

### UN MODELO ANFIBIO PARA EL ESTUDIO EVOLUTIVO DEL CONTROL RESPIRATORIO

ANPHIBIAN MODEL STUDY FOR EVOLUTIONARY RESPIRATORY CONTROL

Eduardo Cuestas\*, José Bas\*

#### RESUMEN

Los enormes progresos de la medicina perinatal han permitido la sobrevivencia de recién nacidos prematuros en estadios de desarrollo cada vez más precoces. Estos pequeños pacientes requieren de medios muy sofisticados y costosos para paliar su inmadurez respiratoria. Además de las complicaciones asociadas al desarrollo pulmonar, la inestabilidad respiratoria y las apneas asociadas a la inmadurez de los circuitos nerviosos productores del control respiratorio, contribuyendo éstos últimas, como factor principal de morbilidad, a las prolongadas hospitalizaciones que presenta esta tan vulnerable población. Éstos imperativos médicos combinados a la curiosidad fisiológica han contribuido al desenvolvimiento de novedosas investigaciones en neurobiología respiratoria. Si bien la mayoría de los trabajos realizados en éste campo utilizan a los muridos como modelos experimentales, las investigaciones recientes efectuadas a partir del tronco cerebral aislado de anfibios (*Rana catesbeiana*) han revelado las ventajas técnicas de este modelo animal, para mostrar los principales fenómenos que rigen el funcionamiento y el desarrollo del sistema de control respiratorio entre los vertebrados. El presente artículo se propone repasar los avances más recientes realizados en la investigación de la neurobiología evolutiva del control

respiratorio, prestando una atención particular, a la respiración episódica, así como al rol que desempeñan la modulación serotoninérgica y Gabaérgica de la actividad respiratoria en el curso del desarrollo.

**Palabras clave:** *Rana catesbeiana*; neurobiología evolutiva; control respiratorio

#### ABSTRACT

Recent perinatal advances have made possible that premature newborns survive increasingly in earlier developmental stages. This babies requires sophisticated and costly critical intensive care to address the problems associated with immaturity of the respiratory system. In addition respiratory instability and apnea reflecting immaturity of the respiratory control system are major causes of morbidity and prolonged hospitalization in this highly vulnerable group of patients. These concerns have contributed to the development of research in respiratory evolutionary neurobiology. While the majority of researchers working in this field use rodents as an animal model, recent research using *in vitro* brainstem preparations from bullfrog (*Rana catesbeiana*) have revealed the technical advantages of this model to study the basic principles underlying respiratory control and its ontogeny between vertebrates. The

---

Fecha de envío: 1 julio de 2007 • Fecha de aceptación: 3 de agosto de 2007

Dirección postal: Dr. Eduardo Cuestas. Servicio de Pediatría y Neonatología. Hospital Privado. Naciones Unidas 346. X5016KEH Córdoba. Tel.: 54-351-4688226 Fax.: 54-0351-4688286. E-mail: ecuestas@hospitalprivadosa.com.ar

\*Servicio de Pediatría y Neonatología. Hospital Privado. Centro Formador: Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.

present article review the recent advances in the area of research with special interest on episodic breathing and the role of serotonergic and GABAergic modulation of respiratory control during development.

**Key words:** evolutionary neurobiology; bullfrog; respiratory control

## INTRODUCCIÓN

La aparición de la respiración aérea constituyó una etapa sumamente importante en la evolución de los vertebrados. Los anfibios aparecieron probablemente a partir de los peces lobulados (ripidistios de agua dulce), hace 360 millones de años, y se convirtieron en los primeros animales de vida terrestre. Este medio más rico en oxígeno, les permitió explorar nuevos hábitat y favoreció la aparición de nuevas especies. A pesar de la distancia filogenética entre los primeros anfibios y el hombre, ambas especies deben controlar los niveles de ventilación pulmonar a fin de asegurar la homeostasis de los gases sanguíneos. El sistema de control de la ventilación requiere de estructuras sensoriales periféricas integradas por efectores situados en el sistema nervioso central. En el curso de la ontogenia tuvieron lugar una serie de acontecimientos ligados al desarrollo del pulmón, que siguieron una secuencia precisa, a fin de asegurar el suceso de la transición entre la respiración acuática y la aérea, tanto en el anfibio como en el hombre.

