasimpática de la inotropía y excitabilidad ventricular, y podría tener un efecto protector frente a las arritmias ventriculares y las lesiones de isquemia cardiaca (Gourine *et al.*, 2016).

1.3.2. Regulación simpática cardiovascular.

La regulación simpática cardiovascular está mediada por las neuronas pre-simpáticas supraespinales localizadas en la región rostro-caudo-ventrolateral del tronco encefálico (RVLM: “rostral ventrolateral medullary” y CVLM: “caudal ventrolateral medullary”), que son en su mayoría glutamatérgicas, y por las neuronas de la región ventrolateral intermedia (IVLM: “intermediate ventrolateral medullary”) glicinérgicas y GABAérgicas (Deuchars, 2007) (Fig. 1). A las neuronas pre-simpáticas C1 del RVLM se les ha implicado en el mantenimiento del tono vasomotor simpático (Schreihofer y Guyenet, 1997) y regulación inotrópica y cronotrópica del corazón (Guyenet *et al.*, 2013). La actividad del RVLM está regulada por entradas inhibitorias procedentes de neuronas pre-simpáticas del IVLM (Guyenet *et al.*, 2013); las neuronas GABAérgicas de IVLM son activadas por las aferencias procedentes de

los barorreceptores arteriales (Schreihöfer y Guyenet, 2003); Schreihöfer y Sved, 2011) e inhibidas por las neuronas respiratorias tipo early-I del GRPI_{rv} y las neuronas tipo post-I del BötC (Mandel y Schreihöfer, 2006) (Fig. 1). La región CVLM glutamatérgica recibe excitación fásica vía NTS y su activación provoca la excitación masiva del RVLM incrementando la presión arterial (Natarajan y Morrison, 2000) (Fig. 1).

1.3.3. Acoplamiento cardiorrespiratorio.

Los sistemas cardiovascular y respiratorio interactúan de forma compleja a través de distintos mecanismos que permiten ajustar la actividad cardíaca a la respiración, coordinando así la perfusión vascular con la ventilación pulmonar. Se han identificado dos tipos de acoplamiento cardiorrespiratorio, la arritmia sinusal respiratoria (RSA: “respiratory sinus arrhythmia”) y la sincronización de fase cardiorrespiratoria (CRPS: “cardiorespiratory phase synchronization”).

1.3.3.1. Arritmia sinusal respiratoria (RSA).

La RSA se define como la modulación de la frecuencia cardíaca que ocurre durante el ciclo respiratorio, consistente en un aumento de la frecuencia cardíaca (FC) durante la fase de inspiración y su disminución durante la fase de espiración (Anrep *et al.*, 1936); la RSA es un tipo de arritmia fisiológica cuyo posible significado es el de ajustar el flujo sanguíneo pulmonar a la distensión alveolar y optimizar así el intercambio gaseoso (Hayano *et al.*, 1996). La RSA aumenta durante desarrollo postnatal hasta la edad adulta y luego disminuye (Mathewson *et al.*, 2014; Shykoff *et al.*, 1991), y es menor en vigilia y sueño REM que en sueño NREM (Bartsch y Plamen, 2014). La RSA persiste en los animales al seccionar las vías simpáticas y en los pacientes tetraplégicos con lesión medular, disfunción simpática y persiste después de bloquear la actividad simpática mediante la administración de antagonistas beta-adrenérgicos (Daly, 1997; Shykoff *et al.*, 1991), sin embargo, el bloqueo de la actividad parasimpática con atropina reduce significativamente la RSA, lo que indica que esta interacción cardiorrespiratoria está predominantemente mediada por la actividad de las neuronas vagales cardíacas. Actualmente se acepta que la RSA se origina en las NPVc del NA, que se silencian durante la fase inspiratoria (I) y la fase espiratoria E2, y que disparan más rápidamente en la fase postinhibitoria E1 (Mendelowitz, 1999; Neff *et al.*, 2004). Durante la hipoxia la RSA disminuye y durante la hipercapnia aumenta (Yasuma *et al.*, 2001; Saito *et al.*, 2006).

1.3.3.2. Sincronización de fase cardiorrespiratoria (CRPS).

La CRPS permite correlacionar la ocurrencia de los latidos cardiacos en un valor de fase fijo de ciclo respiratorio durante las sucesivas respiraciones (Bartsch y Plamen, 2014). Los estudios realizados en individuos sanos adultos en condiciones basales de vigilia tranquila muestran que la CRPS ocurre de forma transitoria alternando periodos “on” y “off”. Durante los periodos “on”, la frecuencia cardiaca (n) está enganchada con la frecuencia respiratoria (m) típicamente en un orden enganche entero ($m:n$) 1:3 o superior (Bartsch y Plamen, 2014), que en humanos se corresponde bien con una relación de frecuencias respiratoria y cardiaca de 15-25 rpm y 60-80 lpm en reposo. La CRPS varía en función del ciclo vigilia-sueño, es mayor durante el sueño NREM que en vigilia y sueño REM (Bartsch *et al.*, 2012), aumenta en condiciones de hipoxia (Zhang *et al.*, 2014) y disminuye en individuos con apneas centrales (Solà-Soler *et al.*, 2015). La RSA y la CRPS parecen reflejan distintos aspectos e incluso antagónicos de la interacción cardiorrespiratoria; en individuos sanos se han podido observar periodos con una marcada RSA con y sin CRPS, además los cambios en CRPS que ocurren durante los estados de vigilia-sueño son mucho más marcados que los tienen lugar en la amplitud de la RSA (Bartsch *et al.*, 2012). Los mecanismos mediante los cuales se produce la CRPS se desconocen, únicamente se ha podido establecer una correlación entre el grado CRPS con los cambios en la actividad del tono simpático y parasimpático, la mayor CRPS durante NREM coincide con un mayor nivel de actividad parasimpática, mientras el menor grado de CPRS se asocia una actividad simpática aumenta como ocurre en vigilia y sueño REM o durante las apneas (Bartsch *et al.*, 2012).

1.4. Modulación de la respiración durante el sueño.

La respiración muestra importantes cambios fisiológicos durante el sueño; durante el NREM se produce un reducción de la frecuencia respiratoria y de la amplitud ventilatoria y aumenta la regularidad del ritmo respiratorio (Kubin, 2016), asociados a una reducción en el consumo de O_2 y en la producción de CO_2 (Coote, 1982). Por el contrario, durante el REM se produce un aumento fásico de la frecuencia, la amplitud ventilatoria disminuye y la respiración se vuelve irregular (Fraigne y Orem, 2011; Aserinsky y Kleitman, 1953). Durante el sueño también se producen apneas fisiológicas por la falta de uno o varios ciclos respiratorios (>10 s); y “suspiros” o fluctuaciones fisiológicas de la amplitud y frecuencia respiratoria durante cortos periodos que consisten en una inspiración profunda seguida

frecuentemente de una pausa respiratoria (Javaheri y Dempsey, 2013); esta actividad transitoria se inicia en regiones corticales y subcorticales implicadas en el despertar y se generan por la interacción de los osciladores preBötzC y PCi (Anderson *et al.*, 2016). La reducción de la actividad respiratoria durante el sueño NREM se ha atribuido a la reducción de las entradas excitatorias que a nivel local y provenientes de otras estructuras superiores mantienen la actividad del centro respiratorio en vigilia, dependiendo por tanto más la respiración en NREM de la propia autorritmicidad del preBötzC (McKay *et al.*, 2005; Yeh *et al.*, 2017). Durante el sueño NREM, los quimorreflejos a la hipoxia e hipercapnia contribuyen de forma importante al mantenimiento de la actividad respiratoria, mientras que durante REM su contribución está disminuida (Burke *et al.*, 2015); el aumento de la frecuencia y la amplitud respiratoria por la hipercapnia en NREM está fundamentalmente mediado por el NRT, aunque también depende de los cuerpos carotideos (Burke *et al.*, 2015; Nattie, 2001); sin embargo, el umbral de detección al CO₂ (*i.e.*, “set point”) está elevado y es suficiente una disminución de solo 3-5 mmHg en la PaCO₂ para que se produzcan apneas centrales (Javaheri y Dempsey, 2013). En los pacientes CCHS con un desarrollo anormal del NRT y unos quimiorreflejos disminuidos se producen frecuentes apneas durante NREM (Burke *et al.*, 2015; Goridis y Brunet, 2010; Lavezzi *et al.*, 2012; Nobuta *et al.*, 2015). Durante el sueño REM la ventilación respiratoria se reduce significativamente, dicha reducción podría deberse, al menos en parte, a la atonía de los músculos respiratorios que mantienen permeable las vías aéreas superiores y que podría explicar que este estadio de sueño sea más propenso al desarrollo de apneas obstructivas (Ramírez *et al.*, 2013); junto a esta atonía muscular en REM también se produce una importante irregularidad de la respiración y una reducción del umbral al CO₂ que tienen su origen en la masiva aferencia sobre el centro respiratorio de entradas excitadoras procedentes de la estructuras de la protuberancia que promueven el sueño REM (Orem *et al.*, 2000; Radulovacki *et al.*, 2004). A su vez durante el sueño, la activación de forma combinada de los quimiorreceptores centrales y periféricos puede provocar las transiciones de sueño a vigilia (*i.e.*, los despertares o “arousals”) (Ayas *et al.*, 2000; Berry y Gleeson, 1997; Guyenet y Abbott, 2013). El NRT de forma directa o indirectamente activando las neuronas C1 simpáticas del RVLM podría estar implicado en este mecanismo, ya que la fotoestimulación de ambas estructuras durante NREM promueve un aumento del número de despertares y la aparición de suspiros (Abbott *et al.*, 2013; Burke *et al.*, 1985; Burke *et al.*, 2014). Los

neurotransmisores implicados en la regulación del ciclo vigilia-sueño también participan en la modulación de la ritmicidad respiratoria y de los quimiorreflejos; durante la vigilia, la noradrenalina y la serotonina aumentan la actividad del preBötzC (Ramirez *et al.*, 2013), la orexina y la serotonina facilitan los quimiorreflejos activando a las neuronas quimiosensibles glutamatérgicas al CO₂ del NRT (Lazarenko *et al.*, 2011; Li y Nattie, 2010) y noradrenérgicas del LC (Carter, *et al.*, 2010) (Alexandre *et al.*, 2013), que están activas durante vigilia, disminuyendo su actividad durante NREM y están prácticamente inactivas en REM (Garcia-Rill *et al.*, 2008).

1.5. Síndrome de muerte súbita de la infancia (SIDS).

El síndrome de muerte súbita de la infancia se define por un diagnóstico de exclusión: una muerte que ocurre de forma repentina durante el primer año de vida y cuya causa permanece sin explicarse después de practicarse la autopsia y de revisar cuidadosamente la escena de la muerte y la historia clínica. Tiene una incidencia de 1:2.500-5.000, constituyendo la principal causa de muerte postnatal en nuestro entorno (<http://www.cdc.gov/sids/>). Su etiología es muy heterogénea; recientes estudios indican que entre el 10-15% de los casos de SIDS podrían deberse a síndromes hereditarios de arritmia cardíaca por mutaciones en distintos canales iónicos cardíacos como los que causan varias formas del síndrome de QT largo, el gen *SCN5A* (Ackerman *et al.*, 2001; Schwartz *et al.*, 2000; Plant *et al.*, 2006) y el *KCNQ1* (Schwartz *et al.*, 2001), o en el gen *GJA1* que codifica para los canales intercelulares cardíacos de Cx43 (Van Norstrand *et al.*, 2012). Sin embargo, en la mayoría de los casos no se ha identificado una causa genética; en general, se acepta que en el SIDS concurren una compleja interacción de factores genéticos y ambientales, y que se origina por un defecto central en el control de la respiración y de la regulación autonómica del sistema cardiovascular (García *et al.*, 2013). En este contexto se han identificados ciertos polimorfismos predisponentes en el gen *SLC6A* que codifica para el transportador de serotonina 5-TTH (Narita *et al.*, 2001), en el gen *PACAP*, que codifica para el polipéptido pituitario activador de la adenilatociclasa (Cummings *et al.*, 2009) y las mutaciones en el gen *NalcN* del canal de “fuga” de sodio no selectivo (Chong *et al.*, 2015; Gal *et al.*, 2016). Para un mejor abordaje de la etiopatogenia del SIDS se propuso hace años la hipótesis de “triple riesgo” (Filiano y Kinney, 1994); dicha hipótesis contempla la existencia de dos factores predisponentes intrínsecos: una inherente vulnerabilidad del individuo, la existencia de un periodo crítico en el desarrollo postnatal del control cardiorrespiratorio, y un

tercer factor externo o estímulo desencadenante. El factor de riesgo desencadenante más reconocido es la “asfixia” que se produce cuando el lactante/infante respira su propio aire; en estas condiciones la concentración del aire inhalado contiene menos O_2 y más CO_2 (hipoxia-hipercapnia). El reconocimiento de que la posición de decúbito prono es el mayor factor de riesgo en el SIDS, no sólo ha permitido salvar vidas por la campaña para dormir en la posición de decúbito supino, sino que también ha permitido identificar que la vía final común que conduce al SIDS es el estrés cardiorrespiratorio asociada a deficiencias en los mecanismos del “despertar” (“arousal”) y de “autorresucitación”; en los estudios retrospectivos de las víctimas de SIDS se ha encontrado frecuentes episodios de desaturación durante el sueño precedidos por apneas centrales (Sally *et al.*, 2012) y un número reducido de “despertares” y de “suspiros” (Kahn *et al.*, 1988). En condiciones normales la secuencia estereotipada de acontecimientos que conducen al SIDS tiene su origen en una hipoxia que desencadena el despertar del individuo, el cambio de postura y la generación de respiraciones profundas o “suspiros” (“sigh”); los “suspiros” son eventos que se consideran forman parte de la respuesta adaptativa ante situaciones de hipoxia, se inician en las aéreas corticales y subcorticales implicadas en el despertar y se generan finalmente a nivel del preBötzC, que es intrínsecamente sensible a la hipoxia (Lieske *et al.*, 2000). Sin embargo, sí el mecanismo de los “despertares” fracasa se alcanza un estado más severo de hipoxia y la respiración pasa a ser de tipo “jadeante” (“gasping”). El “jadeo” se considera como el último recurso de la “autorresucitación”, pero desafortunadamente en las víctimas del SIDS el “jadeo” se genera durante un menor periodo de tiempo durante la hipoxia severa y parece ser menos eficaz en incrementar la frecuencia cardíaca (Poets *et al.*, 1999). La mayor incidencia de SIDS en infantes que viven en altas altitudes es consistente con la hipótesis de que la hipoxia es un importante factor de riesgo en el SIDS (Katz *et al.*, 2015). La hipoxia no sólo afecta a la respiración sino también a la frecuencia cardíaca, que se incrementa durante el mismo periodo de tiempo en el que aumenta la frecuencia respiratoria, pero a medida que la frecuencia respiratoria disminuye durante la hipoxia mantenida se produce una progresiva bradicardia; sobre esta bradicardia se observan incrementos transitorios de la frecuencia cardíaca cada vez que ocurre un “suspiro” o un “jadeo” (Harper *et al.*, 2000). La alteración de los mecanismos de acoplamiento cardiorrespiratorio también parecen predisponer al SIDS; la presencia de una severa bradicardia junto a una menor RSA parece ser una constante en el SIDS (Franco *et al.*, 2003). En los pacientes con CCHS por

mutaciones en el gen de *Phox2B* que provoca una pérdida de las neuronas del NRT y del quimiorreflejo a la hipercapnia, y un desarrollo anormal de las regiones que median la regulación autonómica cardiorrespiratoria también tienen el riesgo de SIDS elevado (Goridis y Brunet, 2010); en este contexto, se han identificado alteraciones estructurales y de la expresión de *Phox2B* en el NRT en pacientes de SIDS (Lavezzi *et al.*, 2012). Finalmente, el mantenimiento de la ritmicidad intrínseca respiratoria y la liberación de sustancias neuromoduladoras, como la sustancia P o la serotonina, que son necesarias para incrementar esta actividad rítmica parecen tener un papel clave en el SIDS; el bloqueo de los receptores 5-HT_{2A} para serotonina suprime la ritmicidad endógena de neuronas I_{NaP} del preBötzC (Peña y Ramirez, 2002): en ausencia de liberación endógena de serotonina el patrón de jadeo a nivel de redes desaparece (Tryba *et al.*, 2006) y a nivel de animal intacto la depleción de la neuromodulación serotoninérgica en los núcleos del raquí mediante distintas estrategias experimentales, incrementa el riesgo de SIDS durante el periodo perinatal P9-P11 (Cummings *et al.*, 2011). En consonancia con estos resultados preclínicos existen numerosas evidencias de alteraciones en la transmisión serotoninérgica en pacientes de SIDS (Kinney, 2005) y de mutaciones en el canal de “fuga” de sodio no selectivo (*NalcN*), que contribuye a restablecer el potencial de membrana, la actividad rítmica y que media la respuesta a la sustancia P en las neuronas del NRT y del preBötzC (Yeh *et al.*, 2017), que provocan severas disfunciones respiratorias en humanos (Chong *et al.*, 2015; Gal *et al.*, 2016) y su delección en ratones causa periodos de apneas, depresión del ritmo respiratorio y, muerte al primer día de vida (Lu *et al.*, 2007).

1.6. Hipótesis sobre el papel de la conexina 36 en la ritmogénesis respiratoria, la quimiorrecepción y el acoplamiento cardiorrespiratorio.

En el SNC la señalización entre las neuronas tiene lugar a través de dos tipos de sinapsis: las químicas y las eléctricas. Las sinapsis eléctricas están formadas por canales intercelulares (CI) de conexinas (Cx). Los CI_s se forman en dos etapas; en una primera etapa se produce la oligomerización de seis conexinas alrededor de un poro central para formar los hemicanales o conexones que se transportan en vesículas hasta la membrana celular; en una segunda etapa se unen los hemicanales aportados por las células adyacentes para formar el canal intercelular completo que pone en comunicación directa los citoplasmas de las dos células. A través del poro de estos canales se produce el intercambio entre de iones y de otras

moléculas (metabólicos, segundos mensajeros, etc) en general de un tamaño inferior a 1 kDa. El equivalente eléctrico de una sinapsis eléctrica es una resistencia en serie entre las dos neuronas acopladas, constituyendo una vía de “baja resistencia” con propiedades de filtro pasa-bajos para la transmisión rápida, segura, graduada y bidireccional de las señales eléctricas entre las neuronas; el conjunto de neuronas acopladas eléctricamente forman una red neuronal en el que la actividad de la población tiende a sincronizarse (Connors y Long, 2004; Galarreta y Hestrin, 2001); dicha sincronización facilita la generación de la actividad rítmica entre las neuronas acopladas y permite responder al conjunto de ellas ante un estímulo o entrada sináptica.

La conexina 36 (Cx36) es la principal conexina neuronal formadora de sinapsis de tipo eléctrico en el SNC. La Cx36 forma Cl_s con características únicas que determina muchas de las propiedades biológicas y funcionales del acoplamiento neuronal; la Cx36 solo forma canales de tipo homomérico homotípico (*i.e.*, no se combina con ninguna otra conexina) (Al-Ubaidi *et al.*, 2000), lo cual implica que solo se acoplaran entre sí neuronas del mismo tipo que expresen la Cx36. La conductancia unitaria de los Cl_s de Cx36 es de ~ 10 pS (Srinivas *et al.*, 1999), un valor muy pequeño que implica en general un bajo coeficiente acoplamiento (Galarreta *et al.*, 2004; García-Rill *et al.*, 2007). El grado de acoplamiento además de estar determinado por el valor de la conductancia unitaria y por el número de canales también depende de su probabilidad de apertura que está regulada a través de distintos mecanismos de compuerta que confieren plasticidad a las sinapsis eléctricas; los Cl_s de Cx36 son poco sensibles a la diferencia de potencial entre los citoplasmas de las células acopladas o voltaje intercelular (Srinivas *et al.*, 1999) y son insensibles a cambios en el potencial de membrana (González-Nieto *et al.*, 2008), sugiriendo que la regulación por voltaje no contribuye de forma significativa a la plasticidad sináptica. A diferencia de otros canales de conexina que se cierran por acidosis, los canales de Cx36 se bloquean por alcalosis (González-Nieto *et al.*, 2008); la curva de sensibilidad al pH intracelular tiene un pKa de 7,86, indicando que en condiciones basales la mayoría de los canales ($\sim 80\%$) están abiertos, y que en condiciones de acidosis podrían llegarse abrirse un 20% adicional; actualmente desconocemos cuál es la relevancia fisiológica o patológica del cierre de los canales de Cx36 con la alcalosis. El acoplamiento entre las neuronas también está regulado por el grado fosforilación de la Cx36; la fosforilación de los residuos S293 y S110 de la Cx36 por la proteína-quinasa A induce el bloqueo de los canales (Urschel *et al.*,

2006), mientras que la fosforilación por la proteína-quinasa II regulada por Ca^{2+} /calmodulina los abre (Pereda *et al.*, 1998). La Cx36 no solo forma Cl_s , también los hemicanales de Cx36 son funcionales que se activan por despolarización del potencial de membrana y se inhiben en concentraciones fisiológicas de cationes divalentes en el medio extracelular y de glucosa (pKa 8 mM), y son capaces de liberar ATP y ADP al medio extracelular (Pizarro-Delgado *et al.*, 2014; Schock *et al.*, 2008).

La Cx36 se expresa intensamente en retina y algo menos en el resto del SNC; el patrón de expresión en el adulto es muy amplio incluyendo, entre otras estructuras, la corteza, el sistema olfatorio, el hipocampo, la amígdala, el núcleo reticular del tálamo y varios núcleos del propio tálamo, el estriado, el hipotálamo, el cerebelo, la oliva inferior y multitud de núcleos del tronco del encéfalo y de la medula espinal (Belluardo *et al.*, 1999; Belluardo *et al.*, 2000; Condorelli *et al.*, 1998; Deans *et al.*, 2001; Parenti *et al.*, 2000; Söhl *et al.*, 1998). El tipo neuronal que preferentemente expresa la Cx36 son las interneuronas (Belluardo *et al.*, 2000; Deans *et al.*, 2001). En los roedores se ha podido determinar que el patrón de expresión de la Cx36 está regulado durante el desarrollo postnatal de forma similar en distintas estructuras del SNC; los niveles se incrementan bruscamente desde el nacimiento hasta alcanzar el pico de expresión entre la primera y segunda semana postnatal (P7-P14) y posteriormente se reducen progresivamente durante las siguientes tres semanas hasta estabilizarse en la vida adulta (Belluardo *et al.*, 2000; García-Hill *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2011; Rash *et al.*, 2007; Söhl *et al.*, 1998), sugiriendo que la comunicación mediada por la Cx36 está implicada en la maduración de la circuitería neuronal (Belousov y Fontes, 2013; Zolnik y Connors, 2016).

La generación del ratón Cx36-knockout (Cx36KO) ha permitido determinar el importante papel que desempeña la comunicación intercelular mediada Cx36 en el acoplamiento eléctrico entre las interneuronas de hipocampo, en la sincronización lateral de la corteza, en la generación *in vitro* e *in vivo* del ritmo gamma (40-100 Hz) (Buhl *et al.*, 2003; Deans *et al.*, 2001; Hormuzdi *et al.*, 2001). Este modelo también se ha utilizado para determinar que la Cx36 media la sincronización de las neuronas marcapasos del núcleo supraquiasmático (NSQ) contribuyendo a la auto-sostenibilidad del reloj circadiano (Long *et al.*, 2005). Los estudios *in vitro* utilizando rodajas de los ratones Cx36-KO han mostrado evidencia de que la sinapsis de Cx36 son también necesarias para sincronizar las redes inhibitorias en el núcleo reticular

del tálamo (Landisman *et al.*, 2002). En la oliva inferior el acoplamiento eléctrico mediado por la Cx36 es esencial para la coordinación temporal y el aprendizaje del control motor (Long *et al.*, 2002; Van Der Giessen *et al.*, 2008). En la retina, la ausencia de expresión de la Cx36 produce un defecto en la visión escotópica (Güldenagel *et al.*, 2001), y en el sistema auditivo eleva el umbral auditivo a nivel del tronco del encéfalo (Blakley *et al.*, 2015). Además los ratones Cx36KO, aunque no muestran un fenotipo epiléptico, tienen una sensibilidad incrementada a desarrollar epilepsia inducida con pentilentetrazol (PTZ): un antagonista GABAA (Jacobson *et al.*, 2010).

La Cx36 también se expresa abundantemente en las aéreas del tronco del encéfalo relacionadas con la ritmogénesis respiratoria y la quimiorrepción central, pero sin embargo en la actualidad no se ha descrito un fenotipo respiratorio en los ratones Cx36KO. Primero, mediante hibridación *in situ* se detectó la expresión de la Cx36 en ratones y ratas adultos en los núcleos NTS, NMDV, NA, preBötzC y en el núcleo motor inspiratorio del hipogloso XII (Condorelli *et al.*, 1998; Parenti *et al.*, 2000); posteriormente se confirmó la expresión Cx36 a nivel de proteína en esos mismos núcleos y en otros propuestos como quimiorreceptores centrales para CO₂ o/y ritmogénicos como: el NRT, el NR y el LC (Solomon, 2003). Los niveles de expresión de la Cx36 en estos núcleos está regulado durante el desarrollo postnatal de forma similar al descrito en otras estructuras, está elevado en P14 y se reduce en la vida adulta (Solomon 2003; Rash *et al.*, 2007). Mediante registros electrofisiológicos simultáneos de pares de neuronas o por la técnica de difusión intercelular de colorantes se ha demostrado el acoplamiento eléctrico o anatómico entre las neuronas del NTS y del NMDV (Huang *et al.*, 1997), del LC (Oyamada *et al.*, 1999), entre las neuronas rítmicas del preBötzC y entre las motoneuronas respiratorias inspiratorias del hipogloso (XII) y del geniogloso, y del núcleo ambiguo (Rekling y Feldman 1997; Rekling *et al.*, 2000). Los registros entre pares de neuronas rítmicas NK1R del complejo preBötzC muestran una actividad eléctrica perfectamente sincronizada, tanto durante la trayectoria subumbral del potencial marcapasos como durante las descargas de potenciales de acción (Rekling *et al.*, 2000), sugiriendo que el acoplamiento eléctrico podría contribuir a promover la ritmogénesis respiratoria. La depresión del ritmo respiratorio y el cese final de la actividad rítmica que se observa con la aplicación local en el preBötzC de la carbenoxolona, un bloqueante de los canales intercelulares, parecen apoyar esta hipótesis (Elsen *et al.*, 2008). La Cx36 podría tener también un importante papel en

la quimiorrecepción central ya que un alto porcentaje de las neuronas quimiosensibles al CO₂/pH del LC, NTS y del NMDV están acopladas eléctricamente y por colorantes antes y durante la exposición a una acidosis hipercapnica (Huang *et al.*, 1997; Oyamada *et al.*, 1999; Solomon y Dean, 2002); esta ausencia de bloqueo del acoplamiento en condiciones de acidosis es consistente con las propiedades de regulación por pH *in vitro* de los CIs de Cx36 (González-Nieto *et al.*, 2008). La aplicación local de carbenoxolona sobre el NRT, el principal núcleo quimiorreceptor a nivel central, reduce el incremento ventilatorio inducido por hipercapnia en las ratas conscientes menores de 11 semanas (Hewitt *et al.*, 2004), sugiriendo que la sincronización de la actividad entre las neuronas quimiosensibles amplifica la respuesta ventilatoria al CO₂.

Basándonos en los antecedentes expuestos, en este trabajo se hipotétiza que los ratones deficientes en Cx36 podrían presentar alteraciones en la ritmicidad respiratoria y en la generación del patrón motor respiratorio, en los quimiorreflejos a la hipoxia/hipercapnia o/y en el control simpático y parasimpático del acoplamiento cardiorrespiratorio. Dichas alteraciones a su vez podrían elevar el riesgo de sufrir un síndrome de muerte súbita de la infancia, coincidiendo con el periodo de máxima expresión de la Cx36, y de apneas centrales en la vida adulta.

II. OBJETIVOS

PRIMER OBJETIVO:**“CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO CARDIORRESPIRATORIO DE LOS RATONES DEFICIENTES EN CONEXINA-36 DURANTE LA LACTANCIA Y EN LA EDAD ADULTA”**

Primero, se estudiará en los ratones conscientes silvestres y Cx36KO la ritmicidad respiratoria y cardíaca y los mecanismos de acoplamiento cardiorrespiratorio durante la lactancia, y cuáles son los cambios madurativos que ocurren hasta la vida adulta en función del genotipo. Posteriormente, se analizarán en los ratones adultos jóvenes cómo se modula la respiración en función del estado conductual de los animales, la vigilia, el sueño profundo (NREM) y el sueño paradójico (REM), y finalmente, se valorará el control homeostático gaseoso y el equilibrio ácido-base.

SEGUNDO OBJETIVO:**“ESTUDIO DE LOS QUIMIORREFLEJOS CARDIORRESPIRATORIOS A LA HIPOXIA Y LA HIPERCAPNIA EN LOS RATONES DEFICIENTES EN Cx36 DURANTE LA LACTANCIA Y EN LA EDAD ADULTA”**

En este objetivo se incluye: i) la caracterización de las respuestas cardiorrespiratorias de los ratones silvestres y Cx36KO a la reducción del contenido en O₂ (hipoxia-normocapnia) y del incremento del CO₂ (hipercapnia-normoxia) en el aire inspirado durante la lactancia y en la vida adulta, y ii) el estudio de los mecanismos de acoplamiento cardiorrespiratorio que coordinan las funciones respiratoria y cardíaca durante estos quimiorreflejos.

TERCER OBJETIVO:**“EFECTO DE LA AUSENCIA DE EXPRESIÓN DE LA Cx36 SOBRE LA SUSCEPTIBILIDAD A LA MUERTE SÚBITA DE LA INFANCIA POR ESTRÉS RESPIRATORIO”**

Primero, se caracterizarán las respuestas y los mecanismos de acoplamiento cardiorrespiratorio de los ratones lactantes (P14) silvestres y Cx36KO a la “asfixia” (hipoxia-hipercapnia), el principal factor desencadenante de muerte súbita de la infancia, y a continuación se determinará cuál es la susceptibilidad a sufrir muerte súbita en función del genotipo, y se identificarán cuáles son los mecanismos fisiopatológicos que la desencadenan.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL DE LOS OBJETIVOS.

Para la valoración del papel de la conexina 36 en la ritmicidad respiratoria y cardiaca, en los quimiorreflejos y en el acoplamiento cardiorrespiratorio se utilizó el modelo animal del ratón Cx36-knockout (Deans *et al.*, 2001); todos los experimentos se realizaron en ratones conscientes, sin anestesia, de 14 días de vida (P14) y en ratones adultos jóvenes de tres meses (M3), silvestres (WT) y deficientes en la Cx36 (Cx36KO).

