

11281

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.**  
**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

13

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN  
CIENCIAS PRESENTA:**

**EL MEDICO CIRUJANO  
RUBEN GUZMAN MARIN**

**TITULO: EL PAPEL DE LA NICOTINA SOBRE LAS CELULAS DEL  
NUCLEO DORSAL DEL RAPE DURANTE EL SUEÑO DE  
MOVIMIENTOS OCULARES RAPIDOS.**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. RENE DRUCKER COLIN.**

2000

287 192



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

ESTA TESIS FUE REALIZADA CON EL APOYO DEL CONSEJO NACIONAL DE  
CIENCIA Y TECNOLOGIA (CONACYT) Y LA DIRECCION GENERAL DE  
ESTUDIOS DE POSGRADO (DGEP-UNAM).

NUMERO DE BECARIO CONACYT: 117062 A RUBEN GUZMAN MARIN

## INDICE.

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Introducción</b>	<b>2</b>
<b>Sueño MOR y espigas Ponto-Geniculo-Occipitales</b>	<b>3</b>
-Aspectos fenomenológicos del sueño	3
-Neurobiología del Sueño MOR	5
-Sustratos anatómicos y farmacológicos del Sueño MOR	7
-Espigas Ponto-Geniculo-Occipitales (PGOs)	9
-Generación de las espigas PGO	11
-Funciones de las espigas PGO	12
<b>Serotonina (5-HT)</b>	<b>13</b>
-Biosíntesis y Metabolismo de la 5-HT	14
-Actividad unitaria de las células del NDR	16
-Aspectos conductuales de la función serotoninérgica	17
-5-HT y espigas PGO	19
-Proyecciones anatómicas NDR/PPT-LDT (interacciones serotonino-colinérgicas)	20
-Modelo de interacción recíproca	21
<b>Nicotina y receptores nicotínicos</b>	<b>22</b>
-Propiedades farmacológicas de los receptores nicotínicos	23
-Aspectos farmacológicos de los nicotina	24
-Nicotina y sueño	26
<b>Planteamiento del Problema</b>	<b>28</b>
<b>Trabajo experimental 1:</b> Identificación y caracterización de células serotoninérgicas con el patrón de disparo REM-off en ratas en libre movimiento.	30
<b>Trabajo experimental 2:</b> Efecto de la administración sistémica de nicotina sobre la actividad de células serotoninérgicas del NDR durante la fase de Sueño MOR en ratas en libre movimiento.	31
<b>Trabajo experimental 3:</b> Efectos de la administración de nicotina en el NDR sobre la actividad de las células del LDT/PPT en rebanadas de cerebro medio de rata.	32
<b>Trabajo experimental 4:</b> Determinación de la respuesta a nicotina de las células del NDR frente a antagonistas de receptores GABAA, GABAB y 5-HT1A.	33
<b>Discusión</b>	<b>45</b>
<b>Referencias</b>	<b>57</b>

## Resumen

Estudios previos han demostrado que la administración de nicotina por vía transdérmica suprime las espigas ponto-geniculo-occipitales (PGOs) de la fase de sueño de movimientos oculares rápidos (SMOR) en gatos en libre movimiento y mejora el estado de ánimo en pacientes con depresión mayor. Es posible que estos efectos sean mediados a través de estimulación de las células serotoninérgicas del núcleo dorsal del rafé (NDR), ya que se ha sugerido que este es un inhibidor tónico de la generación de PGOs y la mayoría de los tratamientos utilizados para la depresión incrementan la transmisión serotoninérgica. Por otro lado se ha demostrado que los receptores nicotínicos (los cuales son estimulados por la nicotina, y endógenamente por la acetilcolina) incrementan la liberación de varios neurotransmisores incluida la serotonina. Así, el objetivo de este trabajo es demostrar que la administración de nicotina incrementa la actividad de células serotoninérgicas del NDR, lo cual apoyaría la hipótesis de que los efectos observados sobre la supresión de PGOs y la mejoría del estado de ánimo en pacientes con depresión son mediados por estimulación serotoninérgica. Para corroborar esto, se llevaron a cabo los siguientes experimentos.

En el experimento 1 en ratas en libre movimiento se identificaron células serotoninérgicas del NDR que exhiben el patrón de disparo REM-off es decir, su frecuencia de disparo disminuye a lo largo del ciclo sueño-vigilia cesando de disparar durante la fase de sueño MOR. En el experimento 2 se registraron estas células con este patrón de disparo y se administró nicotina sistémicamente con objeto de comprobar que estas células incrementan su actividad durante la fase de SMOR. En el experimento 3 en rebanadas de cerebro medio de ratas, se registró simultáneamente la actividad unitaria de células del NDR y de los núcleos tegmental laterodorsalis (LDT) y tegmental pedúnculo pontino (PPT) los cuales participan en la generación de sueño MOR y PGOs y se administró nicotina en el NDR con objeto de comprobar si la nicotina ejerce un efecto inhibitorio sobre las células de LDT/PPT a través de la estimulación del NDR. Finalmente en el experimento 4 con objeto de evaluar si los efectos de la nicotina son mediados directamente a través de la estimulación de células serotoninérgicas, o son indirectos a través de la liberación de algún otro neurotransmisor, se registró la actividad de células serotoninérgicas del NDR en presencia de antagonistas GABAérgicos y serotoninérgicos.

Los resultados obtenidos demuestran que las células serotoninérgicas REM-off del NDR en ratas exhiben características similares a las reportadas previamente en gatos. En el experimento 2 demostramos que la nicotina incrementa la frecuencia de disparo de estas células durante la fase de sueño MOR. En cuanto al tercer experimento encontramos que la administración de nicotina en el NDR estimula a estas células y simultáneamente inhibe a las del PPT y LDT, y que este efecto es mediado por receptores 5-HT<sub>1A</sub>. Finalmente en el experimento 4 encontramos que los efectos de la nicotina son mediados indirectamente al estimular a las células serotoninérgicas del NDR lo cual conduce a un incremento en la actividad de estas células. Estos datos en conjunto apoyan la hipótesis de que la supresión de la espiga PGO y la mejoría del estado de ánimo en pacientes con depresión por la nicotina es un efecto mediado por la estimulación de células serotoninérgicas.