En el feto humano, el ultrasonido, ha permitido demostrar que los primeros movimientos respiratorios pueden ser detectados desde la undécima semana de gestación (1,2).

En ese estadio los movimientos respiratorios fetales son irregulares y episódicos. Si bien no participan en el intercambio gaseoso, esos movimientos contribuyen al desarrollo del pulmón y al desenvolvimiento de las conexiones sinápticas que constituirán los circuitos respiratorios. La frecuencia de los movimientos respiratorios fetales aumentará en el curso de la gestación y devendrá continua y rítmica en el momento del nacimiento a término(3). En consecuencia el perfil respiratorio de un prematuro será irregular y episódico, y la importancia de esa irregularidad será determinada por el momento en el cual el desarrollo intrauterino es interrumpido.

## DISTINTOS MODELOS EXPERIMENTALES EN NEUROBIOLOGÍA EVOLUTIVA DEL CONTROL RESPIRATORIO

Una proporción importante del progreso científico es atribuible a los numerosos estudios efectuados en mamíferos, incluidos el cordero, la rata, el gato y el ratón, donde los científicos lograron avances diversos y complejos, por ejemplo el registro de los movimientos respiratorios fetales en el cordero, que requirió intervenciones quirúrgicas importantes sostenidas por costosas infraestructuras.

Los circuitos nerviosos que rigen el control respiratorio fueron puestos en evidencia en forma directa y a un nivel organizacional muy reducido, por vía del registro electrofisiológico *in vitro* sobre preparaciones de tronco cerebral aislado. La técnica de abordaje fue desarrollada por Adrian en 1931 a partir del encéfalo de la carpa dorada(4) (*Cyprinus carpio*), y consiste en colocar el tronco cerebral aislado en una cámara enriquecida con solución de oxígeno y una composición iónica y nutritiva similar al líquido cefalorraquídeo. De este modo es posible estudiar la actividad de las neuronas respiratorias en forma sistemática gracias a los registros electrofisiológicos intra o extracelulares, según el tipo de estudio, permitiendo por ejemplo, el estudio de trocos cerebrales aislados de ratas recién nacidas(5).

Lamentablemente la ausencia de perfusión vascular es un factor limitante en este tipo de preparados, especialmente porque el aporte de oxígeno y el desecho de metabolitos, en particular  $CO_2$  e  $H^+$ , se realiza solamente por difusión, por lo cual es muy posible que ocurra hipoxia y acidosis tisular que perturbe el funcionamiento de las neuronas respiratorias. La actividad respiratoria producida por estas preparaciones puede permanecer estable por unas horas a condición de que el tronco cerebral sea mantenido a una temperatura más baja que la normal, entre 25 y 28°C. Cuando se trata de animales recién nacidos la tolerancia de los circuitos nerviosos a la hipoxia es mucho mayor.

A pesar del refinamiento de estos modelos mamíferos, las limitaciones, especialmente la relativamente corta vida útil de los preparados, han impuesto la necesidad de crear nuevos modelos experimentales tanto alternativos, como complementarios.

Como todos los poiquiloterms, las ranas manifiestan una tolerancia a la hipoxia y a la acidosis muy superior a la de los mamíferos.

Además temperaturas ambientes de hasta menos 20°C, son fisiológicamente normales entre los éstos anúridos. Consecuentemente la viabilidad de la actividad respiratoria en los preparados *in vitro* provenientes del tronco cerebral de *Rana catesbeiana* es remarcable, pues se pueden mantener estables y activos durante días.

La simplicidad y fortaleza del sistema nervioso central de esta especie, permite la realización de estudios más adecuados de la materia en estudio, que entre los mamíferos, ya que tanto las consideraciones técnicas, como los resultados de las investigaciones han demostrado que a pesar de las diferencias propias de la mecánica respiratoria, las estructuras y los principios fundamentales del control respiratorio, se han mantenido en el curso de la evolución.

### PRODUCCIÓN DEL RITMO RESPIRATORIO DURANTE EL CURSO DEL DESARROLLO

El ritmo respiratorio de los mamíferos es producido por un grupo de neuronas situadas dentro del tronco cerebral a nivel del complejo pre-Bötzinger (6). Los mecanismos de funcionamiento de esos circuitos son materia de intensa controversia, según se considere que dichas neuronas producen el ritmo respiratorio mediante un sistema de relaciones inhibitorias, o por la existencia de mecanismos ritmo génicos intrínsecos (marcapaso respiratorio), o finalmente por una combinación de ambas hipótesis(7).