El desarrollo experimental del trabajo se ha realizado fundamentalmente en cuatro etapas. Primero se determinó, en condiciones basales de vigila tranquila en ratones neonatos y adultos los parámetros de ritmicidad respiratoria y cardiaca y los mecanismos acoplamiento cardiorrespiratorio. A continuación, se analizó la regulación de la respiración en los ratones adultos (M3) en función de los estados conductuales de vigilia y sueño NREM y REM, y el equilibrio ácido-base. Posteriormente, se estudiaron durante la lactancia y la vida adulta los quimiorreflejos a la hipoxia y la hipercapnia y sus mecanismos de acoplamiento cardiorrespiratorio. Finalmente, se estudió la susceptibilidad de los ratones lactantes WT y Cx36KO a sucumbir por estrés respiratorio.

3.1. Animales de experimentación.

Los ratones silvestres (WT) y Cx36 knockout (KO) (C57/BL6) proceden de nuestra colonia que hemos generado a partir de varias parejas de ratones heterocigotos gentilmente suministradas por David L. Paul (Harvard Medical School, Boston, USA; Deans *et al.*, 2001). En este ratón knockout 'constitutivo' se ha sustituido la región codificante de la Cx36 por una casete que contiene el gen LacZ como reportador (Fig. 2, A). Todos los procedimientos que se han llevado a cabo en este trabajo cuentan con la aprobación del Comité Ético de Bienestar Animal del HRyC, de conformidad con el R.D. 53/2013, y son realizados por personas en posesión de la acreditación oficial para la manipulación de animales. Los ratones han sido criados y mantenidos jaulas individuales en las dependencias del Animalario del HRyC, con un ciclo de luz-oscuridad de 12/12 horas con comida y bebida *ad libitum*.

Figura 2. Procedimientos experimentales (I). **A**) Genotipado de los alelos silvestre (i) y Cx36KO (ii) con cebadores específicos; la amplificación por PCR da lugar respectivamente a una banda de 416 y 246 bp. **B**) Configuración de los electrodos de los registros de EEG (i y ii-1) y del registro de la ventilación pulmonar con un sensor magnético (ii-2). **C**) Espectros de potencia de las señales en corteza e hipocampo, mostrando en vigilia una alta desincronización, en sueño NREM un aumento de la potencia delta y en sueño REM un incremento de la potencia theta en hipocampo y desincronización en corteza.

3.2. Genotipado.

El genotipado de los ratones se realiza por PCR utilizando como molde el ADN genómico extraído de la cola. Primero, se anestesia a los ratones con 2,5 % de isoflurano antes de cortarles 1 cm de cola, y se les aplica un antiséptico y desinfectante, nitrato de plata 50 mg en barra cutánea sobre la herida. A continuación, se trocea la muestra y se incuba a 50°C durante toda la noche en un buffer de lisis (1 M Tris pH 7.5, 5 M NaCl, 0.5 M EDTA, 20 % SDS 0,02 % proteinasa-K (Gibco-BRL); posteriormente, se añade acetato potásico 8 M y cloroformo y se centrifuga 1.400 rpm, finalmente se añade etanol y se centrifuga a 10.000 rpm; al pellet se añade 200 µl de agua estéril y posteriormente se mide la concentración y la pureza del DNA genómico en un espectrofotómetro (Nanodrop ND-1000). Para la amplificación por PCR se utilizan tres cebadores, uno común para los alelos WT y Cx36KO (mCx36WTex1-F: 5' CCCCACTCCCCTCTTTAA GT 3') y dos específicos para cada tipo de alelo (mCx36WTex1-R: 5' CCCTTAATGCAGGCAACACTG 3', y Cx36KOLacZ-R: CTGCTGCAAGGCGATTAA GT 3'), que dan lugar a un fragmento de 416 bp en el caso del alelo WT y de 246 bp en el caso del alelo Cx36KO (Fig. 2A, *i-ii*). El protocolo de la reacción de PCR consistió en: 95°C 3 min, 40 ciclos de desnaturalización a 95°C 40 s, de alineamiento a 58°C 40 s y de extensión 72°C 40 s, con una elongación final a 72 °C de 7 min. El producto de la PCR se corre en un gel de agarosa al 10 %; en los ratones silvestres se obtiene una única banda de 416 bp, en los ratones Cx36KO homocigotos una de 256 bp, y en los heterocigotos Cx36KO una banda de cada tamaño (Fig. 2A, *iii*).

3.3. Estudios de la respiración durante el sueño.

3.3.1. Implantación de los electrodos.

Primero, se introduce a los ratones en una cámara con una perfusión con 2-4 % de isoflurano en 100 % O₂, y una vez que se ha alcanzado un nivel profundo de analgesia/anestesia se colocan en el estereotáxico, donde se mantienen durante la cirugía con soporte de 100 % O₂ y monitorización continua de la respiración. Los niveles de isoflurano de mantenimiento durante la cirugía varían entre 1-2 %, y se les mantiene la temperatura corporal controlada (36-37 °C) con una manta térmica. A continuación se hacen trépanos en la calota para el implante de: i) un electrodo de níquel-cromo (140 µm) en región prefrontal de la corteza tomando como referencia el

bregma (rostral 1,5 mm; lateral 1,5 mm; ventral 1 mm; (Paxinos y Watson 2007), ii) un segundo electrodo en la región CA1 el hipocampo (rostral -2,4 mm; lateral 1,5 mm; ventral 1,5 mm) (Fig. 2B, i); la ubicación en la capa piramidal de CA1 se determina por la presencia en el registro de oscilaciones rápidas y la descarga sincronizada de las neuronas piramidales a la frecuencia theta (4-10 Hz), iii) dos tornillos de acero inoxidable de 3 mm de diámetro en la calota de la región prefrontal, que sirven de electrodo de tierra e indiferente, iv) otros dos tornillos se implantan caudalmente a lambda que sirven para fijación del casquete, v) una pequeña placa de plata en la musculatura de la nuca para el registro del EMG y vi) un electrodo en el tórax del animal (región intercostal) para el registro del ECG. Los electrodos se fijan a la calota con un adhesivo a base de etilcianoacrilato y cianoacrilato (LOCTITE 454 Henkel) y se colocan en un cabezal roscado de 6 canales, que se une a la calota con cemento (Codman Johnson&Johnson) (Fig. 2B, ii-1). Durante el post-operatorio y una vez recuperados de la anestesia cada ratón se inyecta con un analgésico (diclofenaco 9 mg/kg, *i.p.*) y un antibiótico (gentamicina 5 mg/kg *i.m.*) durante 5 días cada 12 horas.

3.3.2. Registros crónicos en animales sin restricción de movimiento.

Una vez transcurridos al menos 7 días desde la cirugía, a los ratones se les implanta sobre la piel un dispositivo sensor magnético de “efecto Hall”, desarrollado en nuestro laboratorio, para medir los movimientos respiratorios, consistente en un anillo magnético de 5 mm de diámetro y un detector de magnetismo (2.5 mm), que se colocan cada uno de ellos en un lado del tórax, lo que nos permite medir los desplazamientos de la caja torácica durante la inspiración y la espiración (Fig. 2, B ii-2). A continuación se coloca al ratón en una jaula circular, y se fija el casquete implantado a un conector rotatorio anti-gravitatorio, que les permite moverse y explorar libremente mientras que se registran las distintas señales. Después de un periodo de habituación de 48 h, se adquiere un registro continuo de 72 h de los canales correspondientes al EEG de la corteza, hipocampo, el EMG de la musculatura nuca, el ECG y de la respiración, se filtran entre 0,5 Hz a 500 Hz, se amplifican (x5000–10,000) (Cyberamp 380, Axon Instruments) y se digitalizan a 1 kHz (Axon CNS Digidata 1440).

3.3.3. Estadiaoje del sueño.

El estadiaoje de las épocas de vigilia-sueño se realiza off-line; primero se realiza con un sistema de estadiaoje de sueño automatizado, basado en “scripts” de MATLABv.2008 (Mathworks) y luego se valida de forma visual y semiautomática por dos expertos con el programa Spike 2 v.6.18 (Cambridge Electronic Design). Las señales crudas se las somete a una normalización z-score (unidad de normalización que permite comparaciones independientes de la magnitud de la medida) y luego se filtran por bandas: delta cortical (δ_{Cx} , 1-4 Hz), theta hipocampo (θ_{hip} , 4-10 Hz), sigma cortical (Σ_{Cx} , 11-15 Hz), beta cortical (β_{Cx} , 15-25 Hz), gamma-1 hipocampo (γ_{1hip} , 25-55 Hz) y gamma-2 hipocampo (γ_{2hip} , 55-125 Hz), y se calcula el RMS (“Root Mean Square”) de la señal (i.e., el valor cuadrático medio: medida estadística de magnitud de una cantidad variable) por la fórmula:

$$X_{RMS} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N X_i^2}$$

A continuación, se calcularon los índices θ_{hip}/δ_{Cx} y β_{Cx}/γ_{1hip} ; las épocas con bajo índice β_{Cx}/γ_{1hip} y un alto índice $(\theta_{hip}/\delta_{Cx})/EMG$ se asignan a periodos de vigilia, las épocas con índice $(\theta_{hip}/\delta_{Cx})/EMG$ bajo y β_{Cx}/γ_{1hip} altos corresponden a épocas de sueño NREM, y las épocas con índice θ_{hip}/δ_{Cx} alto y β_{Cx}/γ_{1hip} bajo a sueño REM (Tabla 1) y se construyen los correspondientes hipnogramas (Fig. 11). El correcto estadiaoje de las distintas épocas se confirmó mediante los correspondientes espectros de potencia de las señales EEG de cortex e hipocampo a través de la transformada de Fourier (Fig. 2C), que muestra en vigilia una alta desincronización en córtex e hipocampo, en sueño NREM un aumento de la potencia delta y en sueño REM un incremento de la potencia theta en hipocampo y desincronización en corteza, conforme a las característicos de la actividad EEG en los distintas épocas de sueño.

Tabla 1. Índices para asignación de estadios de sueño.

	θ_{hip}/δ_{Cx}	β_{Cx}/γ_{1hip}	<i>EMG</i>
WAKE	↑	↓	↑
NREM	↓	↑	↓
REM	↑	↓	↓↓

Finalmente, para el seguimiento del curso temporal de los cambios de frecuencia durante de los ciclos vigilia-sueño y de NREM-REM se utilizaron las gráficas de tiempo-frecuencia o espectrogramas de tiempo generadas con Spike-2.

3.3.4. Cadenas de Markov.

Las cadenas de Markov se aplican para el análisis de procesos estocásticos discretos en el tiempo en el que la probabilidad de que ocurra un evento (S_{t+1}) depende únicamente del evento inmediatamente anterior (S_t). Las cadenas de Markov para el estudio de la dinámica de las transiciones entre los distintos estadios de vigilia y sueño ya sido previamente utilizada (Stephenson *et al.*, 2013).

Las probabilidades de transición de estado de la etapa i a la etapa j en un intervalo de tiempo discreto (n), se describe por la fórmula:

$$P_{ij}^{(n)} = \Pr(X_n = j | X_0 = i)$$

El análisis de Markov se realizó utilizando el paquete markovchain R v. 0.6.5.1 (Spedicato, 2015), con un intervalo de tiempo de 10 s y las probabilidades de transición entre los estados de vigilia, NREM y REM se organizaron en una matriz de 3x3:

$$\begin{bmatrix} P_{vigilia} & P_{vigilia \rightarrow NREM} & P_{vigilia \rightarrow REM} \\ P_{NREM \rightarrow vigilia} & P_{NREM} & P_{NREM \rightarrow REM} \\ P_{REM \rightarrow Vigilia} & P_{REM \rightarrow NREM} & P_{REM} \end{bmatrix}$$

Las transiciones vigilia→NREM, NREM→REM y NREM→REM, detectadas mediante este procesamiento, se utilizaron como sincronismo para generar la función de correlación cruzada que permiten determinar los cambios en la frecuencia y amplitud respiratoria y en la frecuencia cardiaca durante estas transiciones (Fig. 13).

3.3.5. Detección de las apneas de sueño.

Para su detección se definió la apnea de sueño como una disminución de la amplitud de la respiración mayor de 2 desviaciones estándar de la media aritmética durante un periodo superior a 1,5 s que se corresponden a la falta de entre 4-6 ciclos respiratorios consecutivos (Nakamura y Kuwaki, 2003), y que equivale al criterio que

se utiliza en la clínica humana del cese de la respiración por más de 10 segundos o la falta de 1 o 2 respiraciones.

3.4. Estudio de la ritmicidad respiratoria y cardiaca, de los quimiorreflejos respiratorios y de los mecanismos de acoplamiento.

3.4.1. Procedimiento experimental.

Estos estudios se realizaron en animales despiertos de P14 y M3, silvestres y Cx36KO; los ratones introdujeron dentro de una cámara de intercambio gaseoso de 8 l de volumen a temperatura ambiente (22-25°C), se les inmovilizo por sus extremidades al suelo de la cámara y se les implanto los correspondientes dispositivos para la monitorización continua de: i) la ventilación pulmonar, con el dispositivo previamente descrito (ver 3.3.2., Fig. 2B, *ii-2*), ii) el ECG, con una derivación monopolar en el tórax usando como referencia un electrodo en cola, iii-v) la saturación de O₂ por oximetría pulsátil (SatO₂, %), la distensibilidad vascular y la señal pulso-a-pulso de absorbancia de la oxihemoglobina (660 nm), mediante un detector colocado en el cuello (MouseOx Starr), y vi) la presión parcial de CO₂ trascutánea (P_{tc}O₂, mmHg) con un sensor electroquímico (V-Sign™ Sensor 2, SenTec Digital Monitor) colocado sobre la piel del abdomen (Fig. 3A); aun cuando la resolución temporal del detector de CO₂ es rápida (~1 s) este dispositivo, que tiene la ventaja de no ser invasivo, tiene a su vez la limitación de que la medida de la presión de CO₂ tarda varios minutos en alcanzar los valores de estado, al tener que difundir el CO₂ desde los tejidos a través de la piel hasta el sensor.

En condiciones basales se perfunde la cámara con una mezcla de aire medicinal (6 l/ min). Después de permitir la aclimatación de los animales (30 min), se toma un registro basal y a continuación se aplican los estímulos de hipoxia en normocapnia (8 % O₂ con 90 % N₂), de hipercapnia en normoxia incrementando el porcentaje de CO₂ en aire medicinal al 4 %, 8 % y 12 % y de hipoxia-hipercapnia (*i.e.*, “asfixia”) con un 8 % de O₂ y a concentraciones crecientes de 4 %, 8 % y 12 % CO₂ completándose en todos los casos la mezcla con N₂. Estas mezclas de gases se hacen mediante un dispositivo mezclador-dosificador de fabricación propia, que garantiza la repetitividad de los estímulos y permite humidificador la mezcla de los gases; los niveles de O₂ y CO₂ dentro de la cámara se monitorizan continuamente con un analizador de gases (Morgan Medical) (Fig. 3B). La duración de cada estímulo es de 10 minutos, y entre los sucesivos estímulos se utiliza aire medicinal durante 40 minutos, confirmándose al final de este periodo la completa recuperación

Figura 3. Procedimientos experimentales (II). **A)** El dispositivo experimental consta de una cámara de registro con intercambio gaseoso en la que se ubica el ratón (i), un mezclador-dosificador de gases que controla el flujo y la mezcla de gases de la cámara (ii), un sistema de monitorización de los niveles de O₂ y CO₂ dentro de la cámara (iii) y los dispositivos de monitorización continua de los movimientos ventilatorios, del ECG, de la onda de oximetría del pulso (Oxi), de la saturación de oxígeno (SatO₂), de la presión transcutánea de CO₂ (P_{tc}CO₂) y de la distensibilidad vascular (DV). **B)** Protocolos de gases: hipoxia-normocapnia (i), normoxia-hipercapnia (ii) e hipoxia-hipercapnia (iii) con su correspondientes medidas de los cambios en la concentración de O₂ y el CO₂ dentro de la cámara de registro.

de todos los parámetros cardiorrespiratorios basales.

3.4.2. Procesamiento de las señales electrofisiológicas.

Las señales correspondientes a la ventilación respiratoria, el ECG, la SatO_2 , la P_{tcO_2} , y la distensibilidad vascular, previamente filtradas y amplificadas (ver 3.3.2) (Cyberamp 380, Axon Instruments), se digitalizaron para su adquisición (MICRO 1401 2501 CED, UK). Tras una primera inspección visual de las señales, se realizó el análisis off-line utilizando los algoritmos del software Spike-2 para generar los procesos puntuales correspondientes a las fases de inicio de la inspiración (I) y de la espiración (E), detectados por los valores mínimos y máximos de la ventilación, y la ocurrencia de la onda R dentro del complejo QRS del ECG por umbral.

Para determinar los parámetros que definen la ritmicidad respiratoria y cardiaca en condiciones basales, se calcularon los correspondientes histogramas de intervalos $I_n - I_{n+1}$ y $R_n - R_{n+1}$, la frecuencia instantánea de la respiración (FR_i) y de la actividad cardiaca (FC_i), y su cociente FC_i/FR_i , y para la estimación de su variabilidad se calculó el coeficiente de variación de los correspondientes intervalos. La ritmicidad respiratoria y cardiaca se evaluó mediante los histogramas de autocorrelación, que determinan la ocurrencia de los intervalos sucesivos $E_{(n)}^1$, $E_{(n)}^2 \dots E_{(n)}^n$, respecto a sí mismo, $E_{(n)}$, con una ventana de ± 2 s y un tiempo de análisis de 600 s. Esta metodología también se utiliza para analizar la correlación cruzada de los eventos respiratorios y los latidos cardiacos.

Para el cálculo de los valores promedios de los parámetros en condiciones basales o de la respuesta a los distintos estímulos, las señales procesadas de las distintas variables se recogieron en una gran matriz de datos que se analiza con MATLABv.2008 (Mathworks, USA); en esta matriz se incluyen todas las respuestas de los animales analizados, discriminadas en función de genotipo, edad y estímulo, y a partir de esta matriz se obtienen los valores promediados en épocas de 30 s. El análisis de las variables se realizó en valores absolutos y relativos, esto último para identificar el incremento respecto al valor basal. Los cambios en la amplitud respiratoria se analizan en función del RMS de la señal de respiración.

3.4.3. Análisis de la arritmia respiratoria sinusal (RSA).

El grado de modulación de la frecuencia cardiaca a lo largo del ciclo de la respiración o RSA se obtuvo calculando el valor instantáneo de la frecuencia cardiaca (FC_i), a partir del proceso puntual correspondiente a la onda R del complejo QRS del ECG con un detector automático de picos de Spike-2, al que se le restó su

valor medio; con dicha señal se calcula la función de correlación cruzada respecto al sincronismo de la respiración. El grado de RSA se cuantifica por la amplitud pico-valle del promedio de la modulación de frecuencia cardiaca en Hz (Fig. 7B, ii). En condiciones basales para el cálculo de la RSA se utilizó un tiempo de análisis 10 min, y para los estímulos de hipoxia, hipercapnia e hipoxia-hipercapnia los 3 últimos min que corresponden al estado estacionario de las respuestas.

3.4.4. Sincronización de fase cardiorrespiratoria (CPRS).

Para determinar el grado de sincronización de los latidos respecto con la fase del ciclo de la respiración se utilizó el histograma de fase normalizada de Spike-2 (Fig. 4A); la normalización del ciclo respiratorio se obtiene mediante la transformada de Hilbert, que describe la envolvente compleja de una señal modulada por una portadora real, su definición viene dada por:

$$\hat{s}(t) = H\{s\}(t) = (h * s)(t) = \frac{1}{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{s(\tau)}{t - \tau} d\tau.$$

La transformada de Hilbert convierte el periodo respiratorio $I_{(n)}-I_{(n+1)}$ en un ciclo entre $(0 - 2 \pi)$ definido por su fase en radianes, sobre el que se representa mediante un histograma de correlación cruzada los procesos puntuales correspondientes a la onda R de los latidos cardiacos sucesivos $R_{(n)}, R_{(n+1)}, \dots$ dentro del ciclo respiratorio. Como medida del grado de sincronización se ha utilizado la diferencia entre el pico de máxima probabilidad de la fase preferente de los intervalos respecto a la probabilidad media de los intervalos.

3.4.5. Diagrama de Poincaré de pares de intervalos sucesivos.

La dinámica cíclica de la serie de ocurrencias de los intervalos cardiacos se analizó mediante los diagramas de Poincaré de pares de intervalos sucesivos, en el que se representa en el eje de las abscisas los intervalos $RR_{(n)}$ y en el eje ordenadas los intervalos que le siguen $RR_{(n+1)}$.

3.4.6. Diagramas de fase-cofase.

En los diagramas de fase-cofase se representa el valor de fase o intervalo RI con su correspondiente valor de cofase o intervalo IR_{n+1} de primer orden y los siguientes ($IR_{n+2}, IR_{n+3}, \dots$). Estos diagramas permiten conocer cuáles son las relaciones temporales que se durante los enganches de fase entre el osciladores respiratorio y el oscilador cardiaco, y cómo es el efecto de “reseteo” del ciclo

Figura 4. Procedimientos experimentales (III). **A)** Sincronización de fase; (i) transformación de los periodos inter-eventos $I_{(n)}-I_{(n+1)}$ a ciclos respiratorios entre 0 y 2π , (ii) fases específicas (Φ) del ciclo respiratorio en la que ocurren los sucesivos latidos cardiacos o eventos $R_n, R_{n+1}, \dots$ y (iii) construcción del histograma de correlación cruzada. **B)** Diagramas fase-cofase; a partir de las relaciones temporales entre los procesos puntuales de los eventos R y del inicio de las inspiraciones, se define para cada ciclo cardiaco el valor de fase (Φ), el intervalo $R_{(n-1)}-I_{(n)}$ y los valores de la cofase o periodos $I_{(n)}-R_{(n)}, I_{(n)}-R_{(n+1)}, I_{(n)}-R_{(n+2)}$ ($\theta_1, \theta_2, \theta_3$) (i), y mediante las curvas fase-cofase se representa la fase en el eje de las abscisas y las cofases de orden n en el eje de ordenadas (ii).

cardiaco en función de la fase en que ocurre la respiración dentro del intervalo perturbado y en los siguientes intervalos (Fig. 4B).

3.4.7. Diagrama de transferencia de frecuencias.

La función de transferencia de las frecuencias respiratorias a la actividad cardiaca en hipoxia, hipercapnia e hipoxia-hipercapnia, se obtuvo representado en abscisas, la frecuencia respiratoria instantánea (FR_i) y en ordenadas, la frecuencia instantánea cardiaca (FC_i); junto a estos diagramas se representan los respectivos histogramas de los valores de FR_i y FC_i . En estos diagramas se han incluido los 4 min basales previos al inicio del estímulo y los 10 min de la respuesta al estímulo (Fig. 20A).

3.5. Equilibrio ácido-base y pH del líquido cefalorraquídeo.

La extracción de la muestra de sangre capilar (150 μ l) para gasometría se obtuvo bajo anestesia (2-4 % de isoflurano) del seno cavernoso retro-orbital de los ratones con un capilar heparinizado. Para la obtención de las muestras de orina, se coloca al ratón en una jaula metabólica, que permite separa la orina sin que se contaminación de heces, y tras un periodo de aclimatación se recolectaron las muestras de orina de 24 h. Las muestras de sangre y orina se analizaron en el Laboratorio de Urgencias del Servicio de Bioquímica del HRyC.

Para la medida del pH en el líquido cefalorraquídeo se siguió el siguiente protocolo. Se introduce a los ratones de M3 WT y Cx36KO en una cámara con 2-4 % de isoflurano y 100% O_2 , y una vez que se ha alcanzado un nivel profundo de analgesia/anestesia se colocan en un estereotáxico, donde se les mantiene con anestesiados con isoflurano al 1,5% y 100% O_2 a través de una cánula bucal y se monitoriza de forma continua la respiración y la frecuencia cardiaca y la temperatura corporal (36-37 °C). A continuación se hace un trepanó por el que se introduce la sonda de pH (120 μ m) previamente calibrada (pH óptica Micro, World Precision Instruments) hasta el ventrículo lateral (rostral -0,58 mm; lateral 1,25 mm; ventral 2 mm). Una vez que estabilizada la medida y se tomaron 20 min de registro del pH, se saca el electrodo y se vuelve a calibrar.

3.6. Análisis estadístico.

Para el análisis cuantitativo de los datos se calculó la media $\bar{x} \pm$ el error estándar (s.e.m) para cada grupo experimental. Las diferencias entre los grupos han

sido evaluadas mediante el test de Student, el test de Mann-Whitney, y el test de Bonferroni (ANOVA), dependiendo del cumplimiento de la hipótesis de normalidad de los datos. En el caso de las curvas de supervivencia de Kaplan–Meier el análisis estadístico se realizó con el test log-rank, Estos análisis estadístico se realizaron utilizando los programas Sigmaplot (Hearne Scientific Software) y MATLABv.2008 (Mathworks).

IV. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA RITMICIDAD RESPIRATORIA Y DEL ACOPLAMIENTO CARDIORRESPIRATORIO EN LOS RATONES DEFICIENTES EN CONEXINA-36.

4.1.1. Ritmicidad respiratoria y cardiaca.

Estos estudios de ritmicidad respiratoria y cardiaca se han realizado en ratones machos lactantes de 14 días (P14) y adultos jóvenes de 3 meses (M3) de edad, silvestres (WT, del inglés “wild-type”) y deficientes en Cx36 (Cx36KO), sin anestesia pero parcialmente inmovilizados por sus extremidades dentro de una cámara de intercambio gaseoso con un flujo constante de aire medicinal en condiciones de normoxia-normocapnia.

4.1.1.1. Ritmicidad respiratoria durante la lactancia.

Entre los ratones Cx36KO encontramos dos grupos de animales, un grupo mayoritario, que representa el 86 % (31/36), con un patrón respiratorio normal eupneico como el que muestran los ratones WT a esa edad (Fig. 5), y otro menos numeroso, que representa el 14 % (5/36), con un patrón respiratorio anormal tipo Cheyne-Stokes (Fig. 6).

El patrón respiratorio de tipo eupneico de los ratones Cx36KO se caracteriza por una frecuencia de oscilación más lenta en promedio que el de los ratones WT y más irregular, tal como se infiere de la más rápida disminución de la función de autocorrelación con los sucesivos ciclos respiratorios y del aumento del coeficiente de variación (Fig. 5, *B-i* y *C i-ii*; $n=30$, $p<0,05$). En este grupo de ratones Cx36KO, el ritmo cardiaco también está enlentecido pero es más regular que en los ratones WT (Fig. 5, *B-ii* y *C iii y iv*; $n=15$, $p<0,05$).

En el otro subgrupo de ratones Cx36KO con el patrón respiratorio tipo Cheyne-Stokes, la modulación de tipo creciente-decreciente de la amplitud ventilatoria se repite con una periodicidad de $\sim 0,18 \pm 0,01$ Hz (Fig. 6, *A-i*). En todos casos el incremento brusco de la amplitud respiratoria se inicia por una espiración forzada en fase con el final espiración pasiva (Fig. 6, *A ii y iii*); el aumento de la amplitud inspiratoria persiste en los sucesivos ciclos respiratorios hasta que cesan las espiraciones activas (Fig. 6, *A-ii, flechas*); estas espiraciones forzadas modulan ciclo-a-ciclo la amplitud ventilatoria y la duración del ciclo respiratorio en función de la fase del ciclo respiratorio en la que ocurren; primero, la fase se acorta en los ciclos sucesivos respecto al final de la espiración pasiva produciéndose un aumento

A **B** **C**

Figura 5. Patrón basal de ritmicidad respiratoria y cardíaca en los ratones silvestres (WT; azul) y deficientes en Cx36 (Cx36KO; rojo). Cambios madurativos de P14 a M3. A) Registros crudos de la respiración y ECG en P14 y M3. **B)** Rasters de los eventos del inicio de la inspiración (I) y de los latidos cardíacos (R) con sus correspondientes histogramas de autocorrelación en P14 (i y ii) y en M3 (iii y iv). **C)** Valores promedio de la frecuencia y de la variabilidad respiratoria (i y ii; $n=32$) y de la frecuencia y la variabilidad cardíaca (iii y iv; $n=20$). En los ratones P14 Cx36KO el ritmo respiratorio y el cardíaco son significativamente más lentos e irregulares, y a diferencia de los ratones WT, en los que se produce una reducción fisiológica de las frecuencias respiratoria y cardíaca con la edad, en los ratones Cx36KO se produce un aumento paradójico en ambos parámetros (* $p<0,05$).

Figura 6. Patrón respiratorio tipo Cheyne-Stokes en el 14% de los ratones P14 Cx36KO. A) Registros crudos mostrando la modulación creciente-decreciente de la amplitud ventilatoria alternando con periodos de hipopnea característicos de la respiración Cheyne-Stokes (i); el incremento de la amplitud va siempre precedido por una espiración activa (ii, flechas), que en promedio tiende a ocurrir al final de la fase espiratoria (iii). B-D) Efecto del alto CO_2 (12% del aire inhalado) sobre el patrón respiratorio en los ratones WT (azul) y Cx36KO (rojo) (B, i-iii), en los histogramas de intervalos de la respiración (I-I+1) (C, i-iii) y en los histogramas de la amplitud ventilatoria (D, i-iii) antes, durante y después de la hipercapnia; en los ratones WT, el alto CO_2 regulariza el ritmo respiratorio e incrementa la amplitud ventilatoria, y en los ratones Cx36KO además desaparece el patrón de respiración Cheyne-Stokes.

progresivo de la amplitud ventilatoria y posteriormente, la fase se va alargando progresivamente hasta coincidir con la fase inspiratoria provocando entonces un mayor retardo del siguiente ciclo respiratorio y la reducción progresiva de la amplitud inspiratoria. La respiración patológica de tipo Cheyne-Stokes se ha atribuido a una hipersensibilidad del centro respiratorio al CO_2 que se revierte incrementando la concentración de CO_2 en el aire inhalado (Lange y Hecht, 1962; Leung *et al.*, 2003). En nuestro modelo animal el patrón de respiración Cheyne-Stokes también desapareció incrementando el contenido de CO_2 en el aire inhalado al 12% y reaparece cuando se retira el exceso de CO_2 (Fig. 6, *B i-iii*), sugiriendo que la modulación en amplitud es debida a la variación cíclica de los niveles de CO_2 ; en presencia de alto CO_2 la ritmicidad de la respiración mejora sustancialmente y la distribución de la amplitudes respiratorias, que era bimodal durante el Cheyne-Stokes por la alternancia de ventilaciones superficiales y profundas, pasa a ser unimodal ya que solo contiene las respiraciones de mayor amplitud (Fig. 6, *C y D, i-iii; fechas*); en alto CO_2 los parámetros respiratorios de los ratones Cx36KO son muy similares a los que se observan en los ratones WT.