## Introducción

El estudio del sueño comienza de manera formal con el desarrollo del electroencefalograma llevado a cabo por el psiquiatra suizo Hans Berger (1929). Es a través de esta herramienta que ha sido posible determinar de manera cuantitativa y cualitativa que los estados de vigilia y sueño se acompañan de cambios en las señales eléctricas generadas por la corteza cerebral.

Utilizando esta herramienta es que años más tarde Aserinski y Kleitman (1953) describen una fase de sueño que es caracterizada por la presencia de movimientos oculares, motivo por el cual a esta fase de sueño se le conoce como sueño de movimientos oculares rápidos o sueño MOR. Jouvett (1959) denominó como sueño paradójico a esta fase de sueño, debido a que el patrón electroencefalográfico era muy similar al observado durante la vigilia resultando paradójico que dos estados conductualmente opuestos presentaran el mismo patrón electroencefalográfico. Es también durante esta fase de sueño en que ocurren las ensoñaciones (Dement y Kleitman 1957). Un avance importante en entender los substratos anatómicos, farmacológicos e incluso recientemente a nivel molecular, se ha generado en los últimos 40 años, sin embargo algunas de las implicaciones de estos hallazgos a nivel básico tienen relevancia clínica las cuales apenas comienzan a esclarecerse.

## **SUEÑO MOR Y ESPIGAS PONTO-GENICULO-OCCIPITALES (PGO).**

### **Aspectos fenomenológicos del sueño.**

En la actualidad para poder analizar el ciclo sueño-vigilia es necesario registrar cuando menos los siguientes parámetros: el electroencefalograma (EEG), el electro oculograma (EOG) y el electromiograma (EMG). Adicionalmente es posible registrar otras variables como son: la temperatura, frecuencia respiratoria y cardiaca; asimismo es posible registrar la actividad de regiones específicas del cerebro con la introducción de electrodos para este fin, en este caso particular nos referimos al registro de las espigas ponto-geniculo-occipitales (espigas PGO), que reciben este nombre por los sitios en los cuales son registrados esto es, a nivel del puente, núcleo geniculado lateral del tálamo y corteza occipital.

El ciclo sueño-vigilia en el humano consiste de varias etapas las cuales son: vigilia, sueño de ondas lentas (SOL) el cual comprende 4 etapas (I, II, III y IV), y sueño MOR, estas etapas se caracterizan de la siguiente manera (figura 1):

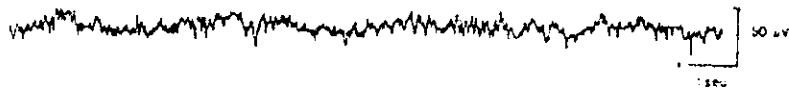
**VIGILIA:** El EEG presenta frecuencias mezcladas de un ritmo  $\alpha$  y  $\beta$  (actividad de bajo voltaje y alta frecuencia). El tono muscular se encuentra elevado y hay presencia de movimientos oculares.

**SUEÑO DE ONDAS LENTAS (SOL).** Se divide en cuatro etapas SOL: I, II, III y IV.

**SOL I:** El EEG presenta actividad de bajo voltaje de 50 - 75  $\mu$ V, y una frecuencia de 5 - 7 Hz, aparecen las llamadas ondas del vertex, con una amplitud mayor de 200  $\mu$ V.

**SOL II:** Se presentan los husos de sueño y los complejos K. Los primeros aparecen con una frecuencia entre 12-14 Hz, con una duración mínima de 5 seg y formados por 6-7 ondas.

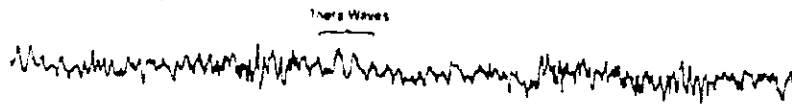
Vigilia-bajo voltaje-alta frecuencia



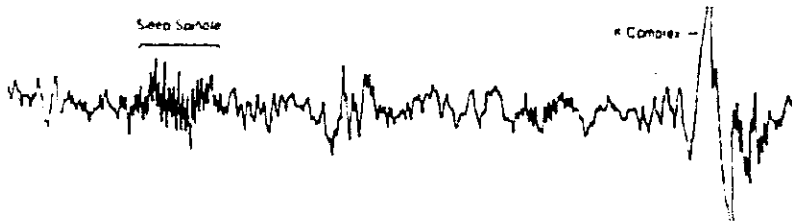
Somnolencia 8-12 cps ondas alfa



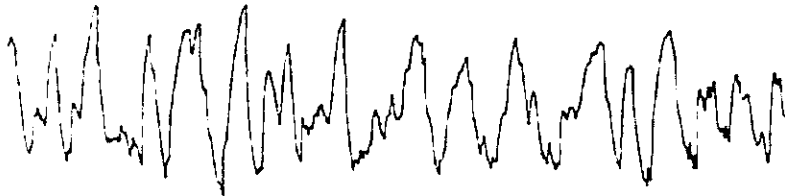
Etapa 1 3-7 cps ondas theta



Etapa 2 12-14 cps husos de sueño y complejos K



Sueño delta 0.5 - 2 cps ondas delta > 75  $\mu$ V



Sueño MOR ondas de bajo voltaje, rápidas y forma de dientes de sierra



**Figura 1.** Patrón electroencefalográfico durante el ciclo vigilia-sueño en humanos.



En cuanto a los segundos, representan ondas con un complejo negativo seguido por uno positivo con duración mayor de 5 seg.

SOL III y IV o sueño delta. Cada una de estas fases varía de acuerdo a su duración en la época del registro. Cuando existe por los menos un 20%, pero no más de un 50% de actividad lenta de 2 Hz y con una amplitud promedio de 75  $\mu$ V, se trata de SOL III. Mientras que para determinar la fase de SOL IV es necesario un mínimo del 50% de dicha actividad. A lo largo de estas fases de sueño, el tono muscular y los movimientos oculares disminuyen paulatinamente.

SUEÑO MOR: El EEG presenta actividad de bajo voltaje, parecido al de la vigilia (razón por la cual Jouvét llamó a esta fase como sueño paradójico), con la presencia de movimientos oculares y atonía muscular. Asimismo se ha señalado que las ensoñaciones ocurren durante esta fase de sueño, existe una disminución o estimulación del ritmo cardiorespiratorio y durante esta fase de sueño no existe regulación de la temperatura a nivel central. Es durante esta fase en que se presentan las espigas PGO.