Las investigaciones realizadas recientemente sobre tronco cerebral aislado *in vitro* de renacuajo han permitido efectuar importantes avances, ya que este modelo permite la realización de estudios electrofisiológicos en todos los estadios de desarrollo de estos animales. Los primeros movimientos destinados a utilizar el aire como sustrato respiratorio aparecen esporádicamente en el renacuajo durante el estadio premetamórfico, aunque la contribución de los pulmones en desarrollo al proceso respiratorio es todavía despreciable. La actividad respiratoria aumentará progresivamente a medida que las branquias vayan desapareciendo durante el proceso de la metamorfosis(8,9).

Los estudios electrofisiológicos sugieren que el funcionamiento de las neuronas productoras del ritmo respiratorio, sufren importantes

cambios durante el curso del desarrollo, progresando desde una acción de marcapaso hacia un proceso de acción en red, que requiere inhibición sináptica(10). Esta transición, implica una etapa fundamental en la maduración de los circuitos respiratorios, como ha sido ya observado en fetos de rata(11,12).

Otras modificaciones que suceden en el seno de la organización de las neuronas responsables del ritmo respiratorio, posibilitan el desarrollo de diferentes familias de neurotransmisores (aminoácidos, monoaminas) que actúan modulando el sustrato de importantes cambios bioquímicos que ocurren a lo largo del desarrollo, contribuyendo a la maduración del sistema de control respiratorio(13).

La reorganización de la neurotransmisión inhibitoria Gabaérgica contribuirá a la emergencia de la respiración aérea, pues en los preparados *in vitro* de renacuajos jóvenes, la inactivación farmacológica de los receptores GABA, ha permitido observar la toma del comando motor por las redes neuronales productoras de la respiración pulmonar, en estadios precoces donde aún predomina la respiración branquial(14). Éstos resultados sugieren que los mecanismos responsables de la respiración pulmonar son funcionales aún en estadios muy precoces, pero se encuentran sometidos aparentemente, a una influencia inhibitoria que lo mantiene aquiescente durante el desarrollo, hasta que llega el momento madurativo preciso y adecuado para iniciar la respiración pulmonar y la vida terrestre (15).

Hace relativamente poco tiempo se ha estudiado el rol de la modulación serotoninérgica en la maduración de la actividad respiratoria. El efecto que ejerce la serotonina (5HT) sobre el comando respiratorio varía sustancialmente durante el curso del desarrollo(16,17). Del encéfalo aislado proveniente de renacuajos premetamórficos, la activación química o eléctrica del núcleo del rafe dorsal, un área que abriga uno de los principales grupos de neuronas serotoninérgicas del tronco encefálico, aumenta el número de respiraciones pulmonares. Dichos resultados sugieren que la modulación serotoninérgica de la actividad respiratoria se difumina en el curso del desarrollo a medida que la respiración aérea o pulmonar aumenta en importancia(18). Es quizá posible entonces, que exista una interacción entre ambos sistemas (serotoninérgico y Gabaérgico), que juegue un rol importante durante la emergencia y la maduración de la respiración aérea.

## RESPIRACIÓN PARADOJAL

La naturaleza episódica, intermitente o paradójal del flujo motor respiratorio es una característica de la actividad producida por el tronco encefálico aislado de los anfibios. Es importante mencionar que la respiración episódica no refleja necesariamente un funcionamiento anormal del sistema de control de la respiración, es más representa una propiedad fundamental de los circuitos respiratorios de los vertebrados. Este perfil respiratorio, comúnmente observado entre los reptiles y los anfibios, también se ve en ciertos mamíferos capaces de reducir sustancialmente sus requerimientos metabólicos (hibernación), minimizando así sus demandas de intercambio gaseoso y sus necesidades de oxígeno, gracias a la presencia de la grasa parda(19,20). La respiración episódica no es entonces un artefacto experimental, porque el encéfalo aislado de la rana produce un comando respiratorio prácticamente igual al perfil observado en el animal intacto(21). La respiración episódica es también observada en las preparaciones *in vitro* de rata, tanto en el feto como en el recién nacido (13).