4.1.1.2. Cambios madurativos de la ritmicidad respiratoria y cardiaca durante el desarrollo postnatal.

En los ratones silvestres desde el periodo de lactancia (P14) a la edad adulta (M3) se produce un enlentecimiento fisiológico del ritmo respiratorio del ~10% con un incremento marcado en de la variabilidad respiratoria (Fig. 5, *C i-ii*); la frecuencia media cardiaca también se redujo de P14 a M3 en un ~4% y la variabilidad del ritmo cardiaco disminuyo ligeramente (Fig. 5, *C iii-iv*). Por el contrario, en los ratones Cx36KO de P14 a M3 se produjo un aumento paradójico de la frecuencia respiratoria durante el desarrollo postnatal del ~11%, sin cambios significativos en la variabilidad respiratoria (Fig. 5, *C i-ii*); la frecuencia media cardiaca también aumento en la misma proporción y la variabilidad del ritmo cardiaco solo se incrementó ligeramente (Fig. 5, *C iii-iv*). Los parámetros de ritmicidad respiratoria y cardiaca de los ratones Cx36-KO en P14 son similares a los de los ratones silvestres en la edad adulta, sugiriendo que los cambios madurativos que ocurren de forma fisiológica desde la vida postnatal a la edad adulta en los ratones silvestres podrían estar relacionados con la reducción en la expresión de la Cx36 que tiene lugar de P14 a M3.

4.1.1.3. Mecanismos de acoplamiento cardiorrespiratorio.

La coordinación entre los sistemas respiratorio y cardiaco tiene lugar mediante distintos mecanismos de acoplamiento cardiorrespiratorio: la arritmia sinusal respiratoria (RSA) y la sincronización de fase cardiorrespiratoria (CRPS), que permitían ajustar la ventilación respiratoria a la perfusión vascular con la finalidad de optimizar el intercambio gaseoso.

4.1.1.3.1. Arritmia sinusal respiratoria (RSA).

La frecuencia instantánea de los sucesivos latidos cardiacos en los ratones P14 WT muestra una significativa modulación durante el ciclo respiratorio o RSA, que contrasta con la escasa modulación que se observa en los ratones Cx36KO (Fig. 7, A *i-ii*); la frecuencia cardiaca aumenta durante la fase inspiratoria y disminuye durante la fase espiratoria. Los promedios de la RSA y de la oximetría pulso-a-pulso respecto al inicio del ciclo respiratorio, definido como el principio de la fase inspiratoria (I), muestran que la amplitud de la oximetría varía en función de la RSA (Fig. 7, B *i-iii*); el pulso cardiaco que origina la onda de oximetría de mayor amplitud, asumiendo que entre la circulación pulmonar y la circulación sistémica en donde se mide la oximetría existe un ciclo de retraso, es que se produce durante la fase inspiratoria, y se corresponde con el que sigue al intervalo cardiaco más largo (Fig. 7, B *iii-iv*), sugiriendo que el mecanismo de RSA podría contribuir a mejorar el intercambio gaseoso a nivel pulmonar haciendo coincidir el pulso con mayor volumen de eyección con la inspiración. Por el contrario, en el caso de los ratones Cx36KO, que tienen reducida la RSA, las amplitudes de las sucesivas oximetrías del pulso están enganchadas en fase con el ciclo respiratorio (Fig. 7, C *i-iv*; ver a continuación 4.1.1.3.2.).

4.1.1.3.2. Sincronización de fase cardiorrespiratoria (CPRS).

En las condiciones basales de normoxia-normocapnia, la frecuencia del oscilador cardiaco (*i.e.*, el nodo sinusal) en los ratones silvestres P14 es significativamente mayor que la del oscilador respiratorio estableciéndose entre ellos una relación que varía durante los 10 min de registro entre 2 y 3 latidos (*n*) por ciclo respiratorio (*m*), mientras que en los ratones lactantes Cx36KO, en los que comparativamente la frecuencia del oscilador respiratorio y la del oscilador cardiaco están enlentecidas en una proporción similar, las relaciones que se establecieron vario entre 2 y 4 latidos (Fig. 8, A *i-ii*); sin embargo, en ambos casos el orden de enganche preferente fue 1:3 (*m:n*) durante el 60,94% en WT y 72,03% del tiempo

A

B

C

Figura 7. Arritmia sinusal respiratoria en los ratones P14 WT (azul) y Cx36KO (rojo) en condiciones basales de normoxia-normocapnia. A) Registros crudos de la respiración, ECG, frecuencia cardíaca instantánea y oximetría pulso-a-pulso. **B y C)** Promedios de la forma de onda de la ventilación, de la frecuencia cardíaca instantánea y de la oximetría pulso-a-pulso respecto al inicio de la inspiración en los ratones WT (**B, i-iii**) y en los Cx36KO (**C, i-iii**), y promedio de forma de onda de la oximetría pulsátil respecto a la onda R del complejo QRS (WT en **B-iv** WT y Cx36KO en **C-iv**); la RSA está significativamente reducida en los ratones Cx36KO; la oximetría de los pulsos sucesivos está modulada por la RSA en los ratones WT y en los ratones Cx36KO por la CPRS.

A **B**

Figura 8. Sincronización de fase cardiorrespiratoria (CRPS) en los ratones P14 WT (azul) y Cx36KO (rojo) en condiciones basales de normoxia-normocapnia. A) Registros crudos de la ventilación, el ECG, la FC_i y la fase (Φ) (rojo), y cofase (Θ) (azul). **B)** Rasters e histogramas de fase de los R (n) dentro del ciclo respiratorio I_{n-1} a I_{n+1} (m , izda) y de las I dentro del ciclo cardiaco R_n a R_{n+1} ($dcha$) en los ratones WT y Cx36KO (*i* y *ii*). En ambos ratones el orden de enganche preferente (m/n) es 1:3, pero el grado de CRPS es mayor en los ratones Cx36KO.

en Cx36KO, mientras que el porcentaje de los enganches 1:2 fue de solo el 39,05% en los ratones WT y del 18,05% en los Cx36KO, en estos ratones también se observa un número reducido de enganches 1:4 (Fig. 9, A). Mediante el análisis de sincronización de fase se cuantificó el grado de enganche de fase entre los osciladores respiratorio y cardiaco; se determinó tanto la fase del ciclo respiratorio, definido entre el inicio de dos inspiraciones sucesivas ($I_n - I_{n+1}$), en donde ocurren los latidos cardiacos (R), como la fase del ciclo respiratorio ($R_n - R_{n+1}$) en donde ocurren los inicios de las inspiraciones. En los ratones Cx36KO, la sincronización de fase de los latidos cardiacos con la respiración y viceversa es significativamente mayor que en los ratones WT (Fig. 8, B i-ii). Como este tipo de procesamiento separa los distintos órdenes de enganche que se producen, se calcularon para cada orden de enganche los valores de los intervalos RI o la fase del ciclo cardiaco en el que ocurren los inicios de las inspiraciones, y sus correspondientes los valores de las cofases o intervalos IR_s ($IR_n, IR_{n+1}, \dots$) hasta la generación de los sucesivos latidos cardiacos que ocurren dentro del mismo ciclo respiratorio. En el caso de ratones WT durante los enganches 1:3, el valor de fase preferente es largo y el de la cofase preferente al siguiente latido corto y para los enganches 1:2, la fase preferente es corta y la cofase larga (Fig. 9, B i-ii). Las curvas de fase-cofase permiten determinar el efecto de la respiración sobre la duración del ciclo cardiaco en el que ocurre el inicio de la respiración (i.e., el intervalo perturbado, RR_n) y sobre los siguientes, $RR_{n+1}, RR_{n+2}, \dots$. En el caso del enganche 1:3, la duración del intervalo cardiaco perturbado es más corta que el que le sigue ($RR_n < RR_{n+1}$) y el siguiente es más corto y similar al perturbado ($RR_{n+1} < RR_{n+2}$; siendo $RR_n \sim RR_{n+2}$) (Fig. 9, D-i); durante los enganches 1:2, el intervalo perturbado es solo ligeramente más corto que el siguiente, pero comparativamente con el enganche 1:3 el intervalo perturbado en el enganche 1:2 es más largo y el que le sigue algo más corto, indicando que las respiraciones que ocurren en una fase corta del ciclo cardiaco alargan el intervalo perturbado y el siguiente y que las que ocurren en fases largas alargan la duración del intervalo que sigue al perturbado. En los ratones Cx36KO se establecen también distintas relaciones preferentes de fase-cofase durante los distintos órdenes de enganches, pero la función de “reseteo” de la fase del ciclo cardiaco es significativamente menor. Durante el enganche 1:4, 1:3 y 1:2 las fases son preferentemente largas, intermedias y cortas, respectivamente (Fig. 9, C i-iii); con las fases más largas durante los enganches 1:4 se produce un ligero alargamiento de los dos intervalos que siguen al perturbado, los RR_{n+1} y RR_{n+2} , y se acorta el

Figura 9. Enganches de fase en los ratones P14 WT (azul) y Cx36KO (rojo) en condiciones basales de normoxia-normocapnia. **A**) Porcentaje de tiempo en cada orden de enganche. **B** y **C**) Diagramas de fase-cofasas (para cada orden de enganche con sus correspondientes distribuciones de fase y de cofases (WT en **B** y Cx36KO. en **C**)). **D**) Graficas de las duraciones de los intervalos perturbados (RR_n) y los siguientes ($RR_{n+1}, \dots$) durante los distintos órdenes de enganches en los ratones WT (*i*) y Cx36KO (*ii*). El orden de enganche más estable en ambos ratones es 1:3; cada orden de enganche se produce en unos valores de fase y cofase preferentes, este valor de la fase determina el efecto de alargamiento sobre el ciclo cardiaco del intervalo perturbado o de los siguientes, que es significativamente menor en los ratones Cx36KO.

Figura 10. Cambios en los mecanismos de acoplamiento cardiorrespiratorio en normoxia-normocapnia en los ratones WT (azul) y Cx36KO (rojo) de P14 a M3. **A)** Ejemplo representativo de la mayor arritmia respiratoria sinusal (RSA) en los ratones WT (azul) y de la mayor sincronización de fase cardiorrespiratoria (CPRS) en los ratones Cx36KO (rojo) en P14. **B y C)** Valores promedio de la RSA y de la CPRS (en B y C) en función del genotipo y la edad; de P14 a M3 la RSA aumenta significativamente en los Cx36KO, mientras la CPRS no cambia durante el desarrollo postnatal en ninguno de los genotipos ($n=20$; * $p<0,05$).

RR_{n+3} , que es similar al RR_n , mientras que con las fases intermedias y cortas en las que se producen los enganches 1:3 y 1:2, el intervalo de mayor duración es el perturbado RR_n (Fig. 9, *D-ii*); estos cambios en la duración de los intervalos cardiacos son de menor magnitud que los que ocurren para los mismos valores de fase durante los enganches de los ratones silvestres.

En resumen, en los ratones P14 silvestres el principal mecanismo de acoplamiento cardiorrespiratorio es la RSA y en menor medida la CRPS, por el contrario en los ratones Cx36KO la RSA está muy disminuida mientras que la CRPS está significativamente aumentada (Fig. 10A, *i* y *ii*). Durante maduración postnatal, de P14 a M3, la RSA en los ratones silvestres aumenta ligeramente y la CRPS no cambia. En el caso de los ratones Cx36KO, la RSA aumenta significativamente en la edad adulta, mientras que la CRPS se reduce, llegando ambas a igualarse con las de los ratones silvestres (Fig. 10, *B* y *C*).

4.1.2. Modulación de la ritmicidad respiratoria durante el sueño en los ratones deficientes en conexina-36.

La función cardiorrespiratoria varía de forma importante en función de los estados de vigilia y de sueño NREM y REM (Kubin *et al.*, 2017; Burke *et al.*, 2015). Para determinar el papel que desempeña la Cx36 en el control central de la respiración durante el sueño, se compararon los cambios en la frecuencia y la amplitud respiratoria y en la ritmicidad cardiaca que tienen lugar durante de las épocas de vigilia y de sueño NREM y REM en los ratones machos silvestres y Cx36KO adultos jóvenes de 3 meses de edad (M3). Estos ratones habían sido previamente implantados con los correspondientes dispositivos para monitorizar simultáneamente durante 24 h los movimientos respiratorios, la actividad de EEG en corteza e hipocampo y el EMG en la musculatura de la nuca. Estos registros fueron “estadiados” para definir las épocas de vigilia y sueño REM y NREM y se construyen los correspondientes hipnogramas (Fig. 11A).

4.1.2.1. Caracterización del ciclo vigilia-sueño en los ratones deficientes en la Cx36.

La simple inspección de los hipnogramas de los ratones silvestres revela un patrón de modulación circadiana del ciclo vigilia-sueño, con un predominio de los épocas de vigilia durante la fase de oscuridad (*i.e.*, la fase activa en los ratones) y de las épocas de sueño NREM y REM durante fase de luz. Sin embargo, en los ratones Cx36KO la arquitectura del sueño está completamente desestructurada.

Figura 11. Arquitectura del sueño durante el ciclo luz/oscuridad de los ratones adultos Cx36KO (rojo) vs. WT (azul). **A** y **B**) hipnogramas con sus correspondientes episodios de vigilia, NREM y REM y los espectrogramas de tiempo continuo de la actividad EEG cortical (TF) (WT en *i* y Cx36KO en *ii*). **B**) Porcentaje total y duración media de las épocas en 24 h (*i* y *ii*), porcentaje total y duración media de las épocas durante las fases de luz y oscuridad (*iii* y *iv*). En comparación con los ratones WT, los ratones Cx36KO muestran una completa fragmentación del sueño y de su modulación circadiana durante el ciclo L/O, sin cambios en la duración total de las épocas ($n=8$, * $p < 0.05$).

Esta alteración del sueño en los ratones Cx36KO no había sido previamente descrita, y en consecuencia se procedió a su caracterización en mayor detalle. El análisis cuantitativo que se realizó reveló que aunque la duración total de las épocas de vigilia, NREM y REM durante las 24 h de registro fue similar en ambos genotipos, del 38%, 54% y 8% respectivamente (Fig. 11, *B-i*), la duración media de las épocas, tanto de vigilia como de sueño NREM y REM, fueron significativamente más breves en los ratones Cx36KO (Fig. 11, *B-ii*), indicando un importante fraccionamiento de los ciclos vigilia-sueño. El patrón circadiano durante el ciclo de luz-oscuridad (12 h/12 h L/O) también está alterado; mientras que en los ratones WT el porcentaje total y duración media de las épocas de vigilia son mayores en los periodos activos de oscuridad que de luz, y las de las épocas de sueño NREM son mayores en la fase de luz que en oscuridad, en los ratones Cx36KO el porcentaje total y la duración media en vigilia y en sueño NREM no varían entre luz y oscuridad (Fig. 11, *B iii-iv*), indicando que el ciclo de vigilia-sueño en estos ratones no está modulado por el ritmo circadiano.

Para caracterizar la compleja dinámica de las transiciones entre las épocas de vigilia, NREM y REM que ocurren durante los ciclos de vigilia-sueño y de NREM-REM, se utilizaron las cadenas de Markov (Kemp y Kamphuisen, 1986); este tipo de procesamiento proporciona la probabilidad (P) de permanecer en un estado (i.e., la estabilidad del estado) y la probabilidad de las transiciones entre los distintos estados (i.e., la frecuencia con la que se cambia de un estado a otro) en el intervalo de tiempo elegido (10 s) (Tabla 2). El orden de la probabilidad de permanencia en cada estado fue similar en ambos genotipos el mismo: $P_{\text{vigilia}} > P_{\text{NREM}} > P_{\text{REM}}$; sin embargo, en el caso de los ratones Cx36KO la probabilidad de permanecer en cada uno de estos tres estados está significativamente reducida respecto a la de los ratones controles. Además, este tipo de análisis muestra que la probabilidad permanecer en vigilia en los ratones Cx36KO no se reduce como en los ratones silvestres durante la fase de luz (Fig. 12). En cuanto a las transiciones entre estados, la secuencia de probabilidad en los ratones WT fue el siguiente: $P_{\text{REM} \rightarrow \text{NREM}} > P_{\text{NREM} \rightarrow \text{REM}} \approx P_{\text{vigilia} \rightarrow \text{NREM}} \approx P_{\text{REM} \rightarrow \text{vigilia}} > P_{\text{NREM} \rightarrow \text{vigilia}}$, con una disminución significativa de la transición $P_{\text{vigilia} \rightarrow \text{NREM}}$ en la fase de oscuridad respecto a la de luz (Tabla 2 y Fig.12). En los ratones Cx36KO la secuencia de las probabilidades varía: $P_{\text{REM} \rightarrow \text{NREM}} > P_{\text{REM} \rightarrow \text{vigilia}} > P_{\text{NREM} \rightarrow \text{REM}} \approx P_{\text{vigilia} \rightarrow \text{NREM}} > P_{\text{NREM} \rightarrow \text{vigilia}}$, debido al incremento de las transiciones de $\text{vigilia} \rightarrow \text{NREM}$, que en este caso no se modulan por el ciclo

t- student $p < 0.01$ (**) and $p < 0.05$ (*)

A

● Cx36 $+/+$
● Cx36 $-/-$

B

Luz
←
→
Oscuridad

The diagram illustrates the role of Cx36 in sleep-wake regulation. It is divided into two panels, A and B, representing different genotypes: Cx36 $+/+$ (blue) and Cx36 $-/-$ (red). The states shown are Vigilia (Wake), REM (Rapid Eye Movement), and NREM (Non-Rapid Eye Movement). Transitions between these states are indicated by arrows. In Panel A (Cx36 $+/+$), the transitions are marked with asterisks (* or **), indicating significant differences. In Panel B (Cx36 $-/-$), the transitions are also marked with asterisks, and a legend indicates that the diagram is influenced by 'Luz' (Light) and 'Oscuridad' (Darkness). The diagram shows that Cx36 $-/-$ mice exhibit altered sleep-wake patterns compared to Cx36 $+/+$ mice, particularly in the REM and NREM states.

46

luz-oscuridad, y de la frecuencia de las transiciones de REM $\rightarrow$ vigilia (*i.e.*, “arousals”).

4.1.2.2. Modulación de la ritmicidad respiratoria en función del estado de vigilia, sueño NREM y sueño REM.

En las transiciones de vigilia a sueño NREM, que se definen por el aumento en la potencia delta y sigma en el EEG de la corteza y la disminución de la actividad muscular en el EMG en la musculatura de la nuca, la única diferencia significativa observada entre los ratones Cx36KO respecto a los controles fue una menor potencia en la banda delta durante la vigilia (Fig. 13, A *i-iv*; $p < 0,05$). En vigilia tranquila, los ratones Cx36KO respiran con una significativa mayor frecuencia respiratoria y profundidad ventilatoria y la frecuencia cardiaca es más rápida; durante las transiciones vigilia $\rightarrow$ NREM en ambos tipos de ratones se produce una importante reducción de la frecuencia respiratoria, de la amplitud de la ventilación pulmonar y de la frecuencia cardiaca, pero en el caso los ratones Cx36KO el enlentecimiento del ritmo respiratorio en los ratones Cx36KO es significativamente mayor (Fig. 13, A *v-vii*). El enlentecimiento del ritmo respiratorio en sueño NREM se acompaña tanto en los ratones controles como en los Cx36KO de un incremento muy significativo de su regularidad (Fig. 13, D-*i*); la menor ritmicidad que se observa en los ratones Cx36KO en vigilia respecto a los silvestres desaparece en sueño NREM.

En las transiciones de sueño NREM a REM que vienen definidas en los espectros por el aumento brusco en la potencia en la banda theta del hipocampo y la reducción de las potencias delta y sigma de la corteza, se observa en los ratones Cx36 una reducción significativa en el theta hipocampo y en sigma cortical en NREM respecto a los ratones WT (Fig. 13, B *i-iii*); en las transiciones en la dirección opuesta (*i.e.*, REM $\rightarrow$ NREM) los cambios de potencia en las respectivas bandas de frecuencia son los inversos pero más rápidos y se aprecia mejor la reducción del tono muscular que ocurre durante el sueño REM respecto a NREM (Fig. 13, C *i-iv*). Durante las transiciones de NREM $\rightarrow$ REM, la frecuencia respiratoria se acelera bruscamente, aumenta de forma significativa la variabilidad del ritmo respiratorio y disminuye la amplitud ventilatoria; comparativamente en los ratones Cx36KO se produce un mayor incremento de la frecuencia respiratoria en valores relativos al final del REM (*i.e.*, en las transiciones REM-NREM) (Fig. 13, C-*iv*) y de la irregularidad del ritmo durante los periodos REM (Fig. 13, D-*ii*).

Figura 13. Modulación de la respiración durante los estadios de vigilia y sueño NREM y REM en los ratones adultos Cx36KO (rojo) vs. WT (azul). **A-C** Transiciones entre vigilia→NREM, NREM→REM y REM→NREM (en A, B y C). Durante las que se muestran los cambios en los promedios de los espectros de potencia de la banda theta en hipocampo (4-10 Hz; *i*), de la banda delta en corteza (1-4 Hz, *ii*) y de la banda sigma en corteza (11-15 Hz; *iii*), de la actividad EMG (*iv*), de la frecuencia respiratoria (FR; *v*), de la amplitud ventilatoria (AR; *vi*) y de la frecuencia cardíaca (FC; *vii*). **D** Valores medios y variabilidad de la FR en los distintos estadios de sueño (*i* y *ii*). La FR, la AR y la FC en los ratones Cx36KO adultos, que están aumentadas en vigilia, se reducen más en NREM que en los ratones WT; las transiciones NREM→REM y REM→NREM muestran una mayor reducción de la AR y un aumento de la FR y de su variabilidad en sueño REM, que son significativamente mayores en el caso de los ratones Cx36KO ($n=8$; $* p < 0.05$).

Los cambios en el patrón respiratorio que se obtuvieron en los promedios de las transiciones de sueño NREM y REM se analizaron en mayor detalle mediante las gráficas de tiempo-frecuencia (Fig. 14A). Durante los episodios NREM se observa una alta regularidad del ritmo respiratorio, tanto en los ratones WT como Cx36KO, pero con un valor de frecuencia respiratoria significativamente menor en el caso de los ratones Cx36KO (Fig. 14A, *a* en *i* y *ii*). Cuando se produce la transición de sueño NREM a REM, la actividad cortical se desincroniza, aumenta la actividad theta en hipocampo y la respiración comienza a volverse progresivamente más irregular (Fig. 14A, *b* y *b'* en *i*); en caso de los ratones Cx36KO este aumento de la variabilidad respiratoria es significativamente más marcado llegando a provocar episodios de apnea por una completa arritmia respiratoria y una dramática reducción de la amplitud ventilatoria (Fig. 14A, *b* y *b'* en *ii*). A diferencia del ejemplo que se muestra de un ratón WT en el que el episodio REM se sigue de otro NREM, en los ratones Cx36KO fue frecuente observar que los episodios REM con apneas repetidas se siguen en muchos casos de transiciones a vigilia (*i.e.*, “arousals”) antes de retornar a sueño NREM, que es consistente con el incremento de las transiciones REM → vigilia previamente descrito en estos ratones (Tabla 2).

Para el análisis cuantitativo del número de apneas durante las épocas NREM y REM en los registros de 24 h se definió como apnea el cese de la actividad respiratoria eficaz durante más de 1,5 s, que equivale a la falta de entre 4-6 ciclos respiratorios consecutivos. Dicho análisis mostró que durante el sueño NREM el número total y la tasa de apneas por hora fue similar y dentro del rango fisiológico en los ratones WT y Cx36KO (Fig. 14, *B i-ii*). Durante el sueño REM en los ratones controles el número total de apneas fue similar al de NREM, pero la tasa de apneas/h disminuye respecto a las que se producen en NREM dada la menor duración total del sueño REM respecto al NREM (Fig. 11, *B-i*); por el contrario, en los ratones deficientes en la Cx36 el número total y la tasa de apneas/h en REM están anormalmente elevadas en algo más del doble (Fig. 14, *B i-ii*).

En resumen, los resultados muestran en los ratones Cx36KO una marcada fragmentación de la arquitectura del ciclo vigilia-sueño sin modulación circadiana durante del ciclo luz-oscuridad. Respecto la modulación de la respiración en función del estado conductual, los ratones Cx36KO muestran un ritmo respiratorio más rápido en vigilia, más lento en sueño NREM, y más arrítmico y con la presencia de frecuentes apneas en REM asociadas a un mayor número de despertares.

B

Figura 14. Alteraciones respiratorias y apneas durante el sueño REM en los ratones adultos Cx36KO (rojo) vs. WT (azul). **A)** Espectrogramas de tiempo de la respiración y de la actividad EEG del hipocampo y de la corteza (WT en *i* y Cx36KO en *ii*). **B)** Número total y por hora de apneas durante sueño NREM y REM (*i* y *ii*). En ambos genotipos, la respiración es muy regular durante el sueño NREM y se irregulariza progresivamente a medida que avanza el sueño REM; en comparación, el incremento de la variabilidad del ritmo y de la amplitud ventilatoria es significativamente mayor en los ratones Cx36KO (*A*, *b* y *b'* en *i* y *ii*), y el número de apneas en REM en estos ratones duplica al observado en los ratones WT (*A*-*ii*, *A* en *b'* y *B* *i*-*ii*) ($n=8$; * $p < 0.01$).

4.1.3. Regulación del equilibrio ácido-base en los ratones adultos deficientes en cx36.

A continuación se valoró la repercusión en el control homeostático del O₂ y CO₂ y en el equilibrio ácido-base de las alteraciones respiratorias observadas en los ratones adultos jóvenes (M3) deficientes en Cx36.

4.1.3.1. Presión transcutánea de CO₂ y saturación de oxígeno arterial.

La medición de la presión parcial de CO₂ transcutánea (P_{tc}CO₂) en condiciones de vigilia tranquila reveló unos niveles significativamente elevados en los ratones Cx36KO respecto a los ratones controles (53,85 ± 0,60 vs. 46,53 ± 2,64 mmHg, $p < 0,05$; $n = 5$). Los valores de saturación de O₂ arterial medidos por oximetría de pulso no muestran diferencias significativas en función del genotipo.

4.1.3.2. pH del líquido cefalorraquídeo.

La medición del pH en el líquido cefalorraquídeo se realizó introduciendo con esterotaxia el microelectrodo de pH en el tercer ventrículo de ratones adultos anestesiados de 3 meses. El valor promedio del pH en los ratones silvestres controles fue de 7,12 ± 0,07 y en los ratones Cx36KO significativamente más ácido, de 6,85 ± 0,08 ($n = 5$; $p < 0,01$).

4.1.3.3. Gasometría sanguínea y analítica de orina.

La gasometría se realizó a partir de muestras de sangre capilar colectadas de la región retrorbital bajo anestesia, y las muestras de orina de 24 h se recogieron colocando a los ratones en jaulas metabólicas. En los parámetros de la gasometría de la Tabla 3, no se incluyen los valores de pH, presión parcial de O₂ (PO₂), saturación de oxígeno (SatO₂), ni de la presión parcial de dióxido de carbono (PCO₂) por considerarse que dichos valores estaban artefactuados al haber utilizado anestesia para la extracción de las muestras.

En comparación con los ratones silvestres, la analítica sanguínea los ratones Cx36KO mostraron unos valores significativamente elevados del bicarbonato plasmático (HCO₃⁻), del bicarbonato estándar (SBC), del CO₂ total transportado (T_pCO₂) y un menor exceso de bases (Beb y Beecf), y la orina unos niveles normales de creatinina y urea con una excreción elevada de hidrogeniones (H⁺), de amonio (NH₄⁺) y de calcio (Ca²⁺), con un hiato aniónico reducido y una excreción de proteínas también reducida (Tabla 3).

Tabla 3. Listado de los parámetros utilizados para valorar la homeostasis respiratoria y el equilibrio ácido-base en los ratones machos WT y Cx36KO adultos jóvenes de tres meses de edad.

Variable	n	WT	Cx36 KO	p
P _{tc} CO ₂ (mmHg)	5	46,53±2,64	53,85±0,60	0,002 ↑
Sat O ₂ (%)	5	97,88±0,43	98,02±0,70	
pH (Líquido cefalorraquídeo)	5	7,12±0,07	6,85±0,08	0,010 ↓
Gasometría Arterial				
HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	6	21,36±0,54	25,76±0,829	0,002 ↑
TpCO ₂ (mmol/L)	6	23,06±0,627	27,54±0,83	0,003 ↑
Beb (mmol/L)	6	-7,20±0,25	-2,50±0,93	0,008 ↑
Beecf (mmol/L)	6	-6,78±0,38	1,48±1,03	0,001 ↑
SBC (mmol/L)	6	18,32±0,28	21,86±0,82	0,003 ↑
Analítica Orina				
pH	20	6,03±0,07	5,75±0,11	0,039 ↓
Proteína (mg/dL)	20	345,87±42,97	220,61±30,56	0,016 ↓
Creatinina (mmol/L)	20	3,48±0,39	3,50±0,39	
Urea (mmol/L)	20	404,43±66,49	354,08±48,31	
Amonio (mmol/L)	20	24,09±2,86	36,34±4,61	0,031 ↑
Ca ²⁺ (mg/dL)	20	39,5±2,16	6,45±3,52	0,008 ↓
Hiato anionico (mmol/L)	20	144,06±12,34	113,76±9,43	0,035 ↓

t- student p <0.01 (**) and p <0.05 (*)

En resumen, los ratones Cx36KO adultos jóvenes tienen una acidosis tisular, una hipercapnia con un aumento del bicarbonato sanguíneo y una disminución relativa del exceso de bases, indicativo todo ello de una acidosis respiratoria. A su vez, la analítica de la orina es consistente con una compensación renal de una acidosis respiratoria crónica. Sin embargo, la saturación de O₂ está dentro de los límites de la normalidad, probablemente como resultado de la presencia de una ligera policitemia y un hematocrito significativamente elevado ($44,00 \pm 0,8$ vs. $41,25 \pm 2,2$ %; $n=6$, $p<0,05$).

4.2. ESTUDIO DE LOS QUIMIORREFLEJOS CARDIORRESPIRATORIOS A LA HIPOXIA Y LA HIPERCAPNIA EN LOS RATONES DEFICIENTES EN Cx36 DURANTE LA LACTANCIA Y EN LA EDAD ADULTA.

El centro respiratorio del tronco del encéfalo, además de generar la actividad marcapasos que confiere el automatismo a la respiración, se encarga de sensar los niveles de CO_2/pH y O_2 y en función de ello modificar la frecuencia y la amplitud del patrón motor respiratorio para variar la tasa ventilatoria y mantener los niveles de O_2 y CO_2/pH sanguíneos. Dichos quimiorreflejos cardiorrespiratorios en respuesta a estímulos de hipoxia (en normocapnia) y de hipercapnia (en normoxia) en el aire inspirado se exploraron en los ratones machos lactantes (P14) y adultos jóvenes (M3) silvestres y deficientes en Cx36.