Las fases de sueño I, II, III, IV y sueño MOR se suceden unas a otras en forma cíclica durante una noche de sueño. Cada ciclo se inicia con el SOL I y se continúa con las siguientes fases, la sucesión dura aproximadamente 90 minutos en el hombre. En una noche puede haber de 4 a 6 ciclos.

Es importante señalar que una parte de los trabajos llevados a cabo en el área de sueño han sido realizado en gatos y en ratas. En los registros polisomnográficos en estos animales (figura 2) encontramos durante la fase de vigilia se registra una actividad cortical rápida (14 - 40 Hz) y de bajo voltaje, el EMG está muy activo y el núcleo geniculado lateral (NGL) exhibe potenciales que coinciden con los movimientos oculares (potenciales

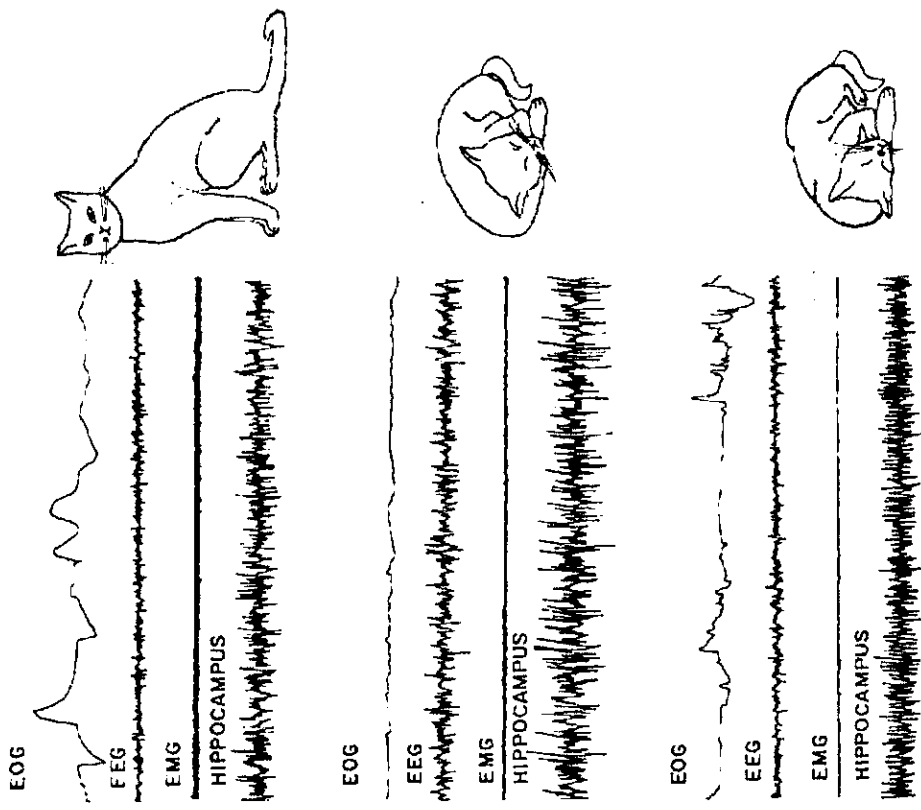


Figura 2. Registro polisomnográfico a lo largo del ciclo vigilia-sueño en gatos en libre movimiento (Modificado de Morrison y col., 1983)

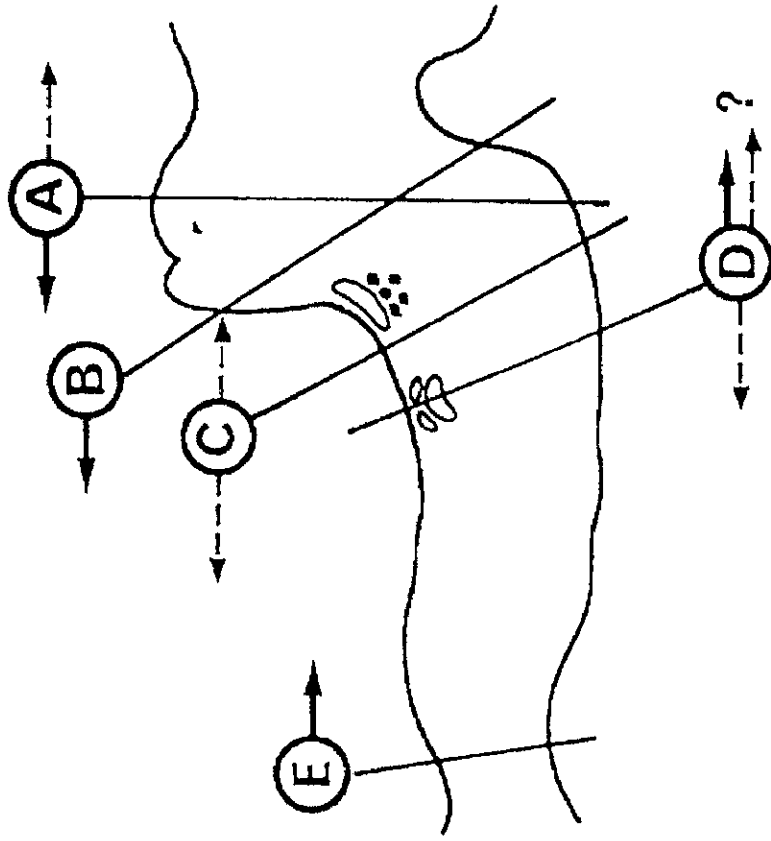
relacionados a movimientos oculares). Conforme la actividad del EEG se hace más lenta se instala la fase de sueño de ondas lentas o NMOR, con la aparición de los husos de sueño y representan a la fase I del sueño NMOR, después la frecuencia disminuye (1-3 Hz) y aumenta su amplitud apareciendo la fase II del sueño NMOR. El tono muscular disminuye durante esta fase.

Durante la fase de sueño MOR se presentan características EEG similares a las descritas anteriormente. Adicionalmente es posible registrar la presencia de las espigas ponto-geniculo-occipitales en gatos.