La similitud entre el perfil de respiración episódica de los anfibios y la que se observa entre los recién nacidos prematuros humanos es remarcable, e indica que el modelo experimental planteado, ofrece una excelente aproximación para el estudio de la respiración episódica del prematuro, un tipo de irregularidad respiratoria que puede ocupar hasta un 20% del tiempo de sueño en esa población(22).

Los resultados de estudios efectuados en fetos de cordero como entre los renacuajos sugieren que una deficiencia global de la activación de los circuitos respiratorios es la base de este perfil respiratorio irregular, puesto que una estimulación efectuada mediante la inducción de hipercapnia (aumento de la pCO) logra un perfil respiratorio casi continuo, donde la duración de las apneas es reducida en forma notable(21,23,24).

En la rana adulta la región mesencefálica del istmo cerebral juega un rol crítico en la producción del perfil respiratorio episódico. En efecto, la inactivación o la ablación química de esas neuronas produce un patrón respiratorio lento, episódico, poco sensible a la hipercapnia, muy similar al que se observa en los renacuajos premetamórficos(25). La función y el carácter

neurofisiológico de esas neuronas permanece hasta hoy inexplorados.

Los mecanismos responsables del perfil respiratorio episódico son aún poco conocidos. Sin embargo, la neurotransmisión Gabaérgica jugaría un rol importante en este tipo de respiración, porque la activación de receptores GABA por la aplicación del agonista baclofeno en el tronco cerebral aislado convierte un perfil respiratorio episódico en un perfil regular y continuo, sin poder actuar sobre la frecuencia respiratoria(26,27). En el animal intacto, tal cambio del perfil respiratorio reduce las oscilaciones de la pO<sub>2</sub> y de la pCO<sub>2</sub> arteriales en forma sustancial. El baclofeno es un análogo estructural del neurotransmisor inhibitorio ácido gammaaminobutírico (GABA), que actúa principalmente a nivel espinal y supraespinal, realizando un bloqueo polisináptico aferente y en forma menos extensa, también bloquea las vías aferentes monosinápticas. Aún no se sabe con exactitud si se comporta como un inhibidor *per se*, o hiperpolarizando las terminales aferentes primarias, inhibiendo la liberación de neurotransmisores excitatorios tales como el glutamato y el ácido aspártico, comportándose como un GABA agonista, estimulando los receptores GABA-B, disminuyendo el influjo excitatorio en las neuronas motoras alfa. Hasta ahora se ha utilizado como un relajante muscular, y en pacientes con espasticidad y esclerosis múltiple, mejora la movilidad, disminuye el espasmo, la frecuencia y severidad del espasmo, alivia el dolor y mejora la presencia de *clonus*.

Los mecanismos que controlan la activación de las señales Gabaérgicas constituyen una de las pistas más prometedoras en la investigación futura del control respiratorio, al igual que la dilucidación de los genes que controlan las funciones autonómicas de la respiración(28).

## A MODO DE CONCLUSIÓN

A la luz de las investigaciones recientes que muestran las diversas etapas del desarrollo perinatal de los circuitos respiratorios de los mórvidos son comparables a los que presentan los anfibios, es claro que los procesos neurobiológicos ligados a la maduración de ese sistema homeostático vital que ha sido conservado a lo largo del curso evolutivo de los vertebrados. En consecuencia los estudios efectuados en la rana toro, deberían contribuir a acrecentar los conocimientos en neurobiología