4.2.1. Quimiorreflejos a la hipoxia.

4.2.1.1. Respuesta cardiorrespiratoria a la hipoxia en los ratones lactantes.

La respuesta respiratoria de los ratones P14 silvestres que se sometieron a una reducción de la concentración de O_2 en el aire inspirado del 21% al 8% (*i.e.*, una hipoxia severa) es de tipo fásico; primero, se produce un aumento transitorio de la frecuencia respiratoria al inicio del protocolo seguido de una adaptación completa hasta valores próximos e incluso inferiores a los basales (Fig. 15, *A-i flechas a y b*). La amplitud de la respiración que inicialmente también aumenta ligeramente, se reduce progresivamente en paralelo al proceso de adaptación de la frecuencia respiratoria (Fig. 15, *A-iii*). Al finalizar el estímulo de la hipoxia y respirar los ratones el aire medicinal (21% O_2) se produce una depresión respiratoria transitoria por reoxigenación, caracterizada por una reducción transitoria de la frecuencia y de la amplitud respiratoria seguida de una recuperación lenta hasta alcanzar los valores basales (Fig. 15, *A i y iii flechas c*). La variabilidad de la amplitud y frecuencia respiratoria respecto al valor basal aumenta al inicio de la respuesta a la hipoxia y durante la depresión post-hipoxia (Fig. 15, *A ii y iv*). Por el contrario, la respuesta a la hipoxia de los ratones Cx36KO de la misma edad es de tipo fásico-tónica con una significativa menor adaptación de la frecuencia respiratoria durante el estímulo, y una menor depresión por reoxigenación (Fig. 15, *A i-iv*).

Durante el reflejo a la hipoxia al 8%, la frecuencia cardíaca en los ratones controles primero aumenta de forma transitoria, y luego se va enlenteciendo progresivamente (Fig. 15, *A-v flechas a y b*); al finalizar el estímulo, durante la

Figura 15. Qumiorreflejos cardiorrespiratorios a la hipoxia en los ratones P14 y M3 WT (azul) y Cx36KO (rojo). **A** y **B**) Promedio de la frecuencia respiratoria (FR) y de su variabilidad (ΔVFR) (i y ii), de la amplitud respiratoria normalizada (ΔAR) y de su variabilidad (ΔVA) (iii y iv), de la frecuencias cardiaca (FC) y su variabilidad (ΔVFC) (v y vi) de la distensibilidad vascular (DV; vii), de la saturación arterial de oxígeno (Sat_aO_2 ; viii), y de la presión trascutánea de CO_2 ($P_{tc}CO_2$) (P14 en A y M3 en B). **C**) Valores promedio normalizados de la FR (ΔFR ; i), de la ΔAR (ii), de la FC y su variabilidad (ΔFC ; iii y iv) correspondientes a la respuesta de valor de estado a la hipoxia (3 últimos min). Los ratones P14 Cx36KO responden a la hipoxia con un incremento fásico-tónico de la frecuencia respiratoria que contrasta con el patrón fásico seguido una adaptación completa de los ratones WT (flechas a y b en i); la respuesta cardiaca a la hipoxia también es bifásica, primero aumenta transitoriamente y luego se reduce progresivamente (flechas a y b en v) mientras que la DV se reduce, comparativamente el efecto bradicárdico es significativamente menor y la disminución de la DV es algo mayor en los ratones Cx36KO; durante la hipoxia se produce una caída brusca de la disminuye la $P_{tc}CO_2$ y se reduce la $P_{tc}CO_2$. Los ratones Cx36KO responden menos a la reoxigenación (flecha c en i y v) ($n=25$; $*p<0,05$). En la edad adulta, ambos genotipos responden a la hipoxia con un incremento de la FR fásico-tónico, y una menor bradicardia con una respuesta cardiorrespiratoria a la reoxigenación atenuada, que son significativamente menores en los ratones Cx36KO ($n=21$, $*p<0,05$).

depresión por reoxigenación, se produce una reducción adicional de la frecuencia cardiaca antes de retornar lentamente a sus valores basales (Fig. 15, A-v *flecha c*). Los cambios en la frecuencia cardiaca en los ratones Cx36KO siguen el mismo patrón, tanto durante el estímulo hipóxico como durante la depresión post-hipoxia, pero el enlentecimiento de la frecuencia cardiaca es significativamente menor (Fig. 15, A-v). Los valores promedios de las respuestas respiratoria y cardiaca normalizados respecto a sus valores basales, correspondientes a los últimos 3 minutos de la respuesta, también muestran que en los ratones Cx36KO se produce un mayor incremento de la frecuencia respiratoria que en los controles y una menor reducción de la frecuencia cardiaca durante la hipoxia, que son estadísticamente significativos (Fig. 15, C i y iii). La distensibilidad vascular, que es similar en ambos grupos de ratones a esta edad, durante el estímulo hipóxico se reduce significativamente más en los ratones Cx36KO que en los silvestres (Fig. 15, A-vii; $p < 0,05$).

El estímulo hipóxico produce una marcada y rápida reducción de la saturación arterial de O_2 , hasta el $42,45 \pm 8,46$ % en los WT y hasta el $49,73 \pm 5,76$ % en los Cx36KO, que se recupera rápidamente durante la reoxigenación. La presión parcial de CO_2 también se reduce, desde valores basales de $45,04 \pm 2,53$ mmHg en los WT y de $45,96 \pm 3,70$ mmHg en los Cx36KO hasta una hipocapnia de $30,90 \pm 4,07$ mmHg y $31,88 \pm 1,75$ mmHg, respectivamente; al finalizar el estímulo hipóxico, la $P_{tc}CO_2$ retorna lentamente a sus valores basales. Estos cambios en la Sat_aO_2 y la $P_{tc}CO_2$ no son estadísticamente significativos entre ambos grupos de ratones (Fig. 15, A viii y ix).

4.2.1.2. Cambios madurativos durante el desarrollo postnatal del quimiorreflejo a la hipoxia.

En los ratones WT adultos jóvenes de tres meses de edad (M3), la respuesta en frecuencia respiratoria a la hipoxia ya no es de tipo fásico como en P14 sino fásica-tónica y la depresión respiratoria post-hipoxia es menos pronunciada (Fig. 15, B-i), como ocurre en los ratones Cx36KO P14 (Fig. 15, A-i), y la amplitud respiratoria aumenta ligeramente durante la hipoxia (Fig. 15, B-iii), en vez de disminuir como ocurre en los lactantes (Fig. 15, B-iii). La frecuencia cardiaca durante la hipoxia muestra el mismo comportamiento bifásico que en los ratones P14; primero aumenta y luego disminuye, y al finalizar el estímulo se vuelve a reducir antes de retornar a los valores basales (Fig. 15, B-v); la magnitud de estos cambios es

significativamente menor en los ratones M3 que en los lactantes (Fig. 15, A-v). Con la edad, la distensibilidad vascular basal se reduce significativamente de $338,18 \pm 38,51 \mu\text{m}$ a $212,86 \pm 16,93 \mu\text{m}$ en los ratones WT, pero no en el caso de los ratones Cx36KO ($326,31 \pm 27,33 \mu\text{m}$ vs. $340,05 \pm 4,64 \mu\text{m}$); sin embargo, durante la hipoxia no varía en ninguno de los dos grupos de animales (Fig. 15, B-vii).

En los ratones M3 Cx36KO, la respuesta en frecuencia respiratoria a la hipoxia es también de tipo fásico-tónico, como en los ratones lactantes Cx36KO, y el incremento de la frecuencia respiratoria en valores absolutos, pero no en valores relativos, es mayor ya que parte de frecuencia respiratoria basal está aumentada (Fig. 15, B-i y C-i). La respuesta cardíaca sigue siendo bifásica, primero aumenta transitoriamente y luego se reduce lentamente, pero esta bradicardia es aún menor en los ratones Cx36KO (Fig. 15, B-v y C-iii). En los ratones Cx36KO con la edad no se produce la reducción fisiológica de la distensibilidad vascular que ocurre en los ratones WT, se mantienen los mismos valores que tienen los ratones silvestres y Cx36KO lactantes en P14, y tampoco cambia de forma significativa durante la hipoxia (Fig. 15, B-vii).

La reducción media en los niveles de saturación arterial de O_2 (Sat_aO_2) que provoca el estímulo hipóxico fue similar en ambos grupos de animales (del $43,36 \pm 0,65 \%$ en los wt y $41,56 \pm 1,09 \%$ en los ratones Cx36KO), y comparable a las de los ratones P14 (Fig. 15, B-viii). En los ratones M3 de ambos genotipos también se produce hipocapnia durante la respuesta a la hipoxia; sin embargo, la $\text{P}_{\text{tc}}\text{CO}_2$ en los ratones Cx36KO M3, que está significativamente aumentada en condiciones basales respecto a la de los ratones silvestres de la misma edad y a la de los ratones Cx36KO lactantes, se reduce menos durante el estímulo hipóxico (Fig. 15, B-ix).

En resumen, los ratones Cx36KO durante lactancia muestran una respuesta respiratoria exacerbada a la hipoxia con un menor efecto enlentecedor sobre la actividad cardíaca y una menor depresión cardiorrespiratoria a la reoxigenación. Además, en los ratones Cx36KO adultos jóvenes no se producen los cambios fisiológicos en el patrón de la respuesta respiratoria a la hipoxia, de fásico a fásico-tónico, ni en la reducción en los valores basales de la distensibilidad vascular que ocurren durante el desarrollo postnatal de los ratones silvestres; sin embargo, muestran unos niveles basales anormalmente elevados de CO_2 y una menor hipocapnia durante la respuesta a la hipoxia.

4.2.2. Quimiorreflejos a la hipercapnia.

El quimiorreflejo cardiorrespiratorio a la hipercapnia se exploró en los ratones lactantes (P14) y adultos jóvenes (M3) silvestres y Cx36KO aplicando concentraciones crecientes de CO₂ del 4%, 8%, y 12% en normoxia en el aire inspirado.

4.2.2.1. Respuesta cardiorrespiratoria a la hipercapnia en los ratones lactantes.

Los ratones P14 silvestres y Cx36KO responden al incremento del CO₂ en el aire inspirado con un aumento tónico de la frecuencia respiratoria y de la amplitud ventilatoria, que es tanto mayor cuanto más elevada es la concentración del CO₂ en el aire inhalado (Fig. 16, A-C *i* y *iii*). El alto CO₂ también reduce de forma dosis dependiente la variabilidad del comando respiratorio, sobre todo de su amplitud (Fig. 16, A-C *ii* y *iv*). En comparación, la respuesta respiratoria en los ratones Cx36KO es significativamente mayor, tanto en valores absolutos y como relativos respecto a los valores basales de frecuencia y amplitud respiratoria (Fig. 16, A-C *i* y *iii*; Fig. 18, A *i* y *ii*). La sensibilidad al CO₂ en los ratones Cx36KO, definida como la pendiente de los incrementos de la frecuencia respiratoria respecto al aumento del nivel de P_{tc}CO₂, es 92,6% mayor que en los ratones WT (6,88 rpm/mmHg vs 3,57 rpm/mmHg) (Fig. 18, A-*i*).

Los estímulos de hipercapnia producen en los ratones P14 WT y Cx36KO un pronunciado efecto bradicárdico sobre la actividad cardíaca; dicho efecto se instaura rápidamente al inicio del estímulo hipercápnico, se mantiene durante el estímulo y desaparece también rápidamente al finalizar el estímulo con el alto CO₂ (Fig. 16, A *v-vi*). El grado de bradicardia y la variabilidad de la frecuencia cardíaca aumentan en función de la concentración del CO₂ (Fig. 16, A-C *v-vi*). En comparación con los ratones WT, la reducción en los ratones Cx36KO de la frecuencia cardíaca, tanto en valores absolutos como relativos, es significativamente menor a bajo CO₂ (4%), y el efecto sobre la variabilidad cardíaca es también significativamente menor al 4% y 12% de CO₂ (Fig. 16, A y B *v-vi*; Fig. 18, A *iii* y *iv*). En ambos grupos de ratones, la distensión vascular tiende a variar de forma oscilante durante los estímulos con alto CO₂, y dicha inestabilidad parece aumentar con la concentración del CO₂ en el aire inspirado (Fig. 16, A-C *vii*). La P_{tc}CO₂ aumenta de forma proporcional al incremento del contenido de CO₂ en el aire inhalado y de forma similar en ambos tipos de ratón (Fig. 16, A-C *viii*).

No se observaron cambios en la Sat_aO₂ a bajo CO₂ (4%), sin embargo con

Figura 16. Quimiorreflejo cardiorrespiratorio a la hipercapnia en normoxia en los ratones P14 WT (azul) y Cx36KO (rojo). A-C Promedio de la frecuencia respiratoria (FR) y de su variabilidad (ΔVFR) (i y ii), de la amplitud respiratoria normalizada (ΔAR) y de su variabilidad (ΔVA) (iii y iv), de la frecuencias cardíaca (FC) y su variabilidad (ΔVFC) (v y vi) de la distensibilidad vascular (DV; vii), de la saturación arterial de oxígeno (Sat_aO_2 ; viii), y de la presión trascutánea de CO_2 ($P_{tc}CO_2$) (A 4%, B 8% y C 12% CO_2). La hipercapnia produce un incremento tónico de la FR y de la AR y un entrecimiento de la FC, que aumentan con el incremento de la concentración de CO_2 , comparativamente el esfuerzo respiratorio es mayor en los ratones Cx36KO, mientras que el efecto bradicárdico y de irregularización del ritmo cardíaco son significativamente menores. La Sat_aO_2 se reduce ligeramente al 8% y 12% de CO_2 , y la $P_{tc}CO_2$ aumenta de forma proporcional a la $[CO_2]$ que se les suministra (n=24, * p<0,05).

concentraciones superiores de CO₂ (8% y 12%) la SatO₂ se reduce muy ligeramente en ambos genotipos (Fig. 16, B-C ix).

4.2.2.2. Cambios madurativos durante el desarrollo postnatal del quimiorreflejo a la hipercapnia.

Durante el desarrollo postnatal desde la lactancia a la vida adulta tiene lugar un aumento significativo de la sensibilidad al CO₂ en los ratones silvestres del 100,93% (de 3,57 rpm/mmHg al 4,72 rpm/mmHg); por el contrario, en los ratones Cx36KO, que durante la lactancia tenían una sensibilidad aumenta respecto a la de los ratones silvestres, en la vida adulta su sensibilidad al CO₂ se reduce y es 62,30% veces menor que en los ratones WT (6,88 rpm/mmHg vs 5,46 rpm/mmHg); (Fig. 16, A-C i y ii; Fig. 18, A y B i). Esta menor sensibilidad al CO₂ en los ratones Cx36KO se asocia con una mayor frecuencia respiratoria en condiciones basales, que contrasta con la reducción fisiológica que ocurre durante la maduración postnatal en los ratones WT (ver epígrafe 4.1.1.2.).

La frecuencia basal del ritmo cardiaco en los ratones WT, que en la edad adulta es más rápida que durante la lactancia, se reduce menos durante el quimiorreflejo a la hipercapnia en la edad adulta y la variabilidad del ritmo es también menor (Fig. 17, A-C v y vii). La distensibilidad vascular, que con la edad disminuye en los ratones WT pero no en los ratones Cx36KO, aumenta de forma similar con el grado de hipercapnia en ambos grupos de ratones (Fig. 17, A-C vii).

Los valores basales de P_{tc}CO₂ son mayores en los ratones adultos Cx36KO que en los silvestres (ver epígrafe 4.1.3.1.), y en ambos grupos de ratones la P_{tc}CO₂ aumenta de forma proporcional al incremento de la concentración del CO₂ en el aire inhalado (Fig. 17, A-C viii). La SatO₂ se mantiene en su valores basales durante el estímulo con 4% CO₂, pero tiende a reducirse ligeramente a medida que aumenta la concentración de CO₂ al 8% y al 12% (Fig. 17, A-C ix).

En resumen, en los ratones Cx36KO lactantes el quimiorreflejo a la hipercapnia está exacerbado, mientras que la bradicardia y el aumento de la variabilidad del ritmo cardiaco son significativamente menores que en los ratones silvestres. En los ratones Cx36KO adultos, en vez de producirse el aumento fisiológico de la sensibilidad al CO₂ que ocurre con la edad en los ratones WT, la sensibilidad al CO₂ disminuye; con la edad también se reduce la bradicardia y la variabilidad frecuencia cardiaca inducida por la hipercapnia en ambos grupos experimentales.

Figura 17. Reflejo cardiorrespiratorio a la hipercapnia en normoxia en los ratones M3 WT (azul) y Cx36KO (rojo). A-C) Promedio de la frecuencia respiratoria (FR) y de su variabilidad (ΔVFR) (i y ii), de la amplitud respiratoria normalizada (ΔAR) y de su variabilidad (ΔVA) (iii y iv), de la frecuencia cardíaca (FC) y su variabilidad (ΔVFC) (v y vi) de la distensibilidad vascular (DV; vii), de la saturación arterial de oxígeno (Sat_aO_2 ; viii), y de la presión trascutánea de CO_2 ($P_{tc}CO_2$) (A 4%, B 8% y C 12% CO_2). La hipercapnia produce un incremento tónico de la FR y de la AR y un enlentecimiento de la FC que aumentan con el incremento de la concentración de CO_2 , comparativamente el esfuerzo respiratorio es mayor en los ratones Cx36KO al 4%, ya que sus valores basales son también mayores. El efecto bradicárdico del CO_2 es menor en los ratones Cx36KO por la mayor FC basal. La Sat_aO_2 se reduce ligeramente al 8% y 12% de CO_2 ; la $P_{tc}CO_2$ basal está aumentada en los ratones Cx36KO, y aumenta algo menos con el incremento de la $[CO_2]$ en aire inhalado. La DV está también aumentada basalmente en los ratones Cx36KO, pero aumenta proporcionalmente menos con la $[CO_2]$ ($n=24$, * $p<0,05$).

Figura 18. Efecto incremental de la hipercapnia en normoxia sobre la respiración y la actividad cardíaca en los ratones P14 y M3 WT (azul) y Cx36KO (rojo). **A y B)** Valores promedio normalizados respecto a los basales en normoxia-normocapnia de la frecuencia respiratoria (ΔFR , *i*), de la amplitud respiratoria (ΔAR , *ii*), de la frecuencia cardíaca (ΔFC , *iii*) y su variabilidad (ΔVFC , *iv*) correspondientes a la respuesta de valor de estado en los 3 últimos min de los estímulos (P14 en A y M3 en B). En comparación con los ratones WT, los ratones Cx36KO tienen una sensibilidad al CO₂ aumentada en P14 y disminuida en M3; y la variabilidad de la frecuencia cardíaca en P14 también está reducida ($n=25$; * $p<0,05$).

4.2.3. Mecanismos de acoplamiento cardiorrespiratorio implicados en la respuesta a la hipoxia y la hipercapnia en los ratones lactantes silvestres y deficientes en la cx36.

Durante los quimiorreflejos a la hipoxia y a la hipercapnia se produce una respuesta coordinada de los sistemas respiratorio y cardiaco. En este capítulo se analizan en detalle las interacciones que ocurren entre los osciladores respiratorio y cardiaco en función del genotipo, silvestre y Cx36KO, en los ratones lactantes P14.

4.2.3.1. Mecanismos de acoplamiento cardiorrespiratorio durante los quimiorreflejos a la hipoxia.

Los ratones silvestres lactantes P14 responden a la reducción del contenido de O₂ en el aire inspirado del 21% al 8%, con un incremento transitorio de la frecuencia, amplitud respiratoria y de la frecuencia cardiaca seguido por una fase de adaptación durante la cual los tres parámetros se reducen progresivamente hasta estabilizarse en valores incluso por debajo de los correspondientes valores basales en normoxia; en el caso de los ratones P14 Cx36KO, la fase de adaptación es significativamente menos pronunciada, y solo se reducen por debajo de los valores en normoxia la amplitud respiratoria y la frecuencia cardiaca mientras que la frecuencia respiratoria se mantiene elevada (Fig. 15, *A i-v; C i-iii*).

4.2.3.1.1. Arritmia sinusal respiratoria (RSA)

En los ratones P14 WT en condiciones basales de normoxia la amplitud de la modulación de la frecuencia cardiaca durante el ciclo respiratorio es significativamente mayor que en los ratones Cx36KO (Fig. 21, *A-iv* y *B-iv*). Sin embargo, en ambos genotipos cuando la respuesta cardiorrespiratoria a la hipoxia ha alcanzado su valor de estado, la RSA disminuye sustancialmente hasta prácticamente desaparecer (Fig. 21, *C-iv* y *D-iv*).

4.2.3.1.2. Sincronización de fase cardiorrespiratoria (CRPS).

A diferencia de la RSA, la sincronización de fase cardiorrespiratoria aumenta con la hipoxia. En el análisis detallado de la sincronización de fase en el ejemplo que se ilustra, que se ha realizado cuando la respuesta a la hipoxia se ha estabilizado (Fig. 19, *A* y *B*). En el caso del ratón Cx36KO, la sincronización de la fase (CRPS) de la ocurrencia de los latidos cardiacos (n) dentro del periodo normalizado del ciclo respiratoria (m), definido entre el inicio de dos inspiraciones

Figura 19. Sincronización de fase cardiorrespiratoria (CRPS) en hipoxia (8% O₂) en los ratones P14 Cx36KO (rojo) vs. WT (azul). **A y B** Registros crudos de la respiración (*Vent.*), de la actividad cardíaca (*ECG*) de la oximetría pulso-a-pulso (*Oxi.*), con sus correspondientes valores de frecuencia instantánea respiratoria (*FR_i*), cardíaca (*FC_i*) y del cociente *FC_i/FR_i* en normoxia y durante la respuesta estabilizada a la hipoxia en los ratones WT y Cx36KO (**A** y **B**). **C y D** Rasters e histogramas de fase de los latidos cardíacos *R_n*, *R_{n+1}*... dentro del ciclo respiratorio *I_n-I_{n+1}* (*izda*) y de las respiraciones *I* dentro del ciclo cardíaco *R_n-R_{n+1}* (*dcha*) en los ratones WT y Cx36KO (**C** y **D**) durante la hipoxia. **E y F** Histogramas de fase (Φ) o intervalo *R_n/I* y de la cofase de 1^{er} orden (Θ) o intervalo *IR_n* (*i* y *ii*) y la curva $\Phi-\Theta$. **D** Gráficas de las duraciones de los intervalos perturbados (*RR_n*) y los siguientes (*RR_{n+1}*,...) en función del orden de enganche (WT en *i* y Cx36KO en *ii*). En hipoxia, la CRPS es mayor en los ratones Cx36KO que en los WT, con unos órdenes de enganche preferentes respectivamente de 1:2 y 1:3 en valores de fase preferente larga y corta y un débil efecto de “reseteo” de la fase del ciclo cardíaco.

sucesivas (I_n-I_{n+1}), y de la ocurrencia del inicio de las inspiraciones dentro del ciclo cardiaco (R_n-R_{n+1}), definido por las ondas R de dos complejos QRS sucesivos es significativamente mayor que en el ratón WT (Fig. 19, *C i-ii* y *D i-ii*); en caso del ratón WT el orden enganche (m/n) es 1:3 y en el ratón Cx36KO es 1:2 y las fases preferentes del ciclo cardiaco en el que ocurre el inicio de la inspiración R_n son respectivamente cortas y largas y los correspondientes valores preferentes de la cofase de primer orden o intervalo IR_n son largo y corto (Fig. 19, *E i-ii* y *F i-ii*); las curvas de fase-cofase, que definen la duración del intervalo cardiaco perturbado, muestran un débil efecto de “reseteo” de fase sobre el ciclo respiratorio perturbado y los siguientes (Fig. 19, *G i-ii*).

4.2.3.1.3. Función de transferencia de las frecuencias respiratorio-cardíacas.

La función de transferencia de las frecuencias respiratorio-cardíacas en el caso del ratón WT en normoxia se agrupa alrededor de una relación 1:3, al inicio de la respuesta a la hipoxia en una relación 1:2 y finalmente, durante la respuesta adaptada a la hipoxia en una relación 1:4 (Fig. 20, *A-i*, *a-c*). Dichas relaciones de frecuencia se corresponden en normoxia a un enganche inestable con una alternancia $1:3 \leftrightarrow 1:2$, con cambios continuos de fase corta a larga y de cofase larga a corta, mientras que durante la respuesta adaptada a la hipoxia se producen tramos de enganche estables 1:3 y 1:4, con valores de fase-cofase que se mantienen en los sucesivos ciclos durante el enganche de fase (Fig. 20, *C i-ii*). En el caso del ratón Cx36KO, las frecuencias respiratorio-cardíacas en normoxia también tienden a agruparse alrededor de una relación 1:3 con un enganche inestable alternando $1:3 \leftrightarrow 1:2$; mientras que durante la respuesta estable a la hipoxia la relación de las frecuencias respiratorio-cardíacas está centrada en 1:2, debido al enganche de fase ciclo-a-ciclo estable de orden 1:2, con valores de fase-cofase que se mantienen en los sucesivos ciclos durante el enganche de fase (Fig. 20, *B-ii*, y *D i-ii*).

4.2.3.1.4. Oximetría pulso-a-pulso.

La reducción del 21% al 8% de O_2 en el aire inspirado disminuye en el valor medio de la Sat_aO_2 arterial del $98,60 \pm 0,35$ % al $42,45 \pm 8,46$ % en los ratones P14 silvestres y a valores algo menores, pero no estadísticamente distintos, en los ratones Cx36KO, del $99,20 \pm 0,19$ % al $49,73 \pm 5,76$ %. (Fig. 15, *A-viii*). Dicha reducción se genera como consecuencia de la consiguiente disminución del contenido de O_2 en cada bolo cardiaco y de la reducción en frecuencia cardiaca

Figura 20. Traslamiento de frecuencias respiratorio-cardíacas en hipoxia (8% O_2) en los ratones P14 Cx36KO vs. WT. **A y B)** Histogramas de los valores de frecuencia instantánea respiratoria (FR_i) en abscisas (i) y cardíaca (FC_i) en ordenadas (ii), y la correspondiente gráfica FR_i/FC_i (iii), en condiciones basales de normoxia (a) y durante la respuesta inicial y estabilizada a la hipoxia (b y c) en los ratones WT y Cx36KO (A y B). **C y D)** Trazados seleccionados en normoxia (a) y durante la respuesta estabilizada a la hipoxia (c). La función de transferencia muestra un agrupamiento de los puntos en una relación 1:3 y luego 1:2 en normoxia y al inicio de la hipoxia, respectivamente, en ambos tipos de ratón, sin embargo en el ratón WT la relación durante la fase adaptada de la respuesta pasa a ser 1:4 y en el ratón Cx36KO que no se adapta se mantiene en la relación 1:2. Durante las respuestas estabilizadas a la hipoxia, los enganches cardiorrespiratorios son más estables con relaciones fase-cofase más fijas (*) que en normoxia.

Figura 21. Oximetría pulso-a-pulso en hipoxia (8% O₂) en los ratones P14 Cx36KO (rojo) vs. WT (azul). A-D) Promedio de la oximetría respecto a las ondas R del complejo QRS (i), de la ventilación respecto al inicio de la inspiración I (ii), rasters y histogramas periéstímulo de los latidos cardiacos (iii), promedios de la RSA (iv) de la señal de oximetría todos respecto a las I_s (v), en los ratones WT (A y C) y Cx36KO (B y D) en normoxia (A y B) e hipoxia (C y D). La hipoxia reduce significativamente la amplitud de la oximetría y la RSA; sin embargo, aumenta la sincronización en fase de las descargas cardiacas dentro del ciclo respiratorio (CRPS), que contribuye a mejorar la oximetría pulso-a-pulso.

media inducida por la hipoxia mantenida, que es algo menor en los ratones Cx36KO que en los ratones silvestres (Fig. 19, A y B *i-ii* y Fig. 21, A-D *i*). A su vez el contenido en O₂ entre los pulsos cardiacos sucesivos está modulado por la respiración en función del grado de RSA y de la CRPS (Fig. 21, A-D *ii-v*). En normoxia la RSA es mayor y la CRPS es menor en los ratones silvestres que en los ratones Cx36KO, mientras que en ambos grupos de animales en hipoxia la RSA disminuye y la CRPS aumenta. Como consecuencia de esta mayor sincronización en fase de las descargas cardiacas dentro del ciclo respiratorio, el promedio de la modulación de la oximetría pulso-a-pulso con la respiración se reduce proporcionalmente menos en hipoxia que el promedio de la oximetría con el pulso cardiaco (Fig. 21, *i* vs. *v* en A-D), sugiriendo que a través de este mecanismo de acoplamiento cardiorrespiratorio se optimiza la relación temporal entre la perfusión y la ventilación pulmonar en la hipoxia.

4.2.3.2. Mecanismos de acoplamiento cardiorrespiratorio durante los quimiorreflejos a la hipercapnia.

Los ratones P14 WT responden a concentraciones crecientes de CO₂ con un incremento progresivo de la frecuencia y la amplitud respiratoria, y con un progresivo enlentecimiento de la frecuencia y un aumento de la variabilidad cardiaca; en comparación, los ratones Cx36KO mostraron un mayor esfuerzo respiratorio en frecuencia y amplitud, y a nivel cardiaco una menor bradicardia y una mayor regularidad del ritmo cardiaco (Fig. 16).