### **Neurobiología del sueño MOR (SMOR)**

En los años 30 Von Economo reportó una serie de estudios observacionales clínico-patológicos realizados a pacientes que morían a causa de la encefalitis letárgica que ocurrió en Europa alrededor de 1918. En estos estudios Von Economo observó que aquellos pacientes con lesiones en el hipotálamo anterior presentaban en el curso de su enfermedad marcado insomnio, mientras que aquellos que presentaban lesión en el hipotálamo posterior presentaban hipersomnia. Estos estudios son corroborados por Nauta en 1946 quien al lesionar el hipotálamo anterior en ratas inducía insomnio, mientras que en lesiones en el hipotálamo posterior inducían sueño.

Bremer en 1935 realizó sus estudios en dos preparaciones en el gato (figura 3). Por un lado realizó la preparación del cerebro aislado, seccionando a nivel intercolicular separando la región anterior del cerebro del tallo cerebral y observó que existía una sincronización permanente lo cual fue interpretado como un animal profundamente



**Figura 3.** Estudios de transección a nivel del tallo cerebral. Las flechas con líneas continuas indican la presencia de sueño MOR caudal o rostral al sitio de transección. Las flechas discontinuas indican la ausencia de sueño MOR al sitio de transección. La transección a nivel de B representa la preparación de Cerebro Aislado, mientras que la transección a nivel de E representa la preparación de Encéfalo aislado. (Modificado de Jouvet M. Sleep 1994, 17: s77-s83.).

dormido. Por el otro lado en su preparación de encéfalo aislado, en el cual la transección se realiza al nivel de la unión de la médula espinal y el bulbo raquídeo Bremer observó que el ciclo vigilia-sueño no se alteraba. Por tanto llegó a la conclusión de que el sueño era un estado pasivo y se debía a una disminución en la entrada sensorial.

Para 1949 Giuseppe Moruzzi y Horace Magoun interpretaron estos resultados de manera diferente. Ellos consideraban la existencia de una estructura intermedia entre ambos niveles de sección responsable de generar dicho estado. En la preparación de encéfalo aislado y estimulando la formación reticular observaron que la estimulación de esta zona producía sincronización en el EEG y propusieron que el sistema reticular activador ascendente (SRAA) era responsable del “despertamiento”, término acuñado en ese tiempo para describir al estado de alerta o vigilia.

En 1953 Eugene Aserinsky alumno de Nathaniel Kleitman, usando una técnica de colocación de electrodos sobre la frente y cara observó episodios periódicos de movimientos oculares rápidos en niños, mientras dormían. Llamaron a este fenómeno sueño de movimientos oculares rápidos (sueño MOR). Su hipótesis era que eso podría corresponder al periodo en el cual ocurrían las ensoñaciones.

Para 1958, Michel Jouvét y François Michel estaban estudiando los mecanismos de aprendizaje en gatos, y mientras registraban con un electrodo en el cerebro de uno de sus gatos hicieron un hallazgo importante. Esos experimentos como señala Jouvét (1999) no añadieron mucho a nuestro conocimiento sobre los mecanismos del aprendizaje pero si abrieron el camino hacia otra vía del conocimiento: los mecanismos generadores de sueño

MOR. Para 1959 Jouvet había demostrado que las transecciones cerebrales en ciertas regiones imposibilitaba a los animales la generación de sueño MOR (figura 3). En 1969 el mismo Jouvet propone la teoría monoaminérgica en la cual tanto 5-HT y NA participan de manera importante en la generación de sueño MOR esta teoría persistirá por los próximos casi diez años, hasta que McGinty (1976) demuestra que las células serotóninérgicas del rafe exhiben un patrón de disparo que es inverso con la aparición de sueño MOR. En 1975 Hobson y McCarley (ver más adelante) proponen su modelo de interacción recíproca, y proponen que las aminas regulan la generación de SMOR. En los siguientes años se descubrieron una gran cantidad de sustancias que modulan este estado (Revisado por García-García y Drucker-Colín, 1999), sin embargo como Jouvet ha señalado “tener docenas de sustancias es como no tener ninguna” lo cierto es que aun seguimos sin conocer muchos de los mecanismos que participan o generan este estado.

### **Sustratos Anatómicos y Farmacológicos de la generación de sueño MOR**

Basándose en estudios de transección cerebral (figura 3) se ha demostrado que las estructuras necesarias para la generación de sueño MOR se encuentran localizadas a nivel del tallo cerebral (Jouvet 1962), mientras que el diencefalo y telencefalo no exhibieron ningún patrón de actividad característico de esta fase de sueño cuando eran separados del tallo cerebral. La presencia de espigas PGO con atonía muscular de los músculos del cuello era evidente cuando el corte se hacía por debajo del tallo cerebral. Un análisis más detallado de estos estudios de transección reveló que el puente era la región más crítica para la generación de la fase de sueño MOR. Es en el transcurso de los siguientes años es que fue posible localizar con exactitud el sitio anatómico que participa en la generación de esta fase de sueño.

Hoy en día es bien reconocido que las neuronas colinérgicas que participan en la generación de sueño MOR son consideradas como parte del tegmento pontino y particularmente los núcleos tegmental pedúnculo pontino (PPT) y núcleo tegmental laterodorsalis (LDT) participan en la generación de este estado (revisado por Jones 1992; Gillin y col. 1993). Anatómicamente, las neuronas colinérgicas en el tegmento mesopontino se encuentran entremezcladas. La población celular colinérgica en estos dos núcleos son ocasionalmente referidas como los grupos Ch5 y Ch6.

De acuerdo con la definición original del PPT en el humano por Jacobsohn en 1909 (Rye 1997) los equivalentes en primates no humanos y en subprimates corresponden a una colección de neuronas colinérgica magnocelulares (Mesulam y col. 1983; 1984, Rye y col. 1987). Estas neuronas se extienden desde el polo caudal de la sustancia nigra hasta un nivel rostral pontino. Las neuronas de la parte más caudal del PPT ocupan una posición subcerulea y se fusionan imperceptiblemente con el núcleo tegmental laterodorsalis (LDT) localizado dorsalmente dentro de la sustancia gris periacueductal. Solo un 50% de las células en este núcleo son colinérgicas.