respiratoria, a fin de desarrollar nuevas terapias que faciliten la maduración del comando respiratorio y la reducción de la frecuencia de las apneas entre los recién nacidos prematuros.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Jansen AH, Chernick V. Development of respiratory control. *Physiol Rev* 1983;63:437-83.
2. Jansen AH, Chernick V. Foetal breathing and development of control of breathing. *J Appl Physiol* 1991;70:1431-46.
3. Mortola JP. Respiratory physiology of newborns mammals: a comparative perspective. Baltimore: The Jhon Hopkins University Press, 2001:344 p.
4. Adrian ED, Buytendik FJJ. Potencial changes in the isolated brain stem of the goldfish. *J Physiol (Lond)* 1931;71:121-35.
5. Suzue T. Respiratory rhythm generation in the in vitro brain stem-spinal cord preparation of neonatal rat. *J Physiol(Lond)* 1984;354:173-83.
6. Cuestas E, Cáceres A, Palacio S. Modelos animales de lesión y reparación del cerebro en desarrollo. *Medicina (Buenos Aires)* 2007; 67: 177-182.
7. Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, et al. Pre-Bötzinger complex: A brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* 1991;254:173-183.
8. Feldman JL. Neural control of breathing. In: Squire LR, Bloom LE, McConnell SK, eds. *Fundamental Neurocience*. Amsterdam, New York: Academic Press;2003:967-90.
9. Burggren WW, Doyle M. Ontogeny of regulation of gill and lung ventilation in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Resp Physiol* 1986;66:279-91.
10. Burggren WW, Pinder AW. Ontogeny of cardiovascular and respiratory physiology in lower vertebrates. *Annu Resp Physiol* 1991;53:107-35.
11. Winmill RE, Hedrick MS. Developmental changes in the modulation of respiratory rhythm generation by extracellular K<sup>+</sup> in the isolated bullfrog brainstem. *J Neurobiol* 2003; 55: 278-7.
12. Di Pasquale E, Monteau R, Hilaire G. Involvement of the rostral ventro-lateral medulla in respiratory rhythm genesis during the perinatal period: an *in vitro* study in newborn and foetal rats. *Brain Res* 1994;78: 243-52.
13. Hilaire G, Duran B. Maturation of the mammals respiratory system. *Physiol Rev* 1999; 79: 325-60.
14. Viemari JC, Burnet H, Bevingut M, Hilaire G. Perinatal maturation of the mouse respiratory rhythm generator: *in vivo* and *in vitro* studies. *Eur J Neurosci* 2003; 17: 1233-44.
15. Straus C, Wilson RJ, Remmers JE. Developmental desinhibition: turning off inhibition turns on breathing in vertebrates. *J Neurobiol* 2000;45: 75-83.
16. Broch L, Morales RD, Sandoval AV, Hedrick MS. Regulation of the respiratory central pattern generator by chloride-dependent inhibition during development in the bullfrog (*Rana catesbeiana*). *J Exp Biol* 2002, 205:1161-9.
17. Belzile O, Gulemetova R, Kinhead R. Role of 5-HT<sub>2A/C</sub> receptors in serotonergic modulation of respiratory motor output during tadpole development. *Resp Physiol Neurobiol* 2002; 133: 277-82-
18. Kinkehead R, Belzile O, Gulematova R. Serotonergic modulation of respiratory motor output during tadpole development. *J Appl Physiol* 2002;93: 936-46.
19. Belzile O, Gulematova R, Kinkehead R. Stage-dependent effect of raphe neuron stimulation on fictive lung ventilation in *Rana catesbeiana*: role of 5HT<sub>2</sub> receptors. *FASEB J* 2003; 17: A422.
20. Milsom WK. Control and coordination of gas exchange in air breathers ; chapter 10. Berlin-New York: Springer Verlag, 1990: 34-400.
21. Milsom WK. Intermittent breathing in vertebrates. *Annu Rev Physiol* 1991; 53:88-105.
22. Kinkehead R, Milsom WK. Chemoreceptors and control of episodic breathing in the bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Respir Physiol* 1994;95:87-105.
23. Kainicka I, Diaz V, Darion D, Praud JP. Coordination between glottic adductor muscle and diaphragm EMG activity in foetal lambs *in utero*. *J Appl Physiol* 1998; 84: 1560-5.
24. Kinkehead R, Milsom WK. Role of pulmonary stretch receptors feedback in control of episodic breathing in the bullfrog. *Am J Physiol* 1997;272:R497-508.
25. Kinkehead R, Harris MB, Milsom WK. The role of the *nucleus isthmi* in respiratory pattern formation in bullfrog. *J Exp Biol* 1997; 200: 1781-93.
26. Straus C, Wilson RJ, Tezenas du Montcel S, Remmers JE. Baclofen eliminates cluster

lung breathing of the tadpole brainstem *in vitro*.  
*Neurosci Lett* 2000; 292: 13-6.

27. Yost CS. A new look at the respiratory stimulant doxapram. *CNS Drug Rev* 2006; 12: 236-49.

28. Gaulier C, Trana H, Douger S, Gallego J. Pediatric disorders with autonomic dysfunction: what the role for PHOX2B? *Pediatr Res* 2005; 58: 1-6.