4.2.3.2.1. Episodios bradicardia transitoria (EBT).

Estas diferencias en los valores promedio de los parámetros cardiacos se corresponden con unos patrones de actividad cardiaca muy distintos en los ratones WT y Cx36KO (Fig. 22, A y B). En el caso de los ratones silvestres el ritmo sinusal cardiaco durante los estímulos de hipercapnia se vuelve muy irregular, que contrasta con la regularidad del ritmo observada en el ratón Cx36KO; dicha irregularidad se debe fundamentalmente a la presencia de numerosos episodios de bradicardia transitoria (EBT), que se repiten de forma rítmica con una frecuencias de $0,58 \pm 0,23$ Hz, y cuyo número y magnitud aumenta desde el inicio al final del estímulo de hipercapnia y con la concentración de CO₂ en el aire inspirado (Fig. 22, A *i-iii* C *i-iii* y E *i* y *ii*). Cada uno de estos episodios de bradicardia consiste por una brusca reducción de la frecuencia cardiaca que posteriormente retorna lentamente a su ritmo previo (Fig. 22, E-*ii*). En el ratón Cx36KO este tipo de episodios también está

Figura 22. Mecanismos de acoplamiento cardiorrespiratorio durante la hipercapnia-normoxia en los ratones P14 Cx36KO (rojo) vs. WT (azul): (I) Episodios de bradicardia transitoria (EBT). **A y B)** Registros crudos de la respiración (Vent.), de la actividad cardiaca (ECG) con sus correspondientes valores de frecuencia instantánea respiratoria (FR_i), cardíaca (FC_i) y el cociente FC_i/FR_i durante la hipercapnia al 4%, 8% y 12%CO₂ (i-iii) en los ratones WT y Cx36KO (**A y B**). **C-F)** Episodios de bradicardia transitoria (*flechas*); histogramas inter-episodios en función de la [CO₂]_{aire} (WT en **C** y Cx36KO en **D**), rasters de los EBT_s durante los estímulos hipercapnicos al 12% de CO₂ (i) con los promedios de la FR_i y de la ventilación respiratoria (Vent.) respecto al inicio de los EBT_s (ii y iii) (WT en **E** y Cx36KO en **F**). Los EBT_s son más numerosos y más regulares a medida que aumenta la CO₂_{aire}; en cada EBT la frecuencia disminuye primero bruscamente y luego retorna progresivamente hasta su valor basal, se inician acoplados a la inspiración cada 7-8 ciclos respiratorio; en los ratones Cx36KO el número de EBT_s y su amplitud son significativamente menores.

presente pero en un número significativamente más reducido y la bradicardia es de menor magnitud (Fig. 22, *D i-iii* y *F-i*). La función de correlación cruzada entre el inicio de los EBT con la respiración reveló que ambos fenómenos están sincronizados (Fig. 22, *E* y *F iv*), el inicio del de cada EBT coincide preferentemente en los ratones WT con el final de la espiración y el inicio de la inspiración, mientras que en ratón Cx36KO el inicio del EBT está algo más desfasado coincidiendo con la fase inspiratoria de la respiración; el orden de enganche de este tipo acoplamiento cardiorrespiratorio es muy bajo, en el caso de los ratones silvestres con el 12% de hipercapnia en los que los ETB son muy rítmicos, ocurre un EBT por cada 7-8 ciclos respiratorios. Los sucesivos latidos cardiacos dentro de cada EBT siguen una dinámica compleja que varía en función de la concentración del CO₂ en el aire inspirado y con el genotipo de los ratones. La distribución de los histogramas de los intervalos cardiacos (RR) del ratón WT muestra una gran dispersión de los intervalos, tanto mayor cuanto más aumenta con la concentración del CO₂ en el aire inhalado; junto con el valor de intervalo preferente corto, que solo se incrementa ligeramente con la concentración de CO₂, ocurren otros intervalos múltiples enteros del doble y triple de duración (Fig. 23, *A i-iii*, *flechas* y *cabezas de flecha*). La relación entre las duraciones de los sucesivos intervalos (RR_n y RR_{n-1}) se analizó con diagramas de Poincaré se observa al 4 y al 8% de CO₂ una secuencia característica en la que a los intervalos más probables de más corta duración se sigue otro del doble de duración, y a su vez los que le siguen se reducen progresivamente en duración hasta recuperar valor del intervalo preferente (Fig. 23, *C i-ii*, *flechas a→b→c→a*); en el caso del 12% de CO₂, la secuencia consiste en un incremento de la duración primero al triple, que se reduce a continuación al doble y luego los intervalos que siguen se acortan progresivamente hasta el valor inicial (Fig. 23, *C-iii*, *flechas a→b→c→a*). Este patrón secuencial sugiere que durante los EBT se produce primero, un bloqueo completo de la conducción auricular de uno o dos latidos sinodales cardiacos seguidos de una fase de bloqueo parcial en el que se recupera progresivamente la velocidad de conducción (Zipes y Jalife, 2006). Por el contrario, en el ratón Cx36KO, el patrón de ritmicidad cardiaca se caracteriza por una alta regularidad (Fig. 23, *B i-iii*) y durante los EBT, que ocurren de forma más ocasional, la dinámica de los sucesivos intervalos es similar a la descrita previamente, pero no se llega a producir el bloqueo completo de más de un latido como ocurre en los ratones WT con el 12% de CO₂, (Fig. 23 *D i-iii*, *a→b→c→a*).

Figura 23. Dinámica de la secuencia de los latidos cardiacos dentro de cada EBTs inducidos por hipercapnia en los ratones P14 WT (azul) y Cx36KO (rojo), **A** y **B**) histograma normalizado de los intervalos cardiacos a concentraciones crecientes de CO₂ (i-iii) (WT en **A** y Cx36KO en **B**) mostrando el intervalo preferente (*flecha*) y del doble y triple de su duración (*cabezas de flecha*) en **A**. **C** y **D**) Diagramas de Poincaré de los intervalos sucesivos (RR_n y RR_{n+1}); en los ratones WT, los intervalos de más corta duración se siguen de otros del doble o el triple de duración que posteriormente se acortan progresivamente (*flechas a→b→c*), indicando el fallo o bloqueo en la conducción de uno o dos latidos sinusales y la posterior recuperación de la velocidad de conducción auricular; en los ratones Cx36KO este efecto de bloqueo en la conducción auricular es significativamente menor, la gran mayoría de los intervalos no forman parte de los EBT_s (*flechas* en **D**).

4.2.3.2.2. Sincronización de fase cardiorrespiratoria (CRPS).

Una vez caracterizado el mecanismo de acoplamiento cardiorrespiratorio de los EBT con la respiración con un orden de enganche de fase muy bajo 1:7-8, abordamos el estudio las interacciones entre los osciladores respiratorio y cardiaco en órdenes de enganche superiores. En el ejemplo de ratón P14 WT se produce una débil sincronización de fase de los latidos cardiacos (R) dentro de cada ciclo respiratorio (I_n-I_{n+1}), y de la sincronización de la fase del inicio de la inspiración dentro del cada ciclo cardiaco (R_n-R_{n+1}), no se observan cambios significativos en función de la concentración de CO₂ (Fig. 24, A *i-iii*). Por el contrario, en el ratón Cx36KO se observa una evidente sincronización de fase de los latidos cardiacos dentro del ciclo respiratorio y de las inspiraciones dentro del ciclo cardiaco (Fig. 24 B, *i-iii*); la sincronización de fase disminuye con el incremento la concentración del CO₂ en el aire inspirado y el orden de enganche 1:2 con el 4% de CO₂ pasa a ser de orden 1:1 con el 8% y se mantiene en 1:1 con el 12% de CO₂.

En el caso del ratón WT, la distribución de los valores de fase o intervalos R_n-I y de cofase de primer orden o intervalos I_n-R_{n+1} muestra una gran dispersión y contiene valores de fase y cofase cuya suma es de mayor duración que la intervalo preferente, que progresivamente se alarga a medida que aumenta la concentración de CO₂ (Fig. 24 C, *i-iii*). En el caso del ratón Cx36KO, hay un claro predominio de las fase largas y de las cofases cortas durante el enganche 1:2 que ocurre al 4% de CO₂; durante los enganche de orden 1:1 que ocurre con el 8% las fases y cofases preferentes son intermedias, mientras que en el enganche 1:1 al 12% la fase preferente se alarga y cofase preferente se acorta (Fig. 24 D, *i-iii*). En el ratón P14 WT, las curvas de fase-cofase de primer orden muestran un agrupamiento de los puntos alrededor del intervalo preferente y en valores de múltiplos enteros de este, del doble en el caso del 4% y el 8%, y hasta del triple en el caso del 12% de CO₂ (Fig. 24, C *i-iii*); no se evidencia un efecto de “reseteo” de fase del ritmo cardiaco por la respiración.

Por el contrario en el ratón Cx36KO, las curvas de fase-cofase muestran un progresivo alargamiento del intervalo medio con la concentración de CO₂, y un efecto de “reseteo” de la fase del ritmo cardiaco que se evidencia mejor con las concentraciones más altas de CO₂, al 8% y 12%, y que se caracteriza por un menor alargamiento del ciclo cardiaco cuando el inicio de la respiración ocurre en fases cortas que en fases largas (Fig. 24 D, *i-iii*).

Figura 24. (II) Sincronización de fase cardiorrespiratoria (CPRS) en hipercapnia en los ratones P14 WT (azul) y Cx36KO (rojo). **A y B** Rasters e histogramas de fase de los latidos cardiacos $R_n, R_{n+1} \dots$ dentro del ciclo respiratorio $I_n - I_{n+1}$ (izda) y de las respiraciones I dentro del ciclo cardiaco $R_n - R_{n+1}$ (dcha) para $[CO_2]$ crecientes (*i-iii*) en los ratones WT y Cx36KO (**A y B**). **C y D** Histogramas de fase (Φ) o intervalo $R_n I$ y de la cofase de 1^{er} orden (Θ) o intervalo IR_n (*i y ii*) y curva $\Phi - \Theta$ (*iii*) (WT en **C** y Cx36KO en **D**). La CPRS es mayor en los ratones Cx36KO que en los WT; con el 4% de CO₂ el orden de enganche de fase es 1:2 y con el 8% y el 12% es de orden 1:1. En los ratones WT no hay valores de fase y de cofase preferentes, y el intervalo perturbado se alarga de forma independiente de la fase, mientras que en los ratones Cx36KO la respiración tiene un efecto de “reseteo” de fase del ritmo cardiaco.

4.2.3.2.3. Función de transferencia de las frecuencias respiratorio-cardiacas.

La función de transferencia de las frecuencias respiratorio-cardiaca durante las respuestas a la hipercapnia al 12% es muy distinta entre los ratones P14 WT y Cx36KO (Fig. 25 A y B *i-iii*), como consecuencia de los diferentes mecanismos de acoplamiento cardiorrespiratorio que tienen lugar en los dos grupos de ratones. En condiciones de normoxia-normocapnia, la función de transferencia tiende a agruparse alrededor de una relación de frecuencias respiratorio-cardiacas 1:3; con valores de fase y cofase mantenidos ciclo-a-ciclo, que es más estable en los ratones Cx36KO que en los silvestres (Fig. 25, A y B *iii-a*, y C y D *i-a*). Durante la respuesta a la hipercapnia al 12% la función de transferencia de frecuencias respiratorio-cardiacas en los ratones WT viene fundamentalmente determinada por los cambios fásicos en la frecuencia cardiaca que se producen rítmicamente cada vez que se genera un EBT; en el inicio de la respuesta al CO₂, cuando en los EBT_s se produce el bloqueo de un solo latido cardiaco, la secuencia de las relaciones de frecuencias se corresponden con los saltos de enganche 1:2-1:1-1:1-1:2, pero a medida que la exposición al alto CO₂ se prolonga y se produce el bloqueo de un número mayor de latidos, la secuencia de los enganches es del tipo 1:2-1:1-1:0-1:1-1:1-1:1-1:2; entre los sucesivos episodios de bradicardia el enganche tiende a mantenerse en el orden 1:2 (Fig. 25, A *iii-b* y *c*, y C *ii-b* y *iii-c*). Por el contrario, en los ratones Cx36KO la función de transferencia muestra un perfil característico en “diente de sierra”, ya que las relaciones de frecuencias respiratorio-cardiacas pasan de ser 1:3 en normocapnia a una relación 1:2 y finalmente a una relación 1:1, que es la mayoritaria en presencia del 12% de CO₂ (Fig. 25, B-*iii a-c*); dichas relaciones se corresponden respectivamente a enganches de orden 1:2 y 1:1 muy estables con valores de fase y cofase fijos (Fig. 25, D *ii-b* y *iii-c*, *asteriscos*).

4.2.3.2.4. Oximetría pulso-a-pulso.

Durante los episodios bradicárdicos transitorios inducidos por el alto CO₂ se produjo en el ratón P14 WT una importante modulación de la oximetría del pulso; el contenido de O₂ de cada pulso arterial aumenta bruscamente con el alargamiento del intervalo cardiaco al doble o al triple y a continuación se va reduciendo progresivamente en los sucesivos pulsos cardiacos a medida que los intervalos cardiacos se van acortando (Fig. 26, A *i-ii*). Dicha modulación también aparece en la correlación de la oximetría del pulso respecto al conjunto de todos latidos cardiacos, indicando la relevancia que tiene la modulación de la oximetría en los

Figura 25. Trasferencia de frecuencias respiratorio-cardíacas en hipercapnia (12% CO_2) en los ratones P14 Cx36KO vs. WT. **A** y **B**) Histogramas de los valores de frecuencia instantánea respiratoria (FR_i) en abscisas (i) y cardíaca (FC_i) en ordenadas (ii), y la correspondiente gráfica FR_i/FC_i (iii), en condiciones basales de normocapnia (puntos azules, a) y durante la respuesta inicial y estabilizada a la hipercapnia (b y c) en los ratones WT y Cx36KO (A y B). **C** y **D**) Trazados seleccionados en normoxia (a) y durante la respuesta inicial y estabilizada a la hipercapnia (b y c). La función de transferencia en el ratón WT es muy inestable por la generación rítmica de los EBT_s, en el ratón Cx36KO la transferencia de frecuencias muestra un perfil “en dientes de sierra”, en el que se producen enganches estables 1:3 en normocapnia, 1:2 al inicio de la hipercapnia y fundamentalmente 1:1 durante la respuesta estabilizada con saltos brusco entre ellos, durante los enganches las relaciones fase-cofase son fijas (*).

Figura 26. Oximetría pulso-a-pulso en hipercapnia (12% CO₂) en los ratones P14 Cx36KO vs. WT. A y B) Raster de la respiración (*Vent.*), del ECG y de la oximetría pulso-a-pulso respecto al inicio de los episodios de bradicardia transitoria (EBT) (*i*) y los promedios de la oximetría respecto al inicio de los EBTs (*ii*), respecto al pulso cardíaco (R) (*iii*), y los promedios de la ventilación y la oximetría respecto al inicio de la inspiración (*iv* y *v*) (WT en A y Cx36KO en B). Durante cada EBT_s se produce en el ratón P14 WT un importante aumento transitorio de la oximetría, que es significativamente menor en el caso del ratón Cx36KO; por el contrario, la modulación de la oximetría con al respiración es mayor en el ratón Cx36KO.

sucesivos pulsos durante los EBT_s en el valor promedio de la Sat_aO₂ (Fig. 24, A-iii). En el ratón Cx36KO también se observa la modulación de la oximetría del pulso durante los EBT pero es de mucha menor magnitud (Fig. 24, B i y ii), dada la menor amplitud de los EBT en este grupo de animales (Fig. 22, F i y ii). La oximetría del pulso durante la hipercapnia también se correlaciona con la respiración, más en los ratones Cx36KO que en los silvestres (Fig. 24, A y B, iv y v).

En resumen, el principal mecanismo de acoplamiento entre la respiración y la actividad cardíaca en los ratones P14 WT y Cx36KO en condiciones de hipoxia-normocapnia es la CRPS con enganches de fase estables de bajo orden (1:3 y 1:4). En condiciones de hipercapnia-normoxia, el mecanismo de CRPS persiste en los ratones Cx36KO pero en ordenes de enganche superiores (1:2 y 1:1); sin embargo, el mecanismo de acoplamiento cardiorrespiratorio dominante en los ratones P14 WT son los EBT_s, que ocurren en un orden de enganche muy bajo (1:7-8 o inferior). Ambos mecanismos de acoplamiento cardiorrespiratorio introducen importantes no-linealidades en la función de transferencia de las frecuencias respiratorio-cardíacas; la función de transferencia en presencia de CRPS (*i.e.*, en condiciones de hipoxia-normocapnia e hipercapnia-normoxia), muestra un perfil en “dientes de sierra”, con relaciones enteras 1:4, 1:3, 1:2 y 1:1 estables y bruscos de saltos de frecuencia cardíaca entre ellas. Por el contrario, el mecanismo de acoplamiento de los EBTs con la respiración introduce en la función de transferencias una alta irregularidad con un patrón secuencial que se repite rítmicamente cada 7-8 respiraciones, durante el cual la relación de transferencia de las frecuencias salta bruscamente a una relación 1:0 ó 1:1, y luego retorna progresivamente a relaciones de mayor orden, 1:2 y 1:3, donde se mantiene hasta que se genera el siguiente EBT. La oximetría de pulso se mantiene estable durante la CRPS y oscila durante los EBT, primero aumenta bruscamente y luego disminuye progresivamente.

4.3. EFECTO DE LA AUSENCIA DE EXPRESIÓN DE LA Cx36 SOBRE LA SUSCEPTIBILIDAD A LA MUERTE SÚBITA DE LA INFANCIA POR ESTRÉS RESPIRATORIO.

Conforme a la hipótesis de “triple riesgo” de la etiopatogenia del síndrome de muerte súbita de la infancia (SIDS) (Filiano y Kinney, 1994), en los ratones lactantes Cx36KO concurren los dos factores predisponentes intrínsecos, como son: el defecto en el control cardiorrespiratorio y el periodo crítico del desarrollo postnatal. Por dicho motivo se planteó estudiar la susceptibilidad de estos ratones a sufrir el SIDS sometiéndolos al factor extrínseco desencadenante más reconocido: la “asfixia”, que se produce cuando el infante duerme en posición de “cubito prono” y respira su propio aire exhalado con una alta concentración de CO₂ y empobrecido en O₂.

4.3.1. Quimiorreflejo cardiorrespiratorio de los ratones lactantes silvestres y Cx36KO a la “asfixia”.

Para poder simular la condición de “asfixia” se realizaron protocolos combinados de una hipoxia severa (8% O₂) con una hipercapnia a concentraciones crecientes de CO₂ del 4%, 8%, y 12% en el aire inhalado. Los ratones P14 silvestres respondieron a los estímulos combinados de hipoxia-hipercapnia con un aumento fásico-tónico de la frecuencia respiratoria y de la amplitud ventilatoria, que es progresivamente mayor a medida que se incrementa la concentración del CO₂ en el aire inhalado (Fig. 27, A-C *i-v*). En comparación, estas respuestas respiratorias a los estímulos combinados fueron de mayor magnitud que las que provoca el CO₂ a las mismas concentraciones en normoxia (Fig. 15, A-C *i-iv*; *cf.*, Fig. 17, A *i-ii*). En los ratones Cx36KO, las respuestas a la hipoxia-hipercapnia al 4% y al 8% de CO₂ son significativamente mayores en frecuencia y amplitud respiratoria en comparación con los ratones WT, tanto en valores relativos como absolutos (Fig. 27, A y B *i-iv*; Fig. 28, A *i-ii*). Con la concentración más alta de CO₂ (12%), la respuesta respiratoria en ambos grupos de animales alcanza el nivel de saturación. Al finalizar los estímulos combinados de hipoxia-hipercapnia se produce una depresión respiratoria durante la cual se reduce la frecuencia y la amplitud respiratoria por debajo de los niveles basales antes de recuperarse los valores basales; dicha depresión respiratoria es significativamente menor que la que tiene lugar al finalizar los estímulos hipóxicos en normocapnia (Fig. 15, A, *i-iv*; *cf.*, Fig. 27, A-C *i-iv*).

Figura 27. Quimiorreflejos cardiorrespiratorios a la hipoxia-hipercapnia (“asfixia”) en los ratones P14 Cx36KO (rojo) vs. WT (azul). A-C) Promedios de la frecuencia respiratoria (FR) y de su variabilidad (ΔVFR) (i y ii), de la amplitud respiratoria normalizada (ΔAR) y de su variabilidad (ΔVA) (iii y iv), de la frecuencias cardíaca (FC) y su variabilidad (ΔVFC) (v y vi), de la distensibilidad vascular (DV; vii), de la saturación arterial de oxígeno (Sat_{aO_2} ; viii), y de la presión trascutánea de CO_2 ($P_{tc}CO_2$) (A, 4% CO_2 y 8% O_2 ; B, 8% CO_2 y 8% O_2 ; y C 8% CO_2 y 12% O_2). El estímulo combinado de hipoxia-hipercapnia produce un incremento tónico de la FR y de la AR que aumentan con el incremento de la concentración de CO_2 en la mezcla de gases; comparativamente el esfuerzo respiratorio es mayor en los ratones Cx36K. La respuesta cardíaca es bifásica, primero aumenta transitoriamente y luego se reduce bruscamente (flechas a y b en v), con el incremento al 8% y al 12% de CO_2 el efecto bradicárdico se reduce durante la segunda parte de la respuesta (flecha c), comparativamente el efecto bradicárdico es significativamente menor en los ratones Cx36KO. Al finalizar los estímulos se produce una depresión respiratoria y cardíaca transitoria (flecha d). La distensibilidad vascular aumenta menos durante la primera parte de la respuesta en los ratones Cx36KO en los ratones. El grado de desaturación arterial de oxígeno aumenta ligeramente con la $[CO_2]$, y el CO_2 sanguíneo se reduce durante los estímulos al 4% de CO_2 y aumenta progresivamente con el 8% y el 12% de CO_2 en el aire inhalado ($n=24$, * $p<0,05$).

La respuesta cardíaca a los estímulos combinados de hipoxia-hipercapnia es compleja y varía en función de la concentración del CO₂. En los ratones WT durante estímulo de hipoxia-hipercapnia al 4%, primero se produce un aumento discreto y transitorio de la frecuencia cardíaca que se sigue de un enlentecimiento brusco y mantenido a lo largo del estímulo (Fig. 27, *A flechas a y b en v*). Con los estímulos combinados al 8% y 12% después de la breve taquicardia inicial, también se produce una brusca bradicardia pero se sigue de una fase de adaptación en la que se recupera parcialmente la frecuencia cardíaca (Fig. 27, *B y C flechas a-c en v*); esta fase de recuperación parcial de la bradicardia no se observa durante los estímulos de hipercapnia en normoxia (Fig. 16, *B-v y C-v*). Al finalizar los estímulos combinados y coincidiendo con el inicio de la depresión respiratoria se produce primero una brusca caída de la frecuencia cardíaca, seguida de una lenta recuperación hasta alcanzar los valores basales (Fig. 27, *A-C flechas d en v*). En los ratones P14 Cx36KO se produce el mismo patrón de cambios en la actividad cardíaca durante los estímulos combinados, pero en comparación con los ratones silvestres se observa un significativo menor grado de bradicardia y de variabilidad cardíaca (Fig. 27, *A-C v-vi*; Fig. 28, *A y B i-ii*). La distensibilidad vascular durante los estímulos combinados en los ratones WT aumenta en función de la concentración del CO₂ de forma transitoria durante la primera parte de la respuesta (Fig. 27, *A-C vii*), en mayor magnitud que durante los estímulos de hipercapnia en normoxia (*cf.*, Fig. 16, *A-C vii*); en los ratones Cx36KO, los cambios en la distensibilidad vascular son significativamente menores, y siguen un patrón distinto, primero se reduce ligeramente y luego aumenta de forma progresiva a lo largo de los estímulos.

Durante los estímulos combinados de hipoxia-hipercapnia con el 4% CO₂, la saturación arterial de O₂ medida por oximetría pulsátil (Sat_aO₂) se reduce hasta de 52,03±1,89% en los ratones silvestres y hasta el 42,63±1,14% en los ratones Cx36KO (Fig. 28, *A-viii*; $p<0,05$); dicha desaturación aumenta ligeramente con el incremento de la concentración CO₂, tendiendo a igualarse en ambos genotipos durante los estímulos al 12% (37,49±7,61 % en WT y 37,49±7,62 % en Cx36KO). Los cambios en la P_{tc}CO₂ fueron similares en los ratones silvestres y Cx36KO; durante los estímulos combinados con el 4% CO₂, el valor de la P_{tc}CO₂ se redujo por debajo de los niveles basales (40,66±0,57 mmHg vs. 42,44±2,46 mmHg), mientras que durante los estímulos con el 8% y 12% CO₂ se produce una hipercapnia neta, que aumenta con la concentración de CO₂ en el aire inhalado (Fig. 28, *A-C ix*). Estos

Figura 28. Efecto incremental de la hipoxia-hipercapnia sobre la respiración y la actividad cardiaca en los ratones P14 Cx36KO (rojo) vs. WT (azul). **A)** Valores promedio normalizados respecto a los basales en normoxia-normocapnia de la frecuencia respiratoria (ΔFR , i) y de la amplitud respiratoria (ΔAR , ii). **B)** Valores promedio normalizados respecto a los basales en normoxia-normocapnia de la frecuencia cardiaca (ΔFC , i) y su variabilidad (ΔVFC , ii). En comparación, los ratones Cx36KO tienen una sensibilidad respiratoria a la asfixia incrementada, y responden con un menor entretamiento y variabilidad cardiaca ($n=24$; * $p<0,05$)

valores de presión parcial de CO₂ sanguíneos son significativamente menores que los que se alcanzan durante los estímulos de hipercapnia en normoxia (cf., Fig. 16, A-C ix).

En resumen, los ratones lactantes P14 deficientes en Cx36 cuando son sometidos a un estrés respiratorio de “asfixia” responden con un mayor esfuerzo respiratorio y con una menor bradicardia y variabilidad cardiaca que los ratones silvestres.

4.3.2. Mecanismos de acoplamiento cardiorrespiratorio durante los quimiorreflejos a la asfixia en los ratones lactantes silvestres y Cx36KO.

4.3.2.1. Episodios bradicardia transitoria (EBT).

En los ratones silvestres el ritmo sinusal cardiaco es muy irregular durante la respuesta a asfixia debido, como ocurría en condiciones de hipercapnia en normoxia, a la presencia de numerosos episodios de bradicardia transitoria que se repiten de forma rítmica, y que aumentan en número y en magnitud a medida que progresa la asfixia y con incremento de la concentración de CO₂ (Fig. 29, A y C *i-iii*, y E *i-ii*). En los ratones Cx36KO también se producen EBT durante la asfixia, pero ocurren fundamentalmente al principio de la respuesta, en menor número y son de menor magnitud, sobre todo en su componente bradicardico (Fig. 29, B y D *i-iii*; y F *i y ii*). Como durante los estímulos de hipercapnia, en la asfixia los EBT también están acoplados a la respiración, cada 7-8 ciclos respiratorios se genera un EBT coincidiendo con el inicio de la fase de inspiratoria en los estímulos combinados al 12% de CO₂ (Fig. 29, E y F *iii*).

La secuencia de los intervalos cardiacos dentro de cada EBT sigue una dinámica compleja que varía en función de la concentración del CO₂, muy similar a la descrita en condiciones de hipercapnia en normoxia (cf., Fig. 23). En los ratones silvestres al 4% CO₂, la distribución de los intervalos cardiacos muestra un intervalo preferente corto, otro largo del doble de duración del anterior y un tercer pico intermedio entre ambos (Fig. 30, A-*i*); el correspondiente diagrama de Poincaré, en el que se correlaciona la duración de los intervalos sucesivos (RR_n - RR_{n+1}), muestra que al intervalo corto le siguen en la mayoría de las ocasiones intervalos más prolongados y menores del doble, que progresivamente retornan al valor del intervalo corto (Fig. 30, C-*i flechas a', b' y c'*), también se observan saltos del intervalo corto al doble de su duración y el retorno progresivo al valor del intervalo corto (Fig. 30, C-*i flechas a, b y c*). La distribución de los intervalos cardiacos con el

Figura 29. Mecanismos de acoplamiento cardiorrespiratorio durante la asfisia en los ratones P14 Cx36KO (rojo) vs. WT (azul): (I) Episodios de bradicardia transitoria (EBT). **A y B)** Registros crudos de la respiración (Vent.), de la actividad cardiaca (ECG) con sus correspondientes valores de frecuencia instantánea respiratoria (FR_i), cardiaca (FC_i) y el cociente FC_i/FR_i durante la hipoxia (8% O₂) con [CO₂] crecientes del 4%, 8% y 12% (i-iii) en un ratón WT y otro Cx36KO (A y B). **C-F)** Episodios de bradicardia transitoria; histogramas inter-episodios en función de la [CO₂]_{aire} (WT en C y Cx36KO en D), rasters de los EBT_s durante los estímulos de asfisia con el 12% de CO₂ (i) y los promedios de la FR_i y de la respiración (Vent.) respecto al inicio de los EBT_s (ii y iii) (WT en E y Cx36KO en F). Los EBT_s son más numerosos y regulares a medida que aumenta la [CO₂] en la mezcla de gases; en cada EBT la frecuencia disminuye primero bruscamente y luego retorna progresivamente hasta su valor basal, se inician acoplados a la inspiración cada 7-8 ciclos respiratorio; en los ratones Cx36KO el número de EBT_s y su amplitud son significativamente menores.

Figura 30. Dinámica de la secuencia de los latidos cardiacos dentro de cada EBTs inducidos por la asfixia en los ratones P14 WT (azul) y Cx36KO (rojo), A y B) Histogramas normalizados de los intervalos cardiacos a concentraciones crecientes de CO₂ con el 8% de O₂ (i-iii) (WT en A y Cx36KO en B) mostrando el intervalo preferente (flecha) y del doble y triple de su duración (cabezas de flecha) en A. C y D) Diagramas de Poincaré de los intervalos sucesivos (RR_n y RR_{n+1}); en los ratones WT, los intervalos de más corta duración se siguen de otros del doble o el triple de duración que posteriormente se acortan progresivamente (a→b→c), indicando el fallo o bloqueo en la conducción de uno o dos latidos sinusales y la posterior recuperación de la velocidad de conducción auricular; en los ratones Cx36KO este efecto de bloqueo en la conducción auricular está prácticamente ausente.

8% CO₂ muestra junto al intervalo control intervalos del doble de duración (Fig. 30, *A-ii punta de flecha*), que se corresponden con una secuencia de intervalos control-doble seguidos de intervalos que retornan progresivamente al valor del intervalo control (Fig. 30, *C-ii flechas a, b y c*), y en caso del estímulo al 12% de CO₂, a los intervalos cortos le siguen intervalos del triple de duración y a estos intervalos del triple o del doble duración, que finalmente retornan progresivamente al valor del intervalo control (Fig. 30, *C-iii flechas a, b y c*). Estos datos sugieren que durante los EBT que se generan en condiciones de hipoxia-hipercapnia, como en hipercapnia-normoxia, la conducción auriculoventricular se reduce primero bruscamente, provocando el retardo en la conducción de la onda P o un bloqueo completo de “alto grado”, por la ausencia de la conducción de una o dos ondas P sucesivas, seguido de una recuperación progresiva de la conducción con el consiguiente acortamiento de los sucesivos intervalos hasta recuperar su valor inicial. Por el contrario, en los ratones Cx36KO los EBT_s son mucho menos numerosos y de menor magnitud y la distribución de los intervalos cardiacos que es muy regular; en los diagramas de Poincaré la mayoría los intervalos sucesivos son de la misma duración, y solo algunos de ellos siguen la secuencia de corto-largo seguida de un acortamiento progresivo de los intervalos que caracteriza a los EBT_s (Fig. 30, *B y D i-iii*).