La hipótesis de que la acetilcolina juega un papel importante en la inducción de sueño MOR fue propuesta originalmente por Hernández-Peón (1962) y Jouvet (1962). Tanto el carbacol (un agonista colinérgico de tipo muscarínico) como la neostigmina (un inhibidor de la colinesterasa) promueven la aparición y duración de la fase de sueño MOR (Baghdoyan y col. 1984; 1987; Velázquez-Moctezuma y col., 1989) mientras que los antagonistas de los receptores muscarínicos bloquean estos efectos (Velázquez-Moctezuma

y col. 1991). En cuanto al papel del agonista colinérgico nicotina en la generación de SMOR no ha sido estudiado sistemáticamente como ha sucedido con la acetilcolina, sin embargo como veremos más adelante algunos estudios indican que este agonista también juega un papel importante en la generación de SMOR.

Por otro lado estudios farmacológicos y fisiológicos sugieren otros neurotransmisores como la serotonina (5-HT), norepinefrina (NE), el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y el péptido del lóbulo intermedio tipo corticotropina (CLIP) entre otros, desempeñan un papel importante en la generación y mantenimiento del sueño MOR. Así, mientras que la 5-HT (McGinty D y Harper R 1976) y la NE (Aston-Jones y Bloom 1981) ejercen una influencia inhibitoria sobre el sueño MOR y las espigas PGO, VIP (Drucker-Colin y col., 1984), CLIP y Ach promueven la aparición de sueño MOR.

### **Espigas Ponto-Geniculo-Occipitales (PGOs)**

Uno de los eventos distintivos a la fase de sueño MOR es la presencia de las espigas ponto-geniculo-occipitales (PGOs), estos son potenciales eléctricos fásicos registrados en el puente, el núcleo geniculado lateral del tálamo y la corteza occipital, se presentan 50-100 s antes de la aparición del SMOR y su presencia indica que cambios profundos se están llevando a cabo en el cerebro que anteceden la aparición de esta fase de sueño (figura 4). Jouvett y Michel describieron el componente pontino (1959) nombrando por tanto a estas ondas como espigas pontinas, mientras que los componentes talámicos y en la corteza visual son descritos posteriormente por Mikiten y col. (1961) y Mouret y col. (1963) respectivamente. Del nombre de ondas profundas de sueño, dado originalmente por Brooks y Bizzi (1963) se les denominan espigas PGOs por los sitios en los cuales son registrados



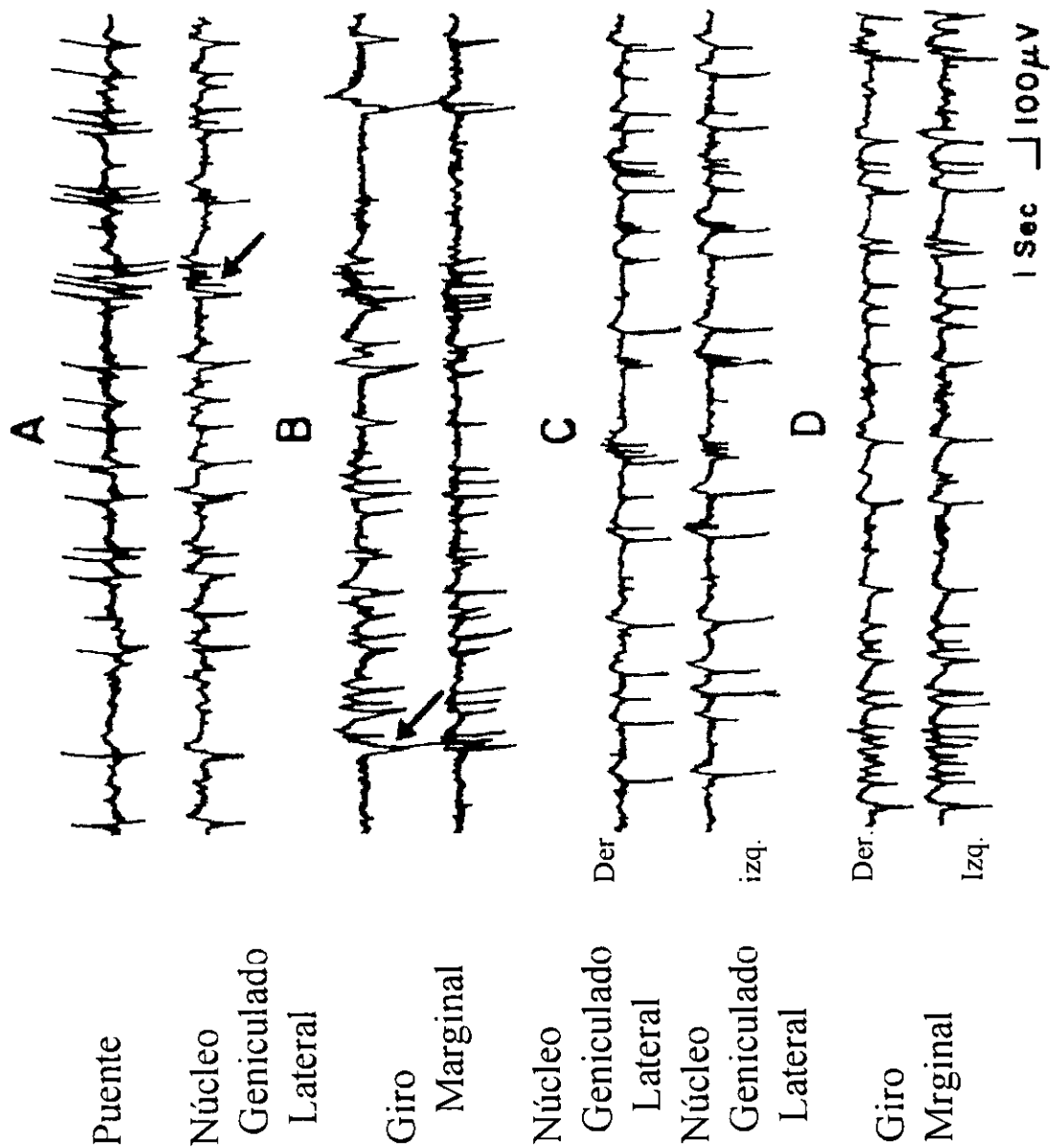


Figura 4. Localización anatómica y morfología de las espigas PGO durante la fase de sueño MOR, registradas en puente, núcleo geniculado lateral (NGL) del tálamo y corteza visual. (Adaptado de Brooks y Bizzi 1963)

(Jeannerod y col, 1965). Cabe mencionar que existen otros sitios en los cuales es posible registrar a estas espigas como son: los cuerpos cuadrigéminos superiores, el cerebelo y los núcleos del III y IV pares craneales. Asimismo son Brooks y Bizzi quienes proveen por primera vez una descripción electrofisiológica detallada de estas espigas (1963). Estos trabajos señalaron que estas espigas son potenciales eléctricos de corta duración (100 msec) y gran amplitud (300  $\mu$ V) los cuales eran fácilmente distinguibles de la señal de fondo en el puente, núcleo geniculado lateral y corteza visual. La presencia de espigas únicas ocurría comúnmente en la fase de sueño NMOR y la presencia de espigas en ráfagas (en grupos de dos, tres o más) ocurría más frecuentemente durante la fase de sueño MOR (Datta 1997).

La actividad PGO ha sido extensamente estudiada principalmente en mamíferos siendo el gato doméstico el más estudiado (Jouvet y col. 1959; Mikiten y col., 1961; Bizzi y Brooks 1963). Cohen y Feldman, 1968 (Feldman y Cohen 1968) registraron en la corteza visual de macacos potenciales fásicos con características similares a las espigas PGO. En ratas ha sido registrada actividad PGO principalmente en el puente y en el cerebelo (Farber y col. 1980; Marks y col. 1980) sin embargo estas espigas son de menor amplitud (150  $\mu$ V) a las registradas en gatos. Asimismo es posible inducir estas espigas (a través de estimulación auditiva en ratas), sin embargo no ha sido bien establecido si estas PGOs inducidas tienen propiedades similares a las encontradas en gatos (Sanford y col., 1994; 1996). Finalmente, el registro de potenciales eléctricos en el cuero cabelludo asociado con la presencia de movimientos oculares ha sugerido que la actividad PGO pudiese estar presente en humanos (McCarley y col., 1983).

## **Generación de las espigas PGO.**

Diferentes métodos de estudio que incluyen entre otros a las lesiones selectivas, estudios de transección cerebral y estimulación del tallo cerebral han apuntado al tegmento pontino como un sitio para la generación de espigas PGO. El tegmento pontino esta involucrado en la regulación de muchos de los componentes fisiológicos del sueño MOR (Jouvet, 1962; Vertes, 1984; 1984A; Sakai, 1983; Hobson y col., 1986). En gatos el sitio en el cual se generan las PGOs es referido como el área X de Sakai (1976, 1980) también referida como la parte colinérgica del núcleo tegmental pedunculo pontino o PPT (Koyama y Sakai, 2000) y en ratas este sitio parece estar en el peri-locus coeruleus (Farber y col., 1980; Datta y col., 1998). Varias vías neuronales han sido propuestas para la conducción de espigas PGO desde el puente a la corteza cerebral, y núcleos específicos en el tallo cerebral han sido propuestos ser necesarios para la generación de estas espigas. Actualmente existe considerable evidencia de que las neuronas del área peribraquial en su porción caudal, participan en la generación de espigas PGO (Sakai y col., 1976; McCarley y col., 1978; Sakai y col., 1980) en gatos, mientras que en ratas este sitio generador de espigas PGO se localiza entre el núcleo locus coeruleus (LC) y el núcleo parabraquial medial denominándose a este sitio núcleo subcoeruleus (Farber et al., 1980; Marks et al., 1980; Datta 1999). Registros extracelulares de la actividad unitaria de estos núcleos han indicado que estas células disparan de dos a seis potenciales de acción los cuales están estrechamente acoplados a la generación de espigas PGO (McCarley et al., 1978; Sakai et al. 1980; Steriade et al., 1989; Steriade et al., 1990; 1990A). Asimismo la estimulación eléctrica en la región caudal del área peribraquial puede evocar la presencia de espigas PGO en el núcleo geniculado lateral, mientras que la lesión electrolítica de esta zona suprime la generación de estas espigas (Sakai et al., 1976) asimismo mientras que el enfriamiento a través de sondas

insertadas en esta zona suprime reversiblemente de manera ipsilateral la presencia de estas espigas (Laurent y Ayala-Guerrero 1975). Por otro lado las lesiones excitotóxicas a este nivel puede reducir la ocurrencia de espigas PGO durante la fase de sueño MOR hasta un 75% (Webster et al. 1988). Todos estos datos sugieren que las espigas PGO se originan de actividad sincrónica de neuronas colinérgicas del tegmento pontino del tallo cerebral.

En cuanto a la naturaleza química de las células que participan en la generación de estas espigas la evidencia actual sugiere que participan mecanismos colinérgicos (Henriksen y col., 1972; Bagdoyan y col., 1987A), sin embargo M. Steriade (1990; 1990A) ha identificado células PGO-on que no son colinérgicas. Así, es probable que una subpoblación de estas células PGO-on module la actividad de las PGO-on de naturaleza colinérgica.

### **Funciones de las espigas PGO**

Dado que las espigas PGO aparecen en regiones del cerebro que están ampliamente separadas, han sido registradas en un número importante de especies de mamíferos terrestres y ocurren con una ritmicidad estrechamente regulada, las espigas PGO deben ser vistas como una actividad fisiológicamente importante (Callaway y col. 1987). Se les han atribuido varios papeles funcionales sin embargo estas teorías permanecen como meramente especulativas debido a que la o las funciones del sueño continúan siendo poco entendidas. Dentro de las funciones que se han dado a las PGOs están la integración sensorial motora, algún papel en el aprendizaje, formación de ensoñaciones y cognición (Hobson 1999), desarrollo del sistema visual entre otras.