4.3.2.2. Sincronización de fase cardiorrespiratoria (CRPS).

En los ratones P14 silvestres no se observa una significativa sincronización de fase cardiorrespiratoria ciclo-a-ciclo, ni de los latidos cardiacos (R) dentro del ciclo respiratorio (I_n-I_{n+1}), ni de la respiración dentro del ciclo cardiaco (R_n-R_{n+1}) (Fig. 31, *A i-iii*). Por el contrario, en los ratones Cx36KO hay una marcada CRPS con un orden de enganche preferente 1:2 al 4% de CO₂, que se reduce de forma significativa con el 8% y desaparece con el 12% de CO₂ (Fig. 31, *A y B i-iii*); este grado de CRPS es significativamente menor que se produce en condiciones de hipercapnia-normoxia (Fig. 24, *A y B i-iii*). Consistentemente con la ausencia de CRPS, las distribuciones de las fases y de las cofases preferentes no muestran valores preferentes en los ratones P14 WT y los intervalos perturbados se agrupan alrededor del intervalo promedio pero también a valores de intervalo más prolongados, y del doble y el triple de duración que el intervalo promedio (Fig. 31, *C i-iii*). En el caso de los ratones Cx36KO solo durante el enganche 1:2 al 4% de CO₂, la distribución de las fases y de las cofases muestran valores preferentes intermedios (Fig. 31, *D i-iii*); con la concentración del CO₂, la duración de los intervalos cardiacos perturbados

Figura 31. (II) Sincronización de fase cardiorrespiratoria (CPRS) en asfisia en los ratones P14 WT (azul) y Cx36KO (rojo). A y B Rastros e histogramas de fase de los latidos cardiacos R_n, R_{n+1} ... dentro del ciclo respiratorio I_n-I_{n+1} (izda) y de las respiraciones I dentro del ciclo cardiaco R_n-R_{n+1} (dcha) para $[CO_2]$ crecientes en hipoxia (i-iii) en los ratones WT y Cx36KO (A y B). **C y D** Histogramas de fase (Φ) o intervalo R_nI y de la cofase de 1^{er} orden (Θ) o intervalo IR_n (i y ii) y curva $\Phi-\Theta$ (iii) (WT en C y Cx36KO en D). No se produce CPRS en los ratones WT; en los ratones Cx36KO hay una marcada CPRS con un orden de enganche preferente 1:2 al 4% de CO_2 , que se reduce de forma significativa con el 8% y desaparece con el 12% de CO_2 , y solo durante el enganche 1:2 al 4% de CO_2 , la distribución de las fases y de las cofases muestran valores preferentes intermedios.

aumenta ligeramente (Fig. 31, *D i-iii*). El efecto de “reseteo” de la fase del ciclo cardiaca con la respiración que ocurre en condiciones de hipercapnia en normoxia no se produce en condiciones de hipoxia-hipercapnia (*cf.*, Fig. 24, *D i-iii*).

4.3.2.3. Función de transferencia de las frecuencias respiratorio-cardiacas.

En los ratones P14 silvestres, la función de transferencia de las frecuencias respiratorio-cardiacas durante las respuestas a la hipoxia-hipercapnia es muy similar a la encontrada en hipercapnia-normoxia (Fig. 32, *A i-iii*; *cf.*, Fig. 25, *A i-iii*); en ambos casos está determinada por la importante variabilidad en el ritmo cardiaco que provocan los numerosos EBT mientras que el patrón respiratorio oscila de forma regular, como consecuencia de ello las relaciones de las frecuencias respiratorio-cardiacas varían continuamente saltando entre distintos órdenes de enganche; en el caso del estímulo combinado con 12% de CO₂ que se ilustra en la Fig. 32, durante los primeros EBT de menor amplitud que se producen al inicio de la respuesta la secuencia de los saltos entre enganches es 1:2-1:1-1:1-1:2 con la presencia enganches estables 1:2 entre los EBT_s sucesivos, pero a medida que aumenta la amplitud y la regularidad de los EBT_s la secuencia pasa a ser 1:2-1:0-1:1-1:1-1:1-1:2 sin segmentos interpuestos entre EBT_s (Fig. 32, *A b y c y C i-iii*). Por el contrario, la función de transferencia en los ratones Cx36KO con el 12% de CO₂ no está condicionada por los EBTs, dado su escaso número y su menor magnitud, pero tampoco tiene el perfil característico en “dientes de sierra” que ocurre en condiciones de hipercapnia-normoxia; en la condición basal de normoxia-normocapnia la frecuencia cardiaca está acoplada a la frecuencia respiratoria en una relación 1:3 con valores de fase y cofase estables durante el enganche; durante el inicio de la respuesta hipoxia-hipercapnia se produce un patrón de alternancia 1:2↔1:3 y cuando ya se ha estabilizado la respuesta 1:2↔1:1 (Fig. 32, *D i-iii*). La presencia de estos patrones de enganche inestables en hipoxia-hipercapnia contrasta con los enganches fase de orden 1:1 estables que se producen hipercapnia-normoxia (*cf.*, Fig. 25, *D i-iii*).

4.3.2.4. Oximetría pulso-a-pulso durante la asfixia.

Los EBT_s que se generan por la asfixia, como durante la hipercapnia-normoxia, producen una marcada modulación de la oximetría pulso-a-pulso; coincidiendo con la caída brusca de la frecuencia instantánea cardiaca al inicio de

Figura 32. Tránsito de frecuencias respiratorio-cardíacas durante la asfíxia en los ratones P14 Cx36KO vs. WT. A y B) Histogramas de los valores de frecuencia instantánea respiratoria (FR_i) en abscisas (i) y cardíaca (FC_i) en ordenadas (ii), y la correspondiente gráfica FR_i/FC_i (iii), en condiciones basales de normocapnia y normoxia (puntos azules, a) y durante la respuesta inicial y estabilizada a la asfíxia con 8% O_2 y 12% CO_2 (b y c) en los ratones WT y Cx36KO (A y B). **C y D)** Trazados seleccionados en normoxia-normocapnia (a) y durante la respuesta inicial y estabilizada a la asfíxia (b y c). La función de transferencia en el ratón WT es muy inestable por la generación rítmica de los EBTs como en hipercapnia-normoxia y en el ratón Cx36KO la transferencia durante la respuesta estabilizada tiene un valor intermedio entre las relaciones 1:2 y 1:1 como consecuencia del enganches inestable entre 1:1 $\leftrightarrow$ 1:2 que difiere del patrón de “dientes de sierra” observado en hipercapnia-normoxia (cf. Fig. 25).

los EBT_s el contenido de oxihemoglobina en el pulso arterial aumenta bruscamente y posteriormente, se va reduciendo progresivamente en paralelo al acortamiento de los siguientes intervalos cardiacos (Fig. 33, A *i-ii*). La correlación de la oximetría pulso-a-pulso con respecto a los EBT_s es significativamente mayor que con respecto a todos los latidos cardiacos (Fig. 33, A *ii-iii*), indicando que la modulación de la oximetría por los EBT_s contribuye de forma importante al valor promedio de la Sat_aO₂. Por el contrario, en los ratones Cx36KO no se produce el efecto modulador de los EBT_s sobre la oximetría dada la menor amplitud y el escaso número de EBT_s que se generan en estos ratones (Fig. 33, B *i y ii*). La oximetría de los pulsos también está modulada aunque más débilmente por la respiración; este tipo de modulación es algo mayor en los ratones Cx36KO que en los ratones WT (Fig. 33, A y B *v*).

En resumen, el principal mecanismo de acoplamiento entre la respiración y la actividad cardiaca en los ratones P14 WT en hipercapnia-hipoxia, como en hipercapnia-normoxia, son los episodios de bradicardia transitoria que se generan cada 7-8 ciclos respiratorios, y como tal determinan la función de transferencia de las frecuencias respiratorio-cardiacas y el patrón de la oximetría pulso-a-pulso; por el contrario, en los ratones Cx36KO los EBT_s ocurren de forma ocasional resultando funcionalmente irrelevantes y la CRPS respecto a la observada en condiciones de hipercapnia-normoxia está disminuida, y en vez de producirse enganches respiratorio-cardiacos estables con saltos entre los distintos órdenes de enganche, que dan lugar a una función de transferencia de frecuencias respiratorio-cardiacas en “diente de sierra”, los enganches en hipercapnia-hipoxia son inestables con un patrón de alternancia entre distintos órdenes de enganche mantenido en el tiempo.

4.3.3. Susceptibilidad de los ratones Cx36KO lactantes a sufrir muerte súbita por estrés respiratorio. Mecanismos fisiopatogénicos.

Todos los ratones P14 WT a los que se les sometió al estrés respiratorio por “asfixia” utilizando los estímulos combinados de hipoxia-hipercapnia del 4%, 8% y 12% sobrevivieron al protocolo (n=24). Sin embargo, en el caso de los ratones Cx36KO el porcentaje final de supervivencia fue del 59,22% (Fig. 34; n=29); con el estímulo combinado del 8% CO₂ sucumbieron el 22,55% y con el 12% CO₂ un 18,23% adicional. En este estudio también se ensayaron ratones heterocigotos para la delección del gen de la Cx36 (Cx36^{+/-}), que mostraron un porcentaje de

Figura 33. Oximetría pulso-a-pulso en asfixia ($8\% \text{O}_2$ y $12\% \text{CO}_2$) en los ratones P14 Cx36KO vs. WT. A y B) Raster de la respiración (Vent.), del ECG y de la oximetría pulso-a-pulso respecto al inicio de los episodios de bradicardia transitoria (EBT_i) (i); promedios de la oximetría respecto al inicio de los EBT_s (ii) y respecto al pulso cardíaco (R) (iii), y promedios de la ventilación y la oximetría respecto al inicio de la inspiración (iv y v) (WT en A y Cx36KO en B). En el ratón P14 WT los EBT_s generados por la asfixia ejercen un potente efecto modulador de la oximetría pulso-a-pulso que no ocurre en el ratón Cx36KO, sin embargo, la modulación de la oximetría con la respiración es mayor en el ratón Cx36KO.

supervivencia final del 55,42% (Fig. 34; $n=9$), muy similar al de los ratones Cx36KO homocigotos (Cx36^{-/-}).

La muerte súbita en los ratones P14 Cx36KO inducida por la hipoxia-hipercapnia con el 8% CO₂ ocurre a los $7,29 \pm 0,51$ min del inicio del estímulo y al 12% CO₂ a una latencia similar ($8,37 \pm 0,88$ min). La comparación de las respuestas cardiorrespiratorias de los ratones P14 Cx36KO que sucumben con las de los ratones WT y Cx36KO que sobreviven al protocolo de estrés respiratorio permite inferir cuál es la secuencia de eventos que conducen a la muerte súbita (Fig. 35). En un principio, los ratones Cx36KO P14 responden al estímulo combinado de hipoxia-hipercapnia con un mayor incremento promedio de la frecuencia y la amplitud respiratoria y una menor reducción en la frecuencia cardíaca promedio que los ratones controles (Fig. 35, *a* en *C i-iii*), pero no todos los ratones Cx36KO lograron mantener este mayor esfuerzo respiratorio hasta el final del estímulo, como ocurre en los ratones WT. Primero, la frecuencia respiratoria se va enlenteciendo y la amplitud respiratoria se va reduciendo progresivamente (Fig. 35, *b* en *C i-iii*) y aumentan los artefactos de movimientos que podrían corresponder a reacciones de “escape” (Fig. 35, *b* en *B*). A continuación, se produce un aumento de la amplitud respiratoria que se acompaña de un incremento de la frecuencia cardíaca (Fig. 35, *c* en *B* y *C i-iii*), que tampoco pueden mantenerse en el tiempo y finalmente, cesa completamente la actividad rítmica de la respiración (Fig. 35, *d* en *B* y *C i-iii*), esta parada respiratoria constituye el punto de no retorno, ya que la respiración no se vuelve a reiniciarse espontáneamente; la actividad cardíaca se enlentece bruscamente tras la parada respiratoria y cesa transcurridos varios minutos. En el caso de los ratones WT, que nunca sucumben en estas condiciones de estrés respiratorio, durante la asfixia se producen episodios transitorios de aumento de la amplitud respiratoria durante los cuales la actividad cardíaca se regulariza (Fig. 35, “As” en *A*) interpuestos entre periodos de menor amplitud ventilatoria durante los cuales la frecuencia cardíaca es muy irregular por los numerosos episodios de bradicardia transitoria.

En la Fig. 36 se muestran en mayor detalle los cambios que se producen en el patrón respiratorio durante la asfixia; en el caso de los ratones WT responden la hipoxia-hipercapnia con un patrón respiratorio cambiante en el que alternan segmentos de respiración de tipo “bifásico” (inspiración-espирación; I-E₁) de menor amplitud con otros con una respiración jadeante “trifásica” con un componente adicional de espiración activa E₂ (I-E₁-E₂) de mayor amplitud

Figura 34. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier de los ratones P14 WT y de los homocigotos y heterocigotos Cx36KO (+/+ y +/-) durante los protocolos de hipoxia-hipercapnia. Cx36 +/+ (azul), Cx36 +/- (verde), Cx36 -/- (rojo). Todos los ratones WT a los que se sometió al estrés respiratorio por "asfixia" utilizando los estímulos combinados de hipoxia-hipercapnia de 8% O₂ y 4%, 8% y 12% CO₂ sobrevivieron al protocolo completo (n=24); sin embargo, en el caso de los ratones homocigotos para la delección de la Cx36 (Cx36 -/-) solo sobrevivieron el 59,22% (n=12/29) y de los ratones heterocigotos (Cx36 +/-) el 55,42% (n=4/9) log-rank test (p<0,01).

Figura 35. Secuencia de acontecimientos que preceden a la muerte por estrés respiratorio en ratones P14 Cx36KO. **A y B)** Registros crudos de la respiración (Vent) y de la actividad ECG durante un protocolo de hipoxia-hipercapnia 8% CO_2 + 8% O_2 (WT en A y Cx36KO en B). **C)** Promedios superpuestos de la frecuencia respiratoria (FR), de la amplitud respiratoria normalizada (ΔAR) y de de la frecuencias cardiaca (FC) de los ratones WT ($n=24$ en azul) y de los ratones Cx36KO que no sucumben ($n=22$) y que sucumben ($n=7$) durante el protocolo (rojo y negro). Los ratones WT responden a la asfixia con un patrón respiratorio y cardiaco en el que se alternan periodos de mayor frecuencia respiratoria y menor amplitud ventilatoria durante los que la frecuencia cardiaca esta enlentecida y es muy irregular por la presencia de numerosos EBT_s con otros en los que la amplitud ventilatoria aumenta transitoriamente y la frecuencia cardiaca se acelera y se regulariza ("A_s" en A). Los ratones Cx36KO inicialmente responden con un mayor esfuerzo respiratorio y una frecuencia cardiaca más rápida y regular que no se puede mantener en el tiempo, la frecuencia respiratoria se reduce progresivamente hasta que finalmente se produce la parada respiratoria.

Figura 36. Comparación del patrón respiratorio durante la asfixia entre los ratones P14 WT (A) y los ratones Cx36 que no sucumben (B) y que sucumben (C) durante el estrés respiratorio. A-C Registros crudos de la ventilación respiratoria. Los ratones WT responden durante la asfixia con un patrón respiratorio alternante “bifásico” (inspiración-espирación; I-E1) y “trifásico” o “jadeante”, con un componente adicional de espiración activa E2 (I-E1-E2) (*flechas* en A); por el contrario en los ratones Cx36KO el patrón es siempre de tipo jadeante “trifásico”, muy regular, de alta frecuencia y amplitud ventilatoria (*flechas* en B y C); durante la fase E2 de la respiración va precedida por un aumento de la actividad EMG de la muscular abdominal (detalle en B). La fase del ciclo en la que ocurre E2 (Φ) es variable en los ratones WT (A), muy fija en los ratones Cx36KO que no sucumben (B) y aumenta progresivamente durante la exposición a la asfixia en los ratones Cx36KO que sucumben (C). **D** Diagrama del periodo del ciclo respiratorio en función de fase de E2; en los ratones Cx36KO que no sucumben la fase es fija y corta y el periodo es corto (*rojo*); en los ratones WT (*azul*) y Cx36KO que sucumben (*negro*) la fase es más variable observándose un progresivo incremento en la duración del periodo ciclo respiratorio con el incremento de la fase, que es significativamente mayor en los ratones Cx36KO ($p < 0,05$).

(Fig. 36, *A flechas*). Por el contrario, en los ratones lactantes Cx36KO el patrón respiratorio en condiciones de hipercapnia-hipoxia es siempre de tipo jadeante “trifásico”, muy regular, de alta frecuencia y amplitud ventilatoria (Fig. 36, *B flechas*); durante este patrón la espiración activa E2 tiende a ocurrir siempre al inicio de la fase post-inspiratoria de todos los ciclos respiratorios, produciendo un acortamiento sustancial de la duración de la fase de espiración pasiva (E1) y el aumento subsiguiente de la amplitud de la fase inspiratoria; en los ratones WT la fase en la que se produce la espiración activa dentro del ciclo respiratorio es mucho más variable, pudiéndose generarse en fases más largas de la espiración E1 e incluso coincidiendo con el inicio de la fase inspiratoria. En los ratones Cx36KO que no sucumben estas características del patrón respiratorio “trifásico” se mantienen hasta que finaliza el estímulo asfixiante; sin embargo, en los ratones que fallecen se observa un progresivo alargamiento o corrimiento de la fase de E2 dentro del ciclo, un aumento gradual de la amplitud y duración de la E2 y un progresivo enlentecimiento del periodo de oscilación ciclo respiratorio hasta que finalmente, cesa la actividad respiratoria. La gráfica en la que se relaciona la fase del ciclo respiratorio en la que ocurren las espiraciones forzadas E2 con el periodo de la respiración muestra una estrecha correlación entre ambos parámetros, en el sentido que a medida que aumenta la fase se incrementa más el periodo respiratorio; también muestra que la pendiente de la función de “reseteo” de fase del ciclo respiratorio por las E2 es significativamente mayor en los ratones Cx36KO que en los silvestres (Fig. 36, *D* en *negro* y *azul*); indicando un mayor efecto enlentecedor del ciclo respiratorio con el incremento de la fase en los ratones deficientes en Cx36, achacable a la mayor amplitud y duración de las espiraciones forzadas E2 en este grupo de animales. En los ratones Cx36KO que no sucumben, el patrón “trifásico” de la respiración se caracteriza por la ocurrencia de la espiración E2 en una fase corta y un periodo del ciclo respiratorio también corto que no varían durante todo el tiempo de exposición a la asfixia (Fig. 36, *D* en *rojo*).

En resumen, los ratones lactantes que carecen de la Cx36 tienen un riesgo elevado de sucumbir en condiciones de asfixia por un síndrome de muerte súbita de la infancia por parada respiratoria; en estos ratones los quimiorreflejos a la asfixia están exacerbados y los mecanismos de autorresucitación, como son la capacidad de generar los episodios de bradicardia transitoria y la de mantener en el tiempo el patrón respiratorio jadeante “trifásico”, están alterados.

V. DISCUSIÓN

Los ratones que carecen de forma constitutiva de la conexina 36 muestran durante el periodo postnatal y en la vida adulta un fenotipo respiratorio caracterizado por presentar alteraciones en la ritmicidad respiratoria, tanto en vigilia como en sueño NREM y REM, y por tener unos quimiorreflejos a la hipoxia y a la hipercapnia exacerbados y unos mecanismos de acoplamiento cardiorrespiratorio anormales. Además, la gran mayoría de los cambios madurativos que ocurren durante el desarrollo postnatal en los sistemas respiratorio y cardíaco están ausentes en los ratones Cx36-KO. Durante la lactancia, el riesgo de muerte súbita de la infancia por “asfixia” está significativamente aumentado y en la edad adulta estos ratones muestran una marcada fragmentación del ciclo vigilia-sueño con un incremento anormal en el número de apneas de sueño y una acidosis respiratoria crónica.

5.1. Alteraciones de la ritmicidad respiratoria en los ratones deficientes en la Cx36 neuronal.

El patrón rítmico de la respiración ya está bien desarrollado durante la lactancia en los ratones silvestres, que a esta edad se caracteriza por la presencia de una taquipnea fisiológica con una alta regularidad (Paton y Richter, 1995; Smith *et al.*, 1991). Por el contrario, en la mayoría de los ratones deficientes en la Cx36 el ritmo respiratorio está enlentecido y es más irregular, pero también en un reducido número de animales aparece un patrón respiratorio anormal tipo Cheyne-Stokes. Esta menor frecuencia y mayor irregularidad de la respiración podría estar reflejando la contribución del acoplamiento eléctrico entre las neuronas inhibitorias de los complejos preBötzinger y Bötzinger a la ritmogénesis respiratoria que comanda el patrón premotor inspiratorio (Smith *et al.*, 2009) (Fig. 1). En otras estructuras del SNC se ha podido establecer que el acoplamiento eléctrico entre redes de neuronas GABAérgicas contribuye a sincronizar sus descargas neuronales y actividad sináptica de la población neuronal (Galarreta y Hestrin, 2002); en los ratones Cx36KO en los que desaparece el acoplamiento eléctrico entre las neuronas inhibitorias, se produce un menor inhibición sináptica sobre la población de neuronas principales excitadores reduciendo su capacidad ritmogénica, como es el caso de la generación del ritmo gamma que en estos ratones está significativamente reducido (Hormuzdi *et al.*, 2001; Buhl *et al.*, 2003). De forma similar la ausencia de acoplamiento eléctrico entre las neuronas inhibitorias del centro respiratorio podría desincronizar y reducir la inhibición sináptica sobre las neuronas glutamatérgicas

con capacidad ritmogénica; la transmisión GABAérgica es importante en las redes respiratorias para regular las interacciones temporales de los patrones de descarga entre los distintos tipos grupos funcionales de neuronas respiratorias y su bloqueo farmacológico reduce la ritmicidad respiratoria, pero no se abole (Ramírez *et al.*, 2012). En este sentido es interesante mencionar que la aplicación de bloqueantes de canales intercelulares en el centro respiratorio produce un efecto depresor sobre el ritmo respiratorio (Elsen *et al.*, 2008; Rekling *et al.*, 2000).

La presencia del patrón de respiración anormal tipo Cheyne-Stokes en algunos ratones lactantes Cx36KO podría reflejar un mayor grado de incapacidad ritmogénica junto con un incremento de la sensibilidad al CO₂, que provoca el patrón de respiración exacerbada. La modulación de la amplitud ventilatoria durante la respiración Cheyne-Stokes se ha atribuido a un aumento anormal de la ganancia del quimiorreflejo a la hipercapnia (Malhotra y Owens, 2010). Este reflejo se origina en el NRT, que es el principal centro quimiorreceptor del CO₂ a nivel central, y que envía proyecciones excitadoras a las neuronas premotoras del GRPIrv (late-E) que comandan la contracción de musculatura espiratoria, y a las neuronas glutamatérgicas (pre-I/I) y GABAérgicas (early-I) del complejo ritmogénico preBötC, que a su vez de forma refleja inhibe la actividad del NRT (Smith *et al.*, 2009) (Fig. 1); este patrón de conectividad recíproca entre los complejos preBötzinger y Bötzinger y el NRT media el acoplamiento entre los osciladores inspiratorio y espiratorio en condiciones de hipercapnia para generar el patrón la respiración tipo jadeante o “trifásico”, con una fase adicional de la espiración E2 activa (I-E1-E2) (Lizuka y Fregosi, 2007; Burke *et al.*, 2015; Molkov *et al.*, 2010). Nuestros registros muestran que los cambios de baja a alta amplitud ventilatoria durante la respiración Cheyne-Stokes se corresponden con la transición de un patrón de respiración de tipo “bifásico” (I-E1) a uno “trifásico (I-E1-E2) (Fig. 6), como ocurre en los pacientes con respiración Cheyne-Stokes (Eckert *et al.*, 2007); este patrón inicia por una espiración E2 que tiende a ocurrir preferentemente al final de la fase pre-inspiratoria o de espiración pasiva E1 y que se sigue de un mayor esfuerzo inspiratorio; el orden de enganche que se establece entre los osciladores inspiratorio y espiratorio es 1:1 y la fase de enganche es variable; las espiraciones E2 que ocurren al final de E1 son las más eficaces en acortar el ciclo respiratorio y se siguen de inspiraciones de mayor amplitud, y las que ocurren en fases más largas, al inicio de la fase I, producen un mayor retardo del ciclo respiratorio y un menor incremento en la amplitud inspiratoria. Este efecto de dependencia de fase del efecto de E2 sobre el ciclo

respiratorio es similar al descrito durante los enganches 1:1 que se producen por la fotoestimulación fásica y a una frecuencia regular del NRT en vigilia y sueño NREM (Burke *et al.*, 2015). La presencia del patrón de Cheyne-Stokes en este grupo de ratones Cx36 podría deberse al incremento de la sensibilidad al CO₂ que muestran los ratones con este genotipo cuando son sometidos a concentraciones crecientes de CO₂ en el aire inhalado (Fig. 18), y que podría tener su origen en una menor inhibición refleja del NRT por las neuronas GABAérgicas (early-I) del complejo ritmogénico preBötC en ausencia de expresión de la Cx36.

En la vida adulta los ratones Cx36KO también muestran importantes alteraciones de la ritmicidad respiratoria (Fig. 13). La mayor frecuencia respiratoria que se produce en vigilia podría ser secundaria a la acidosis respiratoria que desarrollan estos ratones (Tabla 3). Durante sueño NREM se produce una disminución fisiológica de la frecuencia respiratoria que se ha atribuido a la reducción de las entradas excitadoras procedentes de distintas estructuras sobre el centro respiratorio y de los quimiorreceptores periféricos (Kubin, 2016; Li *et al.*, 1999), pasando la respiración a depender en estas condiciones más de su propia capacidad ritmogénica y de su regulación por el NRT (Li *et al.*, 1999; Burke *et al.*, 2015). La menor frecuencia respiratoria que muestran los ratones Cx36KO en NREM podría deberse a la disminución de la sensibilidad al CO₂ que ocurre en estos ratones en la edad adulta y probablemente también una capacidad ritmogénica reducida. El aumento de la frecuencia y de la variabilidad respiratoria es una característica del sueño REM (Aserinsky y Kleitman, 1953); en los ratones Cx36KO este incremento de la frecuencia y de la variabilidad está significativamente aumentado y se acompaña además de una importante reducción de amplitud de la ventilación dando lugar numerosas apneas (Fig. 14). La drástica disminución de la amplitud respiratoria que ocurre durante las apneas no es achacable a un menor tono muscular, ya que en estos ratones este está significativamente aumentado en comparación con los ratones silvestres; parece más probable que la arritmia respiratoria esté relacionada, dadas las alteraciones del sueño que muestran estos ratones, con un incremento anómalo de las aferencias procedentes de los núcleos colinérgicos de la protuberancia implicados en la generación del sueño REM (Scammell *et al.*, 2017). Un hallazgo original de este trabajo es que en los ratones Cx36KO la arquitectura del sueño está completamente fragmentada y no hay modulación circadiana (Figs. 11 y 12); aun cuando la duración total de los estadios de vigilia y sueño NREM y REM no cambia, su duración media está muy reducida

como consecuencia del incremento de las transiciones entre ellos. Esta inestabilidad conductual de los ratones Cx36KO podría atribuirse a distintas causas. Podría deberse a un defecto en la generación del ritmo circadiano, cuyo principal marcapasos radica en el núcleo supraquiasmático y cuyas neuronas están acopladas eléctricamente por la Cx36 en función del ciclo de luz-oscuridad; en los ratones Cx36KO el acoplamiento eléctrico desaparece, el grado de sincronización de las descargas neuronales disminuye y el ritmo circadiano está atenuado (Long *et al.*, 2005). La Cx36 también se expresa en otras estructuras que participan en el control del ciclo vigilia-sueño como es el núcleo reticular del tálamo en donde se generan los husos de sueño que contribuyen a estabilizar el sueño NREM (Zolnik y Connors, 2016); en los estudios *in vitro* en rodajas de ratones Cx36KO se ha observado que el acoplamiento eléctrico que sincroniza las descargas de las neuronas reticulares desaparece, sugiriendo que la generación de los husos de sueño *in vivo* podría estar alterada (Landisman *et al.*, 2002); la reducción que nosotros hemos observado de la potencia sigma (11-15 Hz) en sueño NREM es compatible con esta posibilidad. La Cx36 también se expresa en varios de los núcleos de la protuberancia que promueven el sueño REM, como son: los núcleos parafascicular (Pf), pedúnculo pontino (PPN), subcoeruleus y el locus coeruleus (LC), donde las neuronas GABAérgicas forman redes eléctricamente acopladas (García-Rill *et al.*, 2008; Rash *et al.*, 2007). La inyección de un agonista colinérgico directamente en el PPN activa a la región pontina anterior o subcoeruleus produciendo un aumento de las ondas ponto-geniculo-occipitales (PGO) y del número de apneas en REM (Radulovacki *et al.*, 2004). Un mecanismo similar podría explicar el incremento de apneas en sueño REM que hemos encontrado en los ratones Cx36KO. Los pacientes con la enfermedad de Parkinson, que tienen disminución de la neurotransmisión dopaminérgica, muestran una disminución de la actividad neuronal del locus coeruleus y subcoeruleus (Sasaki *et al.*, 2006; Shibata *et al.*, 2006), que se ha correlacionado con un tono muscular anormalmente aumentado durante el sueño REM (García-Lorenzo *et al.*, 2013), como el que presentan los ratones Cx36KO; en estos pacientes también se produce una disminución de la orexina y la arquitectura del sueño está desestructurada (Wienecke *et al.*, 2012). El ratón deficiente de orexina, que reproduce la narcolepsia en humanos, muestra una disminución de la duración media en todos los estadios de sueño, ausencia de modulación durante los periodos de luz-oscuridad, un aumento de la probabilidad de transición entre todos estadios de sueño y un número de apneas en REM anormalmente elevado

(Mochizuki *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2007). Las alteraciones del sueño en los ratones “knockout” para la orexina y para la Cx36, caracterizado en este trabajo, son muy similares sugiriendo que ambos modelos podrían compartir muchos de los mecanismos fisiopatogénicos que subyacen a las alteraciones en el control de los ciclos vigilia-sueño y sueño NREM-REM, con la única excepción del aumento de las transiciones de vigilia a sueño REM que caracterizan a la narcolepsia, que no se producen en el ratón Cx36KO.

El análisis de la actividad espectral del EEG en los ratones Cx36KO muestran durante vigilia una menor potencia delta cortical (1-4 Hz) que los ratones WT, durante el sueño NREM y REM una menor potencia del sigma cortical (11-15 Hz) y del theta hipocámpico (4-10 Hz), que junto a la reducción del ritmo gamma, previamente descrita *in vitro* e *in vivo* (Hormuzdi *et al.*, 2001; Buhl *et al.*, 2003) confirma y amplía la relevancia que tienen las redes neuronales GABAérgicas acopladas eléctricamente por la Cx36 en la generación de los distintos patrones rítmicos cerebrales.

Los ratones Cx36KO en la vida adulta desarrollan una acidosis respiratoria crónica parcialmente compensada por la función renal, con un incremento en sangre de la presión parcial del CO₂ y unos niveles de saturación arterial de O₂ dentro de la normalidad, probablemente como consecuencia de la policitemia y del aumento del hematocrito que se observa en estos ratones, y con un pH en el líquido cefalorraquídeo anormalmente acidificado. Este cuadro de acidosis respiratoria en los ratones adultos se asocia a una relativa taquicardia y taquipnea, que podrían ser secundarias a un aumento crónico del tono simpático provocado por el aumento número de episodios de desaturación de O₂ durante las apneas en sueño REM (Kazimierczak *et al.*, 2013).

5.2. Alteraciones en los quimiorreflejos y en los mecanismos de acoplamiento cardiorrespiratorio en los ratones lactantes deficientes en la Cx36 neuronal.

El centro respiratorio del tronco del encéfalo, además de generar la actividad marcapasos que confiere el automatismo a la respiración, se encarga también de sensor los niveles de CO₂/pH y O₂ y en función de ello modificar la frecuencia y la amplitud del patrón motor respiratorio para variar la tasa ventilatoria y mantener los niveles de O₂ y CO₂/pH sanguíneos. Estos reflejos que se inician a partir de la información procedente de los quimiorreceptores periféricos y centrales requieren de la coordinación de los sistemas respiratorio y cardiovascular; dicha coordinación está

mediada por los sistema nervioso simpático y parasimpático a través de distintos mecanismos de acoplamiento cardiorrespiratorio (Bartsch y Plamen, 2014).

Durante la lactancia y en condiciones de normoxia-normocapnia, los ratones WT y Cx36KO tienen un periodo de oscilación de la respiración que es significativamente mayor que el del ritmo cardiaco, sin embargo ambos ritmos llegan a engancharse durante algunos periodos de tiempo en una relación que varía entre 1:4, 1:3 y 1:2. En esta etapa de la vida el principal mecanismo de acoplamiento cardiorrespiratorio en los ratones silvestres es la arritmia sinusal respiratoria fundamentalmente mediado por la modulación respiratoria de la actividad vagal cardiaca (Harper *et al.*, 1978; Yasuma y Hayano, 2004). Por el contrario, en los ratones Cx36KO la RSA está muy reducida. En ambos grupos de ratones, la respiración tiende a ocurrir con una mayor probabilidad en una fase preferente del ciclo cardiaco y los latidos cardiacos en fases preferentes del ciclo respiratorio; en general, el inicio de la inspiración que ocurre en las fases cortas tienen un efecto enlentecedor ocurre en el intervalo perturbado y en el siguiente, y las que ocurren en fases largas producen un efecto de alargamiento sobre la duración del intervalo cardiaco siguiente al perturbado (Fig. 9). En los ratones Cx36KO se produce esa misma dependencia de fase pero el efecto de alargamiento sobre los intervalos cardiacos es significativamente menor, probablemente como consecuencia de una menor activación pulsátil vagal. Estos resultados también sugieren que la respiración produce un “reseteo” del ritmo cardiaco, como se ha descrito y analizado en detalle previamente mediante la estimulación eléctrica pulsátil y tetánica del nervio vago (Jalife *et al.*, 1983; Karemaker, 2015; Levy y Martin, 1981). La mayor y menor modulación de la frecuencia cardiaca durante el enganche de fase 1:3 en los ratones WT que en Cx36KO se correlaciona respectivamente con una mayor y menor RSA, sugiriendo que la RSA se produce por un mecanismo de “reseteo” de fase de la actividad cardiaca con el consiguiente establecimiento de los enganches en fase entre los el ritmo respiratorio y el cardiaco. En consonancia con el significado funcional atribuido a la RSA de optimizar el intercambio gaseoso a nivel pulmonar ajustando la perfusión vascular a ventilación pulmonar (Yasuma y Hayano, 2004), nuestros resultados de oximetría de pulso-a-pulso muestran que el pulso cardiaco con mayor contenido en oxihemoglobina es aquel que coincide temporalmente con la fase inspiratoria de la respiración, asumiendo que existe un ciclo de retraso entre la circulación pulmonar y la sistémica en donde se hace la medida de oximetría, y

que se corresponde con el intervalo de mayor duración, durante el cual el volumen de llenado ventricular aumenta y el volumen de eyección es mayor (Fig. 10).

El CO₂ es el estímulo más potente de la respiración; produce un incremento tónico de la frecuencia y de la amplitud respiratoria que aumenta con la concentración hasta alcanzar valores de saturación con el 12% de CO₂. Durante la lactancia en los ratones lactantes Cx36KO está respuesta respiratoria a la hipercapnia está exacerbada como consecuencia del aumento de la sensibilidad al CO₂ del ~93% respecto a los ratones WT de la misma edad (Figs. 17 y 19). El patrón motor de la respiración durante la hipercapnia en estos ratones es de tipo “trifásico” (I-E1-E2) de gran amplitud ventilatoria y muy regular, durante el cual los osciladores inspiratorio y espiratorio están enganchados en un orden 1:1 muy estable con una fase de enganche post-inspiratoria muy constante, que provoca un importante acortamiento de la duración de la fase de espiración pasiva (Fig. 36); en los ratones WT también se observa un patrón de respiración de tipo “trifásico” durante la hipercapnia pero menos estable y con un orden y fase de enganche más variable, sugiriendo que en los ratones Cx36KO se produce una mayor contribución de la activación por hipercapnia del NRT al patrón motor respiratorio (Molkov *et al.*, 2011). A nivel cardíaco, la hipercapnia induce una marcada arritmia sinusal en los ratones lactantes WT. Dicha arritmia sinusal es debida a una masiva descarga vagal fásica (*i.e.*, “tetánica”) que provoca una intensa bradicardia transitoria (EBT_s) que se repite con una frecuencia media de ~0.5 Hz; estos episodios son más regulares y de mayor magnitud a medida que aumenta la concentración del CO₂ y el tiempo de exposición al alto CO₂; en los ratones Cx36KO la generación de los EBT_s está significativamente atenuada. Este tipo de episodios de bradicardia, que no han sido descritos previamente, podrían tener su origen en las neuronas vagales cardíacas preganglionares (NPVc) del NA que controlan la actividad de nodo auricular y la conducción intranodal (Blinder *et al.*, 2007; Gatti *et al.*, 1996; Gilbey *et al.*, 1984; Sampaio *et al.*, 2014). Desconocemos los mecanismos circuitales que subyacen a la generación rítmica de los EBT_s pero nuestros resultados indican que su generación está acoplada a la respiración, ya que se produce un EBT cada aproximadamente 7-8 ciclos respiratorios en fase con el inicio de la inspiración. Los diagramas de Poincaré del patrón secuencial de los intervalos cardíacos indica que durante los EBT_s en los ratones WT se produce primero un bloqueo de la conducción auriculoventricular avanzado o de “alto grado”, por el fallo en la conducción de uno o dos latidos sinodales cardíacos consecutivos, seguido de recuperación gradual de la

velocidad de conducción (Zipes y Jalife, 2006); en el caso de los ratones Cx36KO, el grado de bloqueo de la conducción auriculoventricular que se produce durante los EBT_s es significativamente menor. Los EBT_s, como la RSA, podrían contribuir a optimizar la eficacia del intercambio gaseoso debido a que durante los EBT_s se produce una modulación la oximetría pulso-a-pulso cíclica cada 7-8 respiraciones; primero, el contenido de oxihemoglobina del bolo cardiaco se incrementa bruscamente por la mayor eficacia del intercambio gaseoso que resulta del aumento del volumen de eyección por la mayor duración del tiempo de llenado ventricular y de que en cada ciclo cardiaco se llegan a producir hasta dos respiraciones, y a continuación la oximetría en los sucesivos pulsos se reduce gradualmente.

En los ratones Cx36KO la coordinación cardiorrespiratoria durante la hipercapnia es sustancialmente distinta, ya que está mediada fundamentalmente por el mecanismo sincronización de fase, la CRPS; a bajas concentraciones mediante enganches de orden 1:2 y a más altas concentraciones de orden 1:1, que solo se interrumpen cuando ocasionalmente ocurre un EBT. Durante estos enganches se establece una estrecha correlación temporal entre la fase inspiratoria de las sucesivas respiraciones y generación de los latidos cardiacos (*i.e.*, fase-cofase); dicha relación viene definida por una función de “reseteo” de tipo excitador-inhibidor para fases cortas y largas respectivamente, que confiere a los enganches una mayor estabilidad dinámica en valores de fase intermedios (Fig. 24). Este efecto excitador-inhibidor sobre el ciclo cardiaco de la respiración podría tener su origen en las NPVc del NA que se silencian durante la fase inspiratoria (I) y la fase espiratoria E2, y que disparan más rápidamente en la fase post-inspiratoria E1 (Mendelowitz, 1999; Neff *et al.*, 2004) o por el efecto de compuerta (*i.e.*, “gating”) que se produce a través de la activación de los barorreceptores y quimiorreceptores periféricos, que ejercen un potente efecto excitador sobre las neuronas del NA durante la fase espiratoria E1 (Gilbey *et al.*, 1984). Como consecuencia del acoplamiento entre el oscilador respiratorio y el oscilador cardiaco la función de transferencia de las frecuencias durante la hipercapnia muestra un perfil en “dientes de sierra”; en condiciones basales la frecuencia cardiaca es el triple de la frecuencia respiratoria y a medida que aumentan los niveles de hipercapnia salta al doble, donde permanece hasta que de nuevo salta para igualarse a la frecuencia de la respiración en donde se mantiene en los niveles más altos de CO₂; con la descenso de los niveles de hipercapnia la función de transferencia sigue el recorrido inverso. Este tipo de comportamiento no lineal en la función de transferencia que se produce entre dos sistemas rítmicos lo

predice la teoría general de osciladores para las interacciones que tienen lugar entre un oscilador maestro que comanda a un oscilador esclavo (Winfree, 1980), que en nuestro caso se corresponderían respectivamente al oscilador respiratorio y al oscilador cardiaco. La función de transferencia de frecuencias en “dientes de sierra” que hemos observado nosotros en los ratones lactantes Cx36KO en condiciones de hipercapnia es similar a la que se obtiene estimulando las fibras eferentes cardiacas del nervio vago seccionado o cuando se estimula las aferencias vagales de los barorreceptores con un patrón de frecuencias de estimulación crecientes y decrecientes sobre la frecuencia cardiaca (Jalife *et al.*, 1983; Levy y Ziege, 1972). Funcionalmente, en el caso que nos ocupa, la medida de la oximetría pulso-a-pulso respecto al ciclo respiratorio muestra una estrecha correlación temporal entre el pulso de oximetría y la fase inspiratoria de la respiración, sugiriendo que el significado funcional de los enganches de fase es también la de optimizar la ventilación con la perfusión pulmonar, que llegaría a ser máxima cuando por cada inspiración se genera un único latido cardiaco, facilitándose así el aclaramiento del exceso de CO₂ sanguíneo.

El quimiorreflejo a la hipoxia también está alterado en los ratones P14 Cx36KO, ya que en estos ratones el fenómeno de adaptación a la hipoxia y la depresión post-hipoxia están significativamente atenuados (Fig. 15). Ambos fenómenos se han atribuido fundamentalmente al silenciamiento de las neuronas del NRT; esta reducción de la actividad del NRT se produce como consecuencia del efecto directo, que tiene la reducción del CO₂/alcalinización secundaria a la hiperventilación inducida por la hipoxia, y por vía refleja, por el aumento de las entradas inhibitorias procedentes del complejo preBötzinger cuyas neuronas se activan vigorosamente por las entradas procedentes desde los quimiorreceptores periféricos vía NTS (Basting *et al.*, 2015). En el caso de los ratones Cx36KO se produciría una menor reducción de la actividad de las neuronas del NRT cuando los niveles de CO₂ bajan por la mayor sensibilidad al CO₂ que tienen estos ratones, y que aportarían una mayor excitación a las neuronas del oscilador inspiratorio para mantener la frecuencia y la amplitud del patrón motor respiratorio.

Durante la hipoxia, el principal mecanismo de acoplamiento cardiorrespiratorio en los ratones lactantes silvestres y Cx36KO es la CRPS, ya que la RSA disminuye hasta prácticamente desaparecer. La reducción de la RSA y el aumento de la CRPS con la hipoxia se han descrito previamente (Yasuma *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2014). Los enganches que se producen durante la CRPS son de menor orden en los

ratones silvestres que en los Cx36KO (1:4 o 1:3 vs. 1:2), como consecuencia de la mayor adaptación de la frecuencia respiratoria con la hipoxia. En ambos casos, las relaciones temporales entre la respiración y los latidos cardiacos que se establecen durante estos enganches, permiten acoplar la perfusión pulmonar con la fase inhibitoria de la respiración en ausencia de RSA, contribuyendo con ello a optimizar el intercambio gaseoso.

5.3. Ausencia de los cambios madurativos en los sistemas respiratorio y cardiaco en los ratones deficientes en la Cx36 neuronal.

El patrón de expresión de la proteína Cx36 en los núcleos del centro respiratorio, como en otras estructuras del SNC, varía en función del desarrollo postnatal (Parenti *et al.*, 2000; Solomon, 2003); los niveles de expresión aumentan durante las primeras semanas del periodo postnatal (de P0 a P14) y posteriormente se reducen progresivamente a niveles significativamente menores en la vida adulta. Muchos de los cambios madurativos que hemos observado en los sistemas respiratorio y cardiaco de los ratones silvestres desde el día P14 a los 3 meses de edad no se producen en los ratones Cx36KO, sugiriendo que podrían estar relacionados con el cambio en los niveles de expresión de la Cx36 durante el desarrollo postnatal. Con la edad, en los ratones silvestres se produce un enlentecimiento fisiológico del ritmo respiratorio y cardiaco junto a una reducción de la distensibilidad vascular (Paton y Richter, 1995; Tomoto *et al.*, 2016), que no ocurren en los ratones Cx36KO; a este respecto cabe mencionar que los parámetros de ritmicidad respiratoria, cardiaca y de distensión vascular de los ratones lactantes que no expresan la Cx36 son similares a los de los ratones silvestres en la edad adulta, que tienen unos niveles de expresión de Cx36 significativamente reducidos. La misma reflexión se puede aplicar a los cambios madurativos de los quimiorreflejos a la hipoxia y la hipercapnia; los ratones silvestres adultos responden a la hipoxia, en vez de con el patrón fásico de los lactantes, con un patrón respiratorio fásico-tónico (Cross y Oppé, 1952), como lo hacen los ratones Cx36KO lactantes. Finalmente y en relación con el quimiorreflejo a la hipercapnia, el aumento fisiológico de la sensibilidad al CO₂ que ocurre con la edad en los ratones silvestres es similar a la sensibilidad al CO₂ que muestran los ratones Cx36KO lactantes. En conjunto, todas estas correlaciones sugieren claramente una relación causa-efecto con el nivel de expresión de la Cx36, una hipótesis que podría ser contrastada en

futuros experimentos mediante el incremento con técnicas lentivirales de los niveles de expresión de la Cx36 en los ratones silvestres adultos.

5.4. Síndrome de muerte súbita de la infancia.

El riesgo de muerte súbita desencadenada por estrés respiratorio está significativamente elevado durante la lactancia en los ratones deficientes en Cx36 (Fig. 34). Ninguno de los ratones silvestres murió cuando se le sometió al estímulo asfixiante consistente en una hipoxia del 8% de O₂ con combinaciones crecientes de hipercapnia al 4%, 8% y 12% de CO₂; sin embargo, un significativo porcentaje de los ratones Cx36KO homocigotos (Cx36^{-/-}) y heterocigotos (Cx36^{+/-}) para la delección de la Cx36 sucumbieron, sugiriendo que la reducción de los niveles de Cx36 eleva el riesgo de muerte súbita. En los ratones Cx36KO lactantes concurren los tres factores que contempla la hipótesis de “triple riesgo” de la etiopatogenia del síndrome de muerte súbita de la infancia (Filiano y Kinney, 1994): el periodo crítico en el desarrollo postnatal, el defecto intrínseco en el control cardiorrespiratorio y el factor extrínseco desencadenante.

Durante la lactancia los ratones Cx36KO tienen muchos de los defectos en el control de la respiración y la regulación del sistema nervioso autónomo que actualmente se consideran factores de riesgo en la patogénesis de la muerte súbita y el SIDS como son: la respiración tipo Cheyne-Stokes (Kelly, *et al.*, 1980), las apneas de sueño (Gami, *et al.*, 2013), una RSA respiratoria reducida (Franco, *et al.*, 2003), un aumento anormal de la CPRS (Katz *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2014) o una respuesta exacerbada al estrés respiratorio (García *et al.*, 2013). Además, en nuestros estudios hemos identificado un nuevo mecanismo de acoplamiento cardiorrespiratorio, los episodios rítmicos de bradicardia fásica (*i.e.*, los EBT_s) inducidos por hipercapnia que podrían constituir un potente mecanismo de autorresucitación, cuya generación está también significativamente alterada en los ratones Cx36KO.

Actualmente se reconoce que la “asfixia”, la combinación de hipoxia e hipercapnia que se produce cuando el infante duerme en posición de “cubito prono” y respira su propio aire exhalado con una alta concentración de CO₂ y empobrecido en O₂, es el principal desencadenante del SIDS (García *et al.*, 2013), y como tal fue el tipo de estrés respiratorio elegido en estos estudios de susceptibilidad al SIDS. En el protocolo experimental primero, se aplicaron por separado los estímulos hipoxia e hipercapnia y luego se combinaron ambos a las mismas concentraciones; ninguno

de los ratones silvestres ni de los ratones Cx36KO sucumbió cuando fueron sometidos a una hipoxia en normocapnia o a una hipercapnia en hipoxia, solo fallecieron los deficientes en Cx36 sometidos a un estímulo combinado de hipoxia con hipercapnia, indicando que la combinación de la hipoxia y la hipercapnia tiene un mayor efecto deletéreo. Las respuestas a los estímulos combinados difieren de las atribuidas a cada uno por separado; la asfixia produce un mayor estrés respiratorio con un mayor incremento de la frecuencia y la amplitud respiratoria que la hipercapnia en normoxia, sin la adaptación respiratoria o la marcada depresión por re-oxigenación que ocurren en hipoxia con normocapnia. También cambia sustancialmente la respuesta cardiovascular; durante la asfixia el efecto bradicárdico e irregularizador del ritmo cardíaco que producen los EBT_s por la activación intensa y repetitiva del vago que provoca la hipercapnia en normoxia están significativamente atenuados cuando se combina con la hipoxia. En los ratones Cx36KO el esfuerzo respiratorio durante la asfixia es aún mayor, la generación de los EBT_s está casi completamente abolida y se produce un significativo menor incremento de la distensibilidad vascular.

Respecto a los mecanismos fisiopatogénicos que desencadenan la muerte súbita en el modelo del ratón Cx36KO, la secuencia de acontecimientos que preceden a la parada respiratoria resulta muy informativa. Al inicio del estímulo asfixiante se activa el patrón de respiración jadeante “trifásico” (I-E1-E2), que se genera por las interacciones reciprocas entre el oscilador inspiratorio de los complejos preBötzinger, Bötzing y el oscilador espiratorio del NRT (Lizuka y Fregosi, 2007; Molkov *et al.*, 2010). En los ratones Cx36KO este patrón es muy regular, de alta frecuencia y amplitud ventilatoria, en un orden de enganche 1:1 con una fase de enganche muy estable post-inhibitoria; la frecuencia cardíaca está enlentecida pero es regular. El patrón motor respiratorio, en los ratones silvestres es por el contrario, predominantemente bifásico con ocasionales transiciones a un patrón jadeante “trifásico” en el que el enganche de fase entre los osciladores inspiratorio y espiratorio es menos estable y la fase de enganche más variable; mientras que el patrón la respiración es de tipo bifásico se producen frecuentes EBT_s, pero cuando el patrón de respiración se vuelve jadeante desaparecen los EBT_s y el ritmo cardíaco se acelera y se regulariza, tal como se ha observado que ocurre en los infantes sometidos a estrés respiratorio (Harper *et al.*, 2000). Como en los ratones silvestres los EBT_s persisten hasta el final de los estímulos y estos ratones nunca se mueren, la generación de EBT_s debe ser considerada como un

mecanismo de “autorresucitación” que permite mejorar el intercambio gaseoso, y que en combinación con la mayor distensibilidad vascular que se produce por el aumento de tono vagal podría contribuir a mantener la perfusión tisular. En el grupo de los ratones Cx36KO que sucumben, el patrón de respiración “trifásico” se va degradando progresivamente a medida que se prolonga la asfixia; primero, se produce un progresivo alargamiento de la fase del ciclo respiratorio en el que ocurre la espiración activa E2, la duración del ciclo respiratorio aumenta y la amplitud de fase inspiratoria disminuye hasta que finalmente, la fase de espiración aumenta en amplitud y duración, la amplitud de la inspiración se reduce aún más y la actividad rítmica respiratoria cesa completamente y de forma irreversible; en el momento que se produce la parada respiratoria, la frecuencia cardiaca cae bruscamente y finalmente, después de varios minutos la actividad cardiaca cesa. En base a estas observaciones podemos concluir que la muerte súbita en los ratones Cx36KO se produce primariamente por una parada respiratoria como consecuencia de una disfunción en el enganche de fase entre los osciladores inspiratorio y espiratorio. Al tratarse de dos osciladores que interactúan recíprocamente es difícil determinar en cuál de ellos radica la causa del alargamiento de la fase de enganche que conduce a la parada respiratoria. Podría deberse al progresivo silenciamiento por la hipoxia de la población de neuronas no-marcapasos y de las neuronas marcapasos tipo I_{CAN} , pero no de las tipo I_{NaP} del complejo preBötzinger (Peña *et al.*, 2004), reduciendo la amplitud y la frecuencia del oscilador inspiratorio, que de forma refleja disminuiría su efecto de inhibición sobre las neuronas de NRT, o podría deberse al progresivo incremento de la actividad de las neuronas del NRT en respuesta a la hipercapnia que de forma refleja produciría una masiva activación de la población de neuronas glutamatergicas e inhibitorias de complejos preBötzinger y preBötzinger suprimiendo la capacidad ritmogénica del oscilador inspiratorio. Previamente se ha propuesto que la actividad marcapasos de las neuronas I_{NaP} es esencial para la generación de la respiración jadeante y la prevención del SIDS; el bloqueo de los receptores 5-HT_{2A} para serotonina suprime la ritmicidad endógena de neuronas I_{NaP} (Peña y Ramirez, 2002), en ausencia de liberación endógena de serotonina el patrón de jadeo a nivel de redes se desaparece (Tryba *et al.*, 2006) y a nivel de animal intacto la depleción de la neuromodulación serotoninérgica en los núcleos del raphé mediante distintas estrategias experimentales, incrementa el riesgo de SIDS durante el periodo perinatal P9-P11 (Cummings *et al.*, 2011). En consonancia con estos resultados

preclínicos existen numerosas evidencias de alteraciones en la transmisión serotoninérgica en pacientes de SIDS (Kinney, 2005).

VI. CONCLUSIONES

1. La ausencia de expresión constitutiva de la Cx36 neuronal en el modelo del ratón “knockout” produce un fenotipo respiratorio que se caracteriza por alteraciones en la ritmicidad respiratoria, por unos quimiorreflejos exacerbados a la hipoxia y a la hipercapnia, por unos mecanismos de acoplamiento cardiorrespiratorio anormales y por desarrollar una acidosis respiratoria crónica.
2. En los ratones lactantes deficientes en Cx36 el patrón respiratorio es más lento y más irregular y en ocasiones presentan un patrón respiratorio anormal tipo Cheyne-Stokes; en los adultos, el ritmo respiratorio es más rápido en vigila, se enlentece más en sueño NREM y se irregulariza más en sueño REM llegando a provocar un numero anormalmente elevado de apneas, indicando que la expresión de la Cx36 es necesaria para la ritmicidad respiratoria.
3. Los quimiorreflejos a la hipoxia y la hipercapnia están exacerbados en los ratones lactantes Cx36KO como consecuencia respectivamente de una menor adaptación respiratoria a la hipoxia y una mayor sensibilidad al CO₂, sugiriendo que en estos ratones están alteradas las interacciones reciprocas excitatorio-inhibitorias entre el oscilador inspiratorio del complejo preBötzinger y el oscilador espiratorio del núcleo retrotrapeziodal.
4. Los coordinación entre los sistemas respiratorio y cardiovascular mediada por el sistema nervioso autónomo a nivel central también está alterada en los ratones lactantes deficientes en Cx36, hay menos arritmia sinusal respiratoria, mayor sincronización de fase de los latidos cardiacos dentro del ciclo respiratorio y se producen menos episodios de bradicardia transitoria en condiciones de hipercapnia, indicando que en estos ratones la actividad vagal está significativamente disminuida.
5. Los cambios fisiológicos que ocurren desde lactancia a la edad adulta en la ritmicidad respiratoria y cardiaca, en la distensibilidad vascular, en los quimiorreflejos a la hipoxia y la hipercapnia y en los mecanismos de acoplamiento cardiorrespiratorios no se producen en los ratones carentes de Cx36, sugiriendo que podrían estar relacionados con los cambios en los niveles de expresión de la Cx36 que ocurren durante la maduración postnatal del animal.
6. El riesgo de sucumbir por muerte súbita durante la infancia inducida por estrés respiratorio está significativamente elevado en los ratones homocigotos y

heterocigotos para la delección de la Cx36, sugiriendo que los altos niveles de expresión de la Cx36 que tienen lugar durante este periodo crítico de la vida ejercen un potente efecto protector sobre el síndrome de muerte súbita de la infancia.

7. En cuanto al factor desencadenante más frecuente del síndrome de muerte súbita de la infancia, la “asfixia”, se puede concluir que la combinación de hipoxia e hipercapnia produce un mayor efecto deletéreo que la hipoxia y la hipercapnia por separado. Dicho efecto deletéreo se atribuye a que la hipoxia ejerce una acción antagónica sobre la generación de dos mecanismos de “autorresucitación” inducidas por la hipercapnia, como son: el patrón de la respiración “trifásico” jadeante y los episodios transitorios de bradicardia, que no habían sido descritos previamente.
8. La muerte súbita en los ratones deficientes en Cx36 se produce primariamente por una parada respiratoria como consecuencia de una disfunción en el mecanismo de generación del patrón “trifásico” jadeante de la respiración por la interacción recíproca de los osciladores inspiratorio y espiratorio.
9. El ratón deficiente en Cx36 constituye un buen modelo preclínico para el esclarecimiento de los mecanismos fisiopatogénicos del síndrome de muerte súbita de la infancia y de las apneas de sueño, y para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en estas patologías.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, S., Coates, M., Stornetta, R. y Guyenet, P. (2013). Optogenetic stimulation of C1 and retrotrapezoid nucleus neurons causes sleep state-dependent cardiorespiratory stimulation and arousal in rats. *Hypertension* 61(4): 835-41.
- Ackerman, M. *et al.* (2001). Postmortem molecular analysis of SCN5A defects in sudden infant death syndrome. *JAMA* 286(18): 2264-9.
- Alexandre, C., Andermann, M. y Scammell, T. (2013). Control of arousal by the orexin neurons. *Curr Opin Neurobiol* 23(5): 752-759.
- Al-Ubaidi, M. *et al.*, (2000). Functional properties, developmental regulation, and chromosomal localization of murine connexin36, a gap-junctional protein expressed preferentially in retina and brain. *J Neurosci Res* 59(6): 813-26.
- Amiel, J. *et al.*, (2003). Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene *PHOX2B* in congenital central hypoventilation syndrome. *Nature Genetics* 33: 459 - 461.
- Anderson, T. *et al.*, (2016). A novel excitatory network for the control of breathing. *Nature* 536: 1-5.
- Anrep, G., Pascual, W. y Rossler, R. (1936). Respiratory variations of the heart rate. The reflex mechanism of the respiratory arrhythmia. *Proc Roy Soc London* 119: 191-217.
- Aserinsky, E. y Kleitman, N. (1953). Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science* 118: 273-274.
- Ayas, N., Brown, R. y Shea, S. (2000). Hypercapnia can induce arousal from sleep in the absence of altered respiratory mechanoreception. *Am J Respir Crit Care Med*. 162(3): 1004-8.
- Ballanyi, K., Douthail, J. y Brockhaus, J. (1996). Membrane potentials and microenvironment of rat dorsal vagal cells in vitro during energy depletion. *J Physiol* 495(3): 769-784.
- Bartsch, R. y Plamen, I. (2014). Coexisting forms of coupling and phase-transitions in physiological networks. *NDES 2014* 438: 270-287.
- Bartsch, R. *et al.*, (2012). Phase transitions in physiologic coupling. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(26): 10181-10186.
- Basting, T. *et al.*, (2015). Hypoxia Silences Retrotrapezoid Nucleus Respiratory Chemoreceptors via Alkalosis. *J Neurosci* 35(2): 527-543.
- Belluardo, N. *et al.*, (2000). Expression of connexin36 in the adult and developing rat brain. *Brain Res* 865(1): 121-38.
- Belluardo, N. *et al.*, (1999). Structure, chromosomal localization, and brain expression of human Cx36 gene. *J Neurosci Res* 57(5): 740-52.
- Belousov, A. y Fontes, J. (2013). Neuronal gap junctions: making and breaking connections during development and injury. *Trends Neurosci* 36(4): 227-36.
- Belykh, I. y Shilnikov, A. (2008). When weak inhibition synchronizes strongly desynchronizing networks of bursting neurons. *Phys Rev Lett* 101(7): 078102.
- Benarroch, E., Schmeichel, A., Low, P. y Parisi, J. (2003). Depletion of ventromedullary NK-1 receptor-immunoreactive neurons in multiple system atrophy. *Brain* 126(10): 2183-90.
- Berry, R. y Gleeson, K., 1997. Respiratory arousal from sleep: mechanisms and significance. *Sleep* 20(8): 654-75.
- Blakley, B. *et al.*, (2015). Elevated auditory brainstem response thresholds in mice with Connexin36 gene ablation. *Acta Otolaryngol* 135(8): 814-8.
- Blinder, K., Moore, C., Johnson, T. y Massari, J. (2007). Central control of atrio-ventricular conduction and left ventricular contractility in the cat heart: synaptic interactions of vagal preganglionic neurons in the nucleus ambiguus with neuropeptide Y-immunoreactive nerve terminals. *Auton Neurosci* 131: 57-64.
- Buhl, D. *et al.*, (2003). Selective impairment of hippocampal gamma oscillations in connexin-36 knock-out mouse *in vivo*. *J Neurosci* 23(3): 1013-8.
- Burke, P. *et al.*, (2014). Optogenetic stimulation of adrenergic C1 neurons causes sleep state-dependent cardiorespiratory stimulation and arousal with sighs in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 190(11): 1301-10.