## **SEROTONINA (5-HT).**

De los neurotransmisores llamados clásicos, la serotonina (5-HT) es históricamente el más íntimamente involucrado con la neuropsicofarmacología. Desde mediados del siglo XIX se aisló del suero una sustancia que inducía la contracción del músculo liso del intestino. Un siglo después un grupo en Italia aisló una sustancia encontrada en altas cantidades en células cromafines de la mucosa intestinal con propiedades similares a la reportada anteriormente. Al material aislado de la sangre se dio el nombre de “serotonina” mientras que el material aislado del intestino recibió el nombre de “enteramina”. Posteriormente ambos materiales fueron purificados y cristalizados lo que permitió su síntesis, esta sustancia resultó ser serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) (Cooper y col. 1996).

Una vez que la 5-HT fue aislada dentro del sistema nervioso central de mamíferos surgió la teoría de que varias enfermedades mentales podrían ser debidas a anomalías bioquímicas en su síntesis. Esta línea de pensamiento fue extendida cuando la reserpina (utilizado como antihipertensivo en la medicina tradicional en la India) la cual vacía a las vesículas presinápticas de 5-HT producía depresión. Esta idea permanece hoy en día como parte importante en la patogénesis de esta enfermedad en humanos.

### **Biosíntesis y metabolismo de la serotonina.**

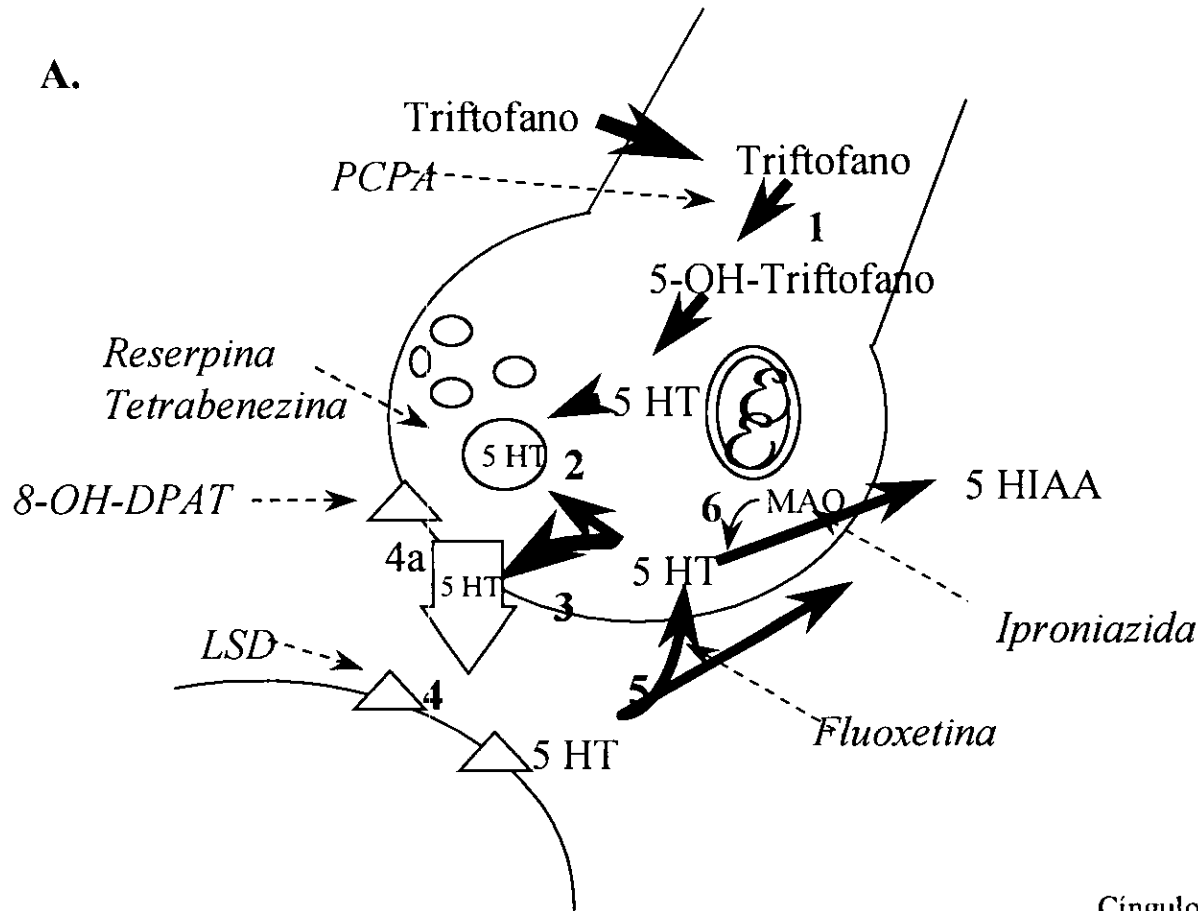
La 5-HT se encuentra en muchas células que no son neuronas, tales como las plaquetas, mastocitos y el sistema enterocromafin antes mencionado. De hecho solo 1-2%

de toda la 5-HT en el cuerpo se encuentra en el cerebro y esta sustancia no cruza la barrera hematoencefálica por lo que el cerebro debe sintetizarla. La figura 5A resume los principales pasos en la síntesis de esta sustancia. Por otro lado el sistema de recaptura sirve como el principal mecanismo para la terminación de las acciones de la 5-HT una vez que se ha unido a su receptor. En cuanto a su catabolismo este se logra por deaminación hasta formar ácido 5-hidroxiindoleacético (5-HIAA) por acción de la enzima monoamino oxidasa (MAO).