- Burke, P. *et al.*, (2014). Optogenetic stimulation of adrenergic C1 neurons causes sleep state-dependent cardiorespiratory stimulation and arousal with sighs in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 190(11): 1301-1310.
- Burke, P. *et al.*, (2015). State-dependent control of breathing by the retrotrapezoid nucleus. *J Physiol* 593(13): 2909-26.
- Burke, P. *et al.*, (1985). Selective optogenetic stimulation of the retrotrapezoid nucleus in sleeping rats activates breathing without changing blood pressure or causing arousal or sighs. *J Appl Physiol* 118(12): 1491-1501.
- Carter, M. *et al.*, (2010). Tuning arousal with optogenetic modulation of locus coeruleus neurons. *Nat Neurosci* 13(12): 1526-1533.
- Chan, R. y Sawchenko, P. (1998). Organization and transmitter specificity of medullary neurons activated by sustained hypertension: Implications for understanding baroreceptor reflex circuitry. *J Neurosci* 18(1): 371-387.
- Chong, J. *et al.*, (2015). De novo mutations in *NALCN* cause a syndrome characterized by congenital contractures of the limbs and face, hypotonia, and developmental delay. *Am J Hum Genet* 96(3): 462-73.
- Condorelli, D. *et al.*, (1998). Cloning of a new gap junction gene (Cx36) highly expressed in mammalian brain neurons. *Eur J Neurosci*. 10(3): 1202-8.
- Connors, B. y Long, M., 2004. Electrical synapses in the mammalian brain. *Annu Rev Neurosci* 27: 393-418.
- Coote, J. (1982). Respiratory and circulatory control. *J Exp Biol* 100: 223-244.
- Cross, K. y Oppé, T. 1952. The effect of inhalation of high and low concentrations of oxygen on the respiration of the premature infant. *J Physiol* 117: 38-55.
- Cummings, K. *et al.*, (2011). Postnatal loss of brainstem serotonin neurones compromises the ability of neonatal rats to survive episodic severe hypoxia. *J Physiol* 589: 5247-56.
- Cummings, K. *et al.*, (2009). Sudden infant death syndrome (SIDS) in African Americans: polymorphisms in the gene encoding the stress peptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Acta Paediatr*. 98(3): 482-9.
- Daly, M. (1997). Peripheral arterial chemoreception and respiratory-cardiovascular integration. Monograph for the Physiological Society Oxford, UK: Oxford University Press.
- Deans, M. *et al.*, (2001). Synchronous activity of inhibitory networks in neocortex requires electrical synapses containing connexin36. *Neuron* 31: 477-85.
- Deuchars, S. (2007). Multi-tasking in the spinal cord 'sympathetic' interneurons work harder than we give them credit for?. *J Physio* 580(3): 723-9.
- Dreshaj, I., Haxhiu, M. y Martin, R. (1998). Role of the medullary raphe nuclei in the respiratory response to CO₂. *Respir Physiol* 111(1): 15-23.
- Eckert, D., Jordan, A., Merchia, P. y Malhotra, A. (2007). Central Sleep Apnea Pathophysiology and Treatment. *Chest* 131(2): 595-607.
- Elsen, F. *et al.*, (2008). Carbenoxolone induced depression of rhythmogenesis in the pre-Bötzinger Complex. *BMC Neurosci* 9(46): 1-11.
- Feldman, J. y Del Negro, C. (2006). Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm.. *Nat Rev Neurosci* 7(3): 232-42.
- Filiano, J. J. y Kinney, H. C. (1994). A perspective on neuropathologic findings in victims of the sudden infant death syndrome: the triple-risk model. *Biol Neonate* 65(4): 194-197 .
- Fraigne, J. y Orem, J. (2011). Phasic motor activity of respiratory and non-respiratory muscles in REM sleep. *Sleep* 34(4): 425-434.
- Fraklin, K. Y Paxinos, G. (2007). The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates Third Edition. New York: Elsevier Inc.
- Franco, P. *et al.*, (2003). Autonomic responses to sighs in healthy infants and in victims of sudden infant death. *Sleep Med* 4: 569-577.
- Galarreta, M., Erdélyi, F., Szabó, G. y Hestrin, S. (2004). Electrical coupling among irregular-spiking GABAergic interneurons expressing cannabinoid receptors. *J Neurosci* 24(44): 9770-8.

- Galarreta, M. y Hestrin, S. (2001). Electrical synapses between GABA-releasing interneurons. *Nat Rev Neurosci* 2(6): 425-33.
- Galarreta, M. y Hestrin, S. (2002). Electrical and chemical synapses among parvalbumin fast-spiking GABAergic interneurons in adult mouse neocortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(19): 12438-43.
- Gal, M. et al., (2016). A novel homozygous splice site mutation in *NALCN* identified in siblings with cachexia, strabismus, severe intellectual disability, epilepsy and abnormal respiratory rhythm. *Eur J Med Genet* 59(4): 204-9.
- Gami, A. et al., (2013). Obstructive Sleep Apnea and the Risk of Sudden Cardiac Death: A Longitudinal Study of 10,701 Adults. *J Am Coll Cardiol* 62(7): 1-17.
- García, A., Koschnitzky, J., y Ramirez, J. (2013). The physiological determinants of sudden infant death syndrome. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 189(2): 288-300.
- García-Lorenzo, D. et al., (2013). The coeruleus/subcoeruleus complex in rapid eye movement sleep behaviour disorders in Parkinson's disease. *Brain* 136(7): 2120-9.
- García-Rill, E. et al., (2008). The developmental decrease in REM sleep: The role of transmitters and electrical coupling. *Sleep* 31(5): p. 673-690.
- García-Rill, E. et al., (2007). Electrical coupling: novel mechanism for sleep-wake control. *Sleep* 30(11): 1405-14.
- Gatti, P., Johnson, T., y Massari, V. (1996). Can neurons in the nucleus ambiguus selectively regulate cardiac rate and atrio-ventricular conduction?. *J Auton Nerv Syst* 57(1-2): 123-127.
- Gilbey, M., Jordan, D., Richter, D. y Spyer, K. (1984). Synaptic mechanisms involved in the inspiratory modulation of vagal cardio-inhibitory neurones in the cat. *J Physiol* 356: 65-78.
- González-Nieto, D. et al., (2008). Regulation of neuronal connexin-36 channels by pH. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(44): 17169-74.
- Goridis, C. y Brunet, J., 2010. Central chemoreception: Lessons from mouse and human genetics. *Respiratory Physiology y Neurobiology*. 173: 312-321.
- Gourine, A. et al., (2010). Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science* 329: 571-575.
- Gourine, A., Machhada, A., Trapp, S. y Spyer, K. (2016). Cardiac vagal preganglionic neurones. *Auton Neurosci* 199: 24-8.
- Güldenagel, M. et al., (2001). Visual transmission deficits in mice with targeted disruption of the gap junction gene connexin36. *J Neurosci* 21(16): 6036-6044.
- Guyenet, P. y Abbott, S. (2013). Chemoreception and asphyxia-induced arousal. *Respir Physiol Neurobiol* 188(3): 333-43.
- Guyenet, P., Abbott, S. y Stornetta, R. (2013). The respiratory chemoreception conundrum: light at the end of the tunnel?. *Brain Res* 1511: 126-137.
- Guyenet, P. y Bayliss, D. (2015). Neural control of breathing and CO₂ homeostasis. *Neuron* 87(5): 946-961.
- Guyenet, P. et al., (2016). Proton detection and breathing regulation by the retrotrapezoid nucleus. *J Physiol* 594(6): 1529-1551.
- Guyenet, P., Filtz, T. y Donaldson, S. (1987). Role of excitatory amino acids in rat vagal and sympathetic baroreflexes. *Brain Res* 407(2):272-84.
- Guyenet, P. G. et al., (2013). Invited Review EB 2012: C1 neurons: The body's EMTs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 305(3): 187-204.
- Guyenet, P. y Mulkey, D. (2010). Retrotrapezoid nucleus and parafacial respiratory group. *Respir Physiol Neurobiol* 173(3): 244-55.
- Haldane, J. y Priestley, J. (1905). The regulation of the lung-ventilation. *J Physiol* 225-266.
- Harper, R., Kinney, H. y Thach, B. (2000). Sleep influences on homeostatic functions: implications for sudden infant death syndrome. *Resp Physiol* 119: 123-132.
- Harper, R. et al., (1978). Development of sinus arrhythmia during sleeping and waking states in normal infants. *Sleep* 1(1): 33-48.
- Hayano, J. et al., (1996). Respiratory sinus arrhythmia - phenomenon improving pulmonary gas exchange and circulatory efficiency. *Circulation* 94(4): 842-847.

- Hewitt, A. *et al.*, (2004). Ventilatory effects of gap junction blockade in the RTN in awake rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287(6): 1407-18.
- Heymans, C. y Neil, E. (1958). Reflexogenic Areas of the Cardiovascular. *System Boston: Little, Brown y Co* p.1-271.
- Hormuzdi, S. *et al.*, (2001). Impaired electrical signaling disrupts gamma frequency oscillations in connexin 36-deficient mice. *Neuron* 31(3): 487-95.
- Huang, R., Erlichman, J. y Dean, J. (1997). Cell-cell coupling between CO₂-excited neurons in the dorsal medulla oblongata. *Neuroscience* 80(1): 41-57.
- Huckstepp, R. *et al.*, (2010). Connexin hemichannel-mediated CO₂-dependent release of ATP in the medulla oblongata contributes to central respiratory chemosensitivity. *J Physiol* 588: 3901-3920.
- Jacobson, G. *et al.*, (2010). Connexin36 knockout mice display increased sensitivity to pentylenetetrazol-induced seizure-like behaviors. *Brain Res.* 1360: 198-204.
- Jalife, J., Slenter, V., Salata, J. y Michaels, D. (1983). Dynamic vagal control of pacemaker activity in the mammalian sinoatrial node. *Circ Res* 52: 642-656.
- Janczewski, W. y Feldman, J. (2006). Distinct rhythm generators for inspiration and expiration in the juvenile rat. *J Physiol* 570(2): 407-20.
- Javaheri, S. y Dempsey, J. (2013). Central sleep apnea. *Compr Physiol.* 3(1): 141-63.
- Kahn, A. *et al.* (1988). Polysomnographic studies of infants who subsequently died of sudden infant death syndrome. *Pediatrics* 82(5): 721-7.
- Karemaker, J. (2015). How the vagus nerve produces beat-to-beat heart rate variability; experiments in rabbits to mimic in vivo vagal patterns. *Journal of clinical and traslational research* 1(3): 190-204.
- Kasymov, V. *et al.*, (2013). Differential sensitivity of brainstem versus cortical astrocytes to changes in pH reveals functional regional specialization of astroglia. *J Neurosci* 33: 435-441.
- Katz, D. *et al.* (2015). Sudden infant death syndrome and residential altitude. *Pediatrics.* 135(6): 1442-9.
- Kazmierczak, A., Krzesiński, P., Krzyżanowski, K. y Gielerak, G. (2013). Sleep-Disordered Breathing in Patients with Heart Failure: New Trends in Therapy. *Biomed Res Int* 2013: 1-10.
- Kelly, D., Walker, A., Cahen, L. y Shannon, D., 1980. Periodic Breathing in Siblings of Sudden Infant Death Syndrome Victims. *Pediatrics* 66(4): 515-520.
- Kemp, B. Kamphuisen, H. (1986). Simulation of Human Hypnograms Using a Markov Chain Model. *Sleep* 9(3): 405-14.
- Kinney, H. (2005). Abnormalities of the Brainstem Serotonergic System in the Sudden Infant Death Syndrome: A Review. *Pediatric and Developmental Pathology* 8(5): 507-524.
- Kubin, L. (2016). Neural Control of the Upper Airway: Respiratory and State-Dependent Mechanisms. *Compr Physiol* 6(4): 1801-1850.
- Kumar, N. *et al.*, (2015). Physiology. Regulation of breathing by CO₂ requires the proton-activated receptor GPR4 in retrotrapezoid nucleus neurons. *Science* 348(6240): 1255-60.
- Landisman, C. *et al.*, (2002). Electrical synapses in the thalamic reticular nucleus. *J Neurosci* 22: 1002-1009.
- Lange, R. y Hecht, H. (1962). The mechanism of Cheyne-Stokes respiration. *J Clin Invest* 41(1): 42-52.
- Lavezzi, A. *et al.*, (2012). Developmental alterations of the respiratory human retrotrapezoid nucleus in sudden unexplained fetal and infant death. *Auton Neurosci* 170(1-2): 12-19.
- Lazarenko, R., Stornetta, R., Bayliss, D. y Guyenet, P. (2011). Orexin A activates retrotrapezoid neurons in mice. *Respir Physiol Neurobiol* 175(2): 283-7.
- Leung, R. y Bradley, T. (2003). Respiratory modulation of heart rate and blood pressure during Cheyne-Stokes respiration. *J Electrocardiol* 36: 213-7.

- Levy, M. y Martin, P. (1981). Neural regulation of the heart beat. *Ann Rev Physiol* 43: 443-53.
- Levy, M. y Ziege, H. (1972). Synchronization of the cardiac pacemaker with repetitive stimulation of the carotid sinus nerves in the dog. *Circulation Research* 30: 634-641.
- Li, A. y Nattie, E. (2010). Antagonism of rat orexin receptors by almorexant attenuates central chemoreception in wakefulness in the active period of the diurnal cycle. *J Physiol* 588(15): 2935-44.
- Li, A., Randall, M. y Nattie, E. (1999). CO₂ microdialysis in retrotrapezoid nucleus of the rat increases breathing in wakefulness but not in sleep. *Journal of Applied Physiology*. 87(3): pp. 910-919.
- Lieske, S., Thoby-Brisson, M., Telgkamp, P. y Ramirez, J. (2000). Reconfiguration of the neural network controlling multiple breathing patterns: eupnea, sighs and gasps. *Nat Neurosci* 3(6): 600-7.
- Lizuka, M. y Fregosi, R. (2007). Influence of hypercapnic acidosis and hypoxia on abdominal expiratory nerve activity in the rat. *Respir Physiol Neurobiol* 175(2): 196-205.
- Loeschcke, H. (1982). Central chemosensitivity and the reaction theory. *J Physiol* 332: 1-24.
- Long, M., Deans, M., Paul, D. y Connors, B. (2002). Rhythmicity without Synchrony in the Electrically Uncoupled Inferior Olive. *J Neurosci* 22(24): 10898-905.
- Long, M., Jutras, M., Connors, B. y Burwell, R. (2005). Electrical synapses coordinate activity in the suprachiasmatic nucleus. *Nat Neurosci* 8(1): 61-6.
- Lu, B. et al., (2007). The neuronal channel NALCN contributes resting sodium permeability and is required for normal respiratory rhythm. *Cell* 129(2): 371-83.
- Malhotra, A. y Owens, R. (2010). What is central sleep apnea?. *Respir Care* 55(9): 1168-78.
- Mandel, D. y Schreihöfer, A. (2006). Central respiratory modulation of barosensitive neurones in rat caudal ventrolateral medulla. *J Physiol* p. 881-896.
- Mathewson, K. et al., (2014). Reduced respiratory sinus arrhythmia in adults born at extremely low birth weight: evidence of premature parasympathetic decline?. *Int J Psychophysiol* 93(2): 198-203.
- McAllen, R. y Spyer, K. (1978). The baroreceptor input to cardiac vagal motoneurons. *J Physiol* 282: 365-374.
- McKay, L., Janczewski, W. y Feldman, J. (2005). Sleep-disordered breathing after targeted ablation of preBötzinger complex neurons. *Nat Neurosci* 8(9): 1142-4.
- McTigue, D., y Hermann, G. (1997). Effect of pancreatic polypeptide on rat dorsal vagal complex neurons. *J Physiol* 499(2): 475-83.
- Meigh, L. et al., (2013). CO₂ directly modulates connexin26 by formation of carbamate bridges between subunits. *eLIFE* 2(e01213): 1-13.
- Mendelowitz, D. (1999). Advances in parasympathetic control of heart rate and cardiac function. *News Physiol Sci* 14: 155-161.
- Mochizuki, T. et al., (2004). Behavioral State Instability in Orexin Knock-Out Mice. *J Neurosci* 24(28): 6291-300.
- Molkov, Y. I. et al., (2010). Late-expiratory activity: emergence and interactions with the respiratory CPG. *J Neurophysiol* 104: 2713-2729.
- Molkov, Y. I. et al., (2011). Intermittent hypoxia-induced sensitization of central chemoreceptors contributes to sympathetic nerve activity during late expiration in rats. *J Neurophysiol* 105(6): 3080-3091.
- Mulkey, D. et al., (2004). Respiratory control by ventral surface chemoreceptor neurons in rats. *Nature Neuroscience* 7: 1360-1369.
- Nakamura, A. y Kuwaki, T. (2003). Sleep apnea in mice: useful animal model for study of SIDS. *J Early Human Development* 75: S167-S174.
- Nakamura, A. et al., (2007). Vigilance state-dependent attenuation of hypercapnic chemoreflex and exaggerated sleep apnea in orexin knockout mice. *J Appl Physiol* 102(1): 241-8.

- Narita, N. *et al.*, (2001). Serotonin transporter gene variation is a risk factor for sudden infant death syndrome in the Japanese population. *Pediatrics* 107(4): 690-2.
- Natarajan, M. y Morrison, S. (2002). Sympathoexcitatory CVLM neurons mediate responses to caudal pressor area stimulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279(2): 364-R374.
- Nattie, E. (2001). Central chemosensitivity, sleep, and wakefulness. *Respiration Physiology* 129: 257-268.
- Neff, R., Simmens, S., Evans, C. y Mendelowitz, D. (2004). Prenatal nicotine exposure alters central cardiorespiratory responses to hypoxia in rats: Implications for sudden infant death syndrome. *J Neurosci* 24(42):9261-8.
- Nichols, N. *et al.*, (2008). Intrinsic chemosensitivity of individual nucleus tractus solitarius (NTS) and locus coeruleus (LC) neurons from neonatal rats. *Adv Exp Med Biol* 605: 348-52.
- Nobuta, H. *et al.*, (2015). Dysregulation of locus coeruleus development in congenital. *Acta Neuropathol* 130: 171-183.
- Onimaru, H. y Homma, I. (1987). Respiratory rhythm generator neurons in medulla of brainstem-spinal cord preparation from newborn rat. *Brain Res* 403(2): 380-4.
- Onimaru, H. y Homma, I. (2003). A novel functional neuron group for respiratory rhythm generation in the ventral medulla. *J Neurosci* 23(4): 1478-86.
- Orem, J., Lovering, A., Dunin-Barkowski, W. y Vidruk, E. (2000). Endogenous excitatory drive to the respiratory system in rapid eye movement sleep in cats. *J Physiol* 527(2): 365-376.
- Oyamada, Y. *et al.*, (1999). Locus coeruleus neurones in vitro: pH-sensitive oscillations of membrane potential in an electrically coupled network. *Respir Physiol* 118(2-3): 131-47.
- Parenti, R., Gulisano, M., Zappala, A. y Cicirata, F. (2000). Expression of connexin36 mRNA in adult rodent brain. *Neuroreport* 11(7): 1497-1502.
- Park, W. *et al.*, (2011). Interplay of chemical neurotransmitters regulates developmental increase in electrical synapses. *J Neurosci* 31(16): 5909-20.
- Paton, J. y Dutschmann, M. (2002). Central control of upper airway resistance regulating respiratory airflow in mammals. *J Anat* 201(4): 319-323.
- Paton, J. y Richter, D. (1995). Role of fast inhibitory synaptic mechanisms in respiratory rhythm generation in the maturing mouse. *Journal of Physiology* 484(2): 505-521.
- Peña, F., Parkis, M., Tryba, A. y Ramirez, J. (2004). Differential Contribution of Pacemaker Properties to the Generation of Respiratory Rhythms during Normoxia and Hypoxia. *Neuron* 43(1): 105-117.
- Peña, F. y Ramirez, J. (2002). Endogenous activation of serotonin-2A receptors is required for respiratory rhythm generation in vitro. *J Neurosci* 22(24): 11055-64.
- Pereda, A. *et al.*, (1998). Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II mediates simultaneous enhancement of gap-junctional conductance and glutamatergic transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(22): 13272-7.
- Pineda, J., Ruiz-Ortega, J. y Ugedo, L. (1997). Receptor reserve and turnover of alpha-2 adrenoceptors that mediate the clonidine-induced inhibition of rat locus coeruleus neurons in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 281(2): 690-8.
- Pizarro-Delgado, J. *et al.* (2014). Inhibition of connexin 36 hemichannels by glucose contributes to the stimulation of insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 306(12): 1354-66.
- Plant, L. *et al.*, (2006). A common cardiac sodium channel variant associated with sudden infant death in African Americans, SCN5A S1103Y. *J Clin Invest* 116(2): 430-5.
- Poets, C., Meny, R., Chobanian, M. y Bonofiglio, R. (1999). Gasping and other cardiorespiratory patterns during sudden infant deaths. *Pediatr Res* 45: 350-354.
- Porges, S. (1995). Cardiac Vagal Tone: A Physiological Index of Stress. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 19(2): 225-233.
- Powley, T. (2000). Vagal circuitry mediating cephalic-phase responses to food. *Appetite* 34: 184-188.

- Radulovacki, M., Pavlovic, S., Saponjic, J. y Carley, D. (2004). Modulation of reflex and sleep related apnea by pedunculo-pontine tegmental and intertrigeminal neurons. *Respiratory Physiology y Neurobiology* 143: 293-306.
- Ramirez, J. *et al.*, (2012). The cellular building blocks of breathing. *Comprehensive Physiology* 2: 2683-2731.
- Ramirez, J. *et al.*, (2013). Central and peripheral factors contributing to obstructive sleep apneas. *Respir Physiol Neurobiol* 189(2): 344-53.
- Rash, J. *et al.*, (2007). Identification of connexin36 in gap junctions between neurons in rodent locus coeruleus. *Neuroscience* 147(4): 938-56.
- Rekling, J. y Feldman, J. (1997). Bidirectional electrical coupling between inspiratory motoneurons in the newborn mouse nucleus ambiguus. *J Neurophysiol* 78(6): 3508-10.
- Rekling, J., Shao, X. y Feldman, J. (2000). Electrical Coupling and Excitatory Synaptic Transmission between Rhythmogenic Respiratory Neurons in the PreBötzinger Complex. *J Neurosci* 20(23): 1-12.
- Rybak, A. *et al.*, (2007). Spatial organization and state-dependent mechanisms for respiratory rhythm and pattern generation. *Prog Brain Res* 165: 201-220..
- Saito, Y. *et al.*, 2006. Dysphagia-gastroesophageal complex: complications due to dysfunction of solitary tract nucleus-mediated vago-vagal reflex. *Neuropediatrics* 37: 115-120.
- Sally, A. B. *et al.* (2012). Hypoxic and Hypercapnic Events in Young Infants During Bed-sharing. *Pediatrics* 130(2): 237-44.
- Sampaio, K., Mauad, H., Spyer, M. y Ford, T. (2014). Chronotropic and dromotropic responses to localized glutamate microinjections in the rat nucleus ambiguus. *Brain Res* 1542(100): 93-103.
- Sasaki, M. *et al.*, (2006). Neuromelanin magnetic resonance imaging of locus ceruleus and substantia nigra in Parkinson's disease. *Neuroreport* 17:1215-8.
- Scammell, T., Arrigoni, E. y Lipton, J., 2017. Neural Circuitry of Wakefulness and Sleep. *Neuron* 93(4): 747-765.
- Schock, S., Leblanc, D., Hakim, A. y Thompson, C. (2008). ATP release by way of connexin 36 hemichannels mediates ischemic tolerance *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 368: 138-144.
- Schreihofer, A. y Guyenet, P. (2003). Baroactivated neurons with pulse-modulated activity in the rat caudal ventrolateral medulla express GAD67 mRNA. *J Neurophysiol* 89(3): 1265-77.
- Schreihofer, A. M. y Guyenet, P. G. (1997). Identification of C1 presympathetic neurons in rat rostral ventrolateral medulla by juxtacellular labeling in vivo. *J Comp Neurol* 387(4):524-36.
- Schreihofer, A. y Sved, A. (2011). The Ventrolateral Medulla and Sympathetic Regulation of Arterial Pressure. In: Llewellyn-Smith IJ, Verberne AJ, editors. Central Regulation of Autonomic Functions. New York: Oxford University Press 78-97.
- Schwartz, P. *et al.*, (2001). Molecular diagnosis in a child with sudden infant death syndrome. *The Lancet* 358(9290): 1342-1343.
- Schwartz, P. *et al.*, (2000). A molecular link between the sudden infant death syndrome and the long-QT syndrome. *N Engl J Med* 343(4): 262-7.
- Schwarzacher, S., Rüb, U. y Deller, T. (2011). Neuroanatomical characteristics of the human pre-Bötzinger complex and its involvement in neurodegenerative brainstem diseases. *Brain* 134(1): 24-35.
- Shibata, E. *et al.*, (2006). Age-related changes in locus ceruleus on neuromelanin magnetic resonance imaging at 3 Tesla. *Magn Reson Med* 5:197-200.
- Shykoff, B., Naqvi, S., Menon, A. y Slutsky, A. (1991). Respiratory sinus arrhythmia in dogs. Effects of phasic afferents and chemostimulation. *J Clin Invest* 87(5):1621-1627.
- Smith, J. C. *et al.*, (1991). Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* 254(5032): 726-9.

- Smith, J., Abdala, A., Rybak, I. y Paton, J. (2009). Structural and functional architecture of respiratory networks in the mammalian brainstem. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364(1529): 2577-87.
- Spedicato, G. (2015). markovchain: an R package to easily handle discrete Markov chains. R package version 0.2 2.
- Söhl, G., Degen, J., Teubner, B. y Willecke, K. (1998). The murine gap junction gene connexin 36 is highly expressed in mouse retina and regulated during brain development. *FEBS Lett* 428(1-2): 27-31.
- Solà-Soler, J., Giraldo, B., Fiz, J. y Jané, R. (2015). Cardiorespiratory phase synchronization in OSA subjects during wake and sleep states. Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC): 2015 37th Annual International Conference of the IEEE 7708-7711.
- Solomon, I. (2003). Connexin36 distribution in putative CO₂-chemosensitive brainstem regions in rat. *Respiratory Physiology y Neurobiology* 139(1): 1-20.
- Solomon, I. y Dean, J., 2002. Gap junctions in CO₂-chemoreception and respiratory control. *Respir Physiol Neurobiol* 131(3): 155-73.
- Stephenson, R., Famina, S., Caron, A., Lim, J. (2013). Statistical properties of sleep-wake behavior in the rat and their relation to circadian and ultradian phases. *Sleep* 36(9): 1377-1390.
- Srinivas, M. et al., (1999). Functional properties of channels formed by the neuronal gap junction protein connexin36. *J Neurosci* 19(22): 9848-55.
- Sun, Q., Goodchild, A. y Pilowsky, P. (2001). Firing patterns of pre-Bötzinger and Bötzing neurons during hypocapnia in the adult rat. *Brain Res* 903(1-2): 198-206.
- Tan, W. et al., (2008). Silencing preBötzinger complex somatostatin-expressing neurons induces persistent apnea in awake rat. *Nat Neurosci* 11(5): 538-40.
- Thoby-Brisson, M. et al., (2009). Genetic identification of an embryonic parafacial oscillator coupling to the preBötzinger complex. *Nat Neurosci* 12(8): pp. 1028-35.
- Tomori, Z. et al., (2010). Distinct generators for aspiration and expiration reflexes: localization, mechanisms and effects. *J Physiol Pharmacol* 61(1): 5-12.
- Tomoto, T., Maeda, S. y Sugawara, J. (2016). Influence of blood flow velocity on arterial distensibility of carotid artery in healthy men. *J Physiol Sci* 67(1):191-196.
- Trapp, S., Lückermann, M., Brooks, P. y Ballanyi, K. (1996). Acidosis of rat dorsal vagal neurons in situ during spontaneous and evoked activity. *J Physiol* 496(3): 695-710.
- Tryba, A., Peña, F. y Ramirez, J. (2006). Gasping activity in vitro: a rhythm dependent on 5-HT_{2A} receptors. *Journal of Neuroscience* 26(10): 2623-2634.
- Urschel, S. et al., (2006). Protein kinase A-mediated phosphorylation of connexin36 in mouse retina results in decreased gap junctional communication between All amacrine cells. *J Biol Chem* 281(44): 33163-71.
- Van Der Giessen, R. et al., (2008). Role of olivary electrical coupling in cerebellar motor learning. *Neuron* 58(4): 599-612.
- Van Norstrand, D. et al., (2012). Connexin43 mutation causes heterogeneous gap junction loss and sudden infant death. *Circulation* 125(3): 474-81.
- Wang, S. et al., (2013). Phox2b-Expressing Retrotrapezoid Neurons are Intrinsically Responsive to H⁺ and CO₂. *J Neurosci* 33(18): 7756-7761.
- Wenker, I., Kréneisz, O., Nishiyama, A. y D., M. (2010). Astrocytes in the Retrotrapezoid Nucleus Sense H⁺ by Inhibition of a Kir4.1–Kir5.1-Like Current and May Contribute to Chemoreception by a Purinergic Mechanism. *J Neurophysiol* 104(6): 3042–3052.
- Wienecke, M. et al., (2012). Progressive dopamine and hypocretin deficiencies in Parkinson's disease: is there an impact on sleep and wakefulness?. *J Sleep Res* 21(6): 710-7.
- Williams, R. et al., (2007). Control of hypothalamic orexin neurons by acid and CO₂. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(25): 10685-90.
- Winfree, A. T. (1980). The geometry of biological time. New York: Springer.
- Yasuma, F. y Hayano, J., 2004. Respiratory sinus arrhythmia why does the heartbeat synchronize with respiratory rhythm?. *Chest* 125(2): 683-690.

- Yasuma, F., Hirai, M. y Hayano, J. (2001). differential effects of hypoxia and hypercapnia on respiratory sinus arrhythmia in conscious dogs. *Jpn Circ J* 65: 738-742.
- Yeh, S. *et al.*, (2017). Respiratory Network Stability and Modulatory Response to Substance P Require NalcN. *Neuron* 94(2): 294-303.
- Zhang, D., She, J., Zhang, Z. y Yu, M. (2014). Effects of acute hypoxia on heart rate variability, sample entropy and cardiorespiratory phase synchronization. *BioMedical Engineering* 13(73): 1-12.
- Zipes, D. y Jalife, J. (2006). Cardiac Electrophysiology. 4 th ed. New York: Elviesier Inc.
- Zolnik, T. y Connors, B. (2016). Electrical synapses and the development of inhibitory circuits in the thalamus. *J Physiol* 594(10): 2579-92.