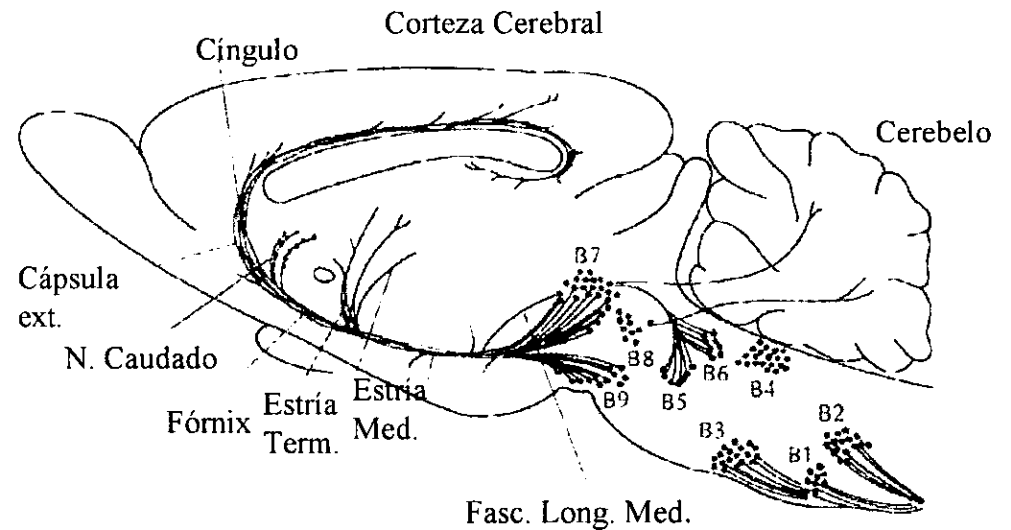
Las neuronas que contienen 5-HT se ubican en grupos de células localizados en la línea media en núcleos denominados del *rafé* al nivel de puente y mesencéfalo. Dahlström y Fuxe (1964) describieron originalmente nueve núcleos denominados originalmente como B1-B9. Los grupos más caudales proyectan hacia el bulbo raquídeo y médula espinal, mientras que los más rostrales como el *rafé dorsalis* (NRD), *rafé medianus* (NRM) y el *centralis superioris* (NCS) o B7-B9 proveen la más extensiva inervación serotoninérgica al telencéfalo y diencefalo (figura 5B).

Hasta la fecha se conocen 7 subtipos de receptores serotoninérgicos basándose en características farmacológicas, todos a excepción del 5-HT<sub>3</sub> ejercen su actividad a través de la activación de segundos mensajeros. En la tabla 1 se resumen los principales subtipos de receptores así como su localización neuroanatómica y fármacos agonistas y antagonistas a estos subtipos de receptores. En cuanto a los efectos de la 5-HT a nivel celular el consenso es que la 5-HT administrada iontoforéticamente disminuye la frecuencia de disparo de las células estimuladas (Cooper y Bloom 1996). En el caso del subtipo 5-HT<sub>1</sub> el cual está involucrado en mediar las interacciones NDR con los sitios generadores de sueño MOR y

# Sinápsis y vías serotoninérgicas



B.



**Figura 5**

**A.** Modelo esquemático de una neurona serotoninérgica indicando posibles sitios de acción de algunos fármacos actuando a este nivel. 1. Síntesis enzimática, la triftofano hidroxilasa es la enzima limitante en la síntesis. 2. Almacenamiento, tanto la reserpina como la terabenzina vacían el contenido del transmisor en las vesículas. 3. Liberación. 4. Interacción con el receptor. 4A. Interacción con autorreceptores, este mecanismo modula la liberación de 5-HT. 5. Re captura este es el principal medio para remover el transmisor del espacio sináptico. 6. Monoamino oxidasa, la 5-HT libre en la terminal puede ser degradada por esta enzima hasta 5-HIAA.

**B.** Esquema representando las principales vías serotoninérgicas en el SNC en ratas. B7, B8 representan al NDR (núcleo dorsal del rafé) y al NRM (núcleo rafé magno) (Modificado de Cooper J. 1996).

	<i>5-HT<sub>1A</sub></i>	<i>5-HT<sub>1B</sub></i>	<i>5-HT<sub>1D</sub></i>	<i>5-HT<sub>2A</sub></i>	<i>5-HT<sub>2B</sub></i>	<i>5-HT<sub>2D</sub></i>
<b>Regiones con alta densidad.</b>	NDR Hipocampo	S. Nigra G. Pálido	S. Nigra G. Palido G. Basales	Corteza Hipocampo N. facial motor	Corteza	Plexos coroides Bulbo raquideo Hipocampo
<b>Agonistas</b>	8-OHDPAT 5-carboxamidotriptamina (5-CAT)	5-CAT	5-CAT Sumatriptan	DOI DOB alfa-Me5-HT	DOI	alfa-Me5-HT
<b>Antagonistas</b>	Spiperona Pindolol WAY 100635	Isamoltane	Isamoltane	Ketanserina Ritanserina Espiperona	Ketanscrina	Ketanscrina Spiperona Metergolina
<b>Efectos sobre membrana</b>	Hiperpolarización vía apertura de canales de K	?	?	Depolarizac.	Depolarizac.	Depolarizac. vía apertura canales de Ca
	<i>5-HT<sub>3</sub></i>	<i>5-HT<sub>4</sub></i>	<i>5-HT<sub>6</sub></i>	<i>5-HT<sub>7</sub></i>		
<b>Regiones con alta densidad.</b>	Corteza Entorrinal Area Postrema Neuronas Periféricas	Hipocampo Colículos	Estriado Acumbens Corteza	Tálamo Hipotálamo Amigdala		
<b>Agonistas</b>	alfa-Me-5-HT	SC-53116	5-CAT, LSD	LSD		
<b>Antagonistas</b>	Zacopride Odaserton	SDZ 205 557	Lisuride Clozapina	Clozapina Amitriptilina		
<b>Efectos sobre membrana</b>	Depolarizac.					

Tabla 1. Receptores serotoninérgicos y distribución.



PGOs los efectos parecen estar asociados a la apertura de canales de  $K^+$  o al cierre de canales de  $Ca^{2+}$ , ambos vía proteínas G sensibles a la toxina pertusis.

Estudios electrofisiológicos han demostrado que las células serotoninérgicas del NDR inhiben su actividad (tanto eléctrica, como de liberación de 5-HT) a través de la estimulación de autorreceptores somatodendríticos del tipo 5-HT<sub>1A</sub> (Wang y Aghajanian, 1977). El disparo de estas células está estrechamente regulado por mecanismos iónicos intrínsecos (aumento de la conductancia al K) lo cual sirve para explicar el patrón de disparo tónico y tipo marcapaso de estas células. Este marcapaso intrínseco es modulado por al menos dos neurotransmisores: 1) la norepinefrina actuando a través de receptores  $\alpha$  adrenérgicos lo cual acelera el marcapaso; y 2) la 5-HT actuando a través de autorreceptores somatodendríticos 5-HT<sub>1A</sub> los cuales desaceleran el marcapaso.

#### **Actividad unitaria de las células del NRD.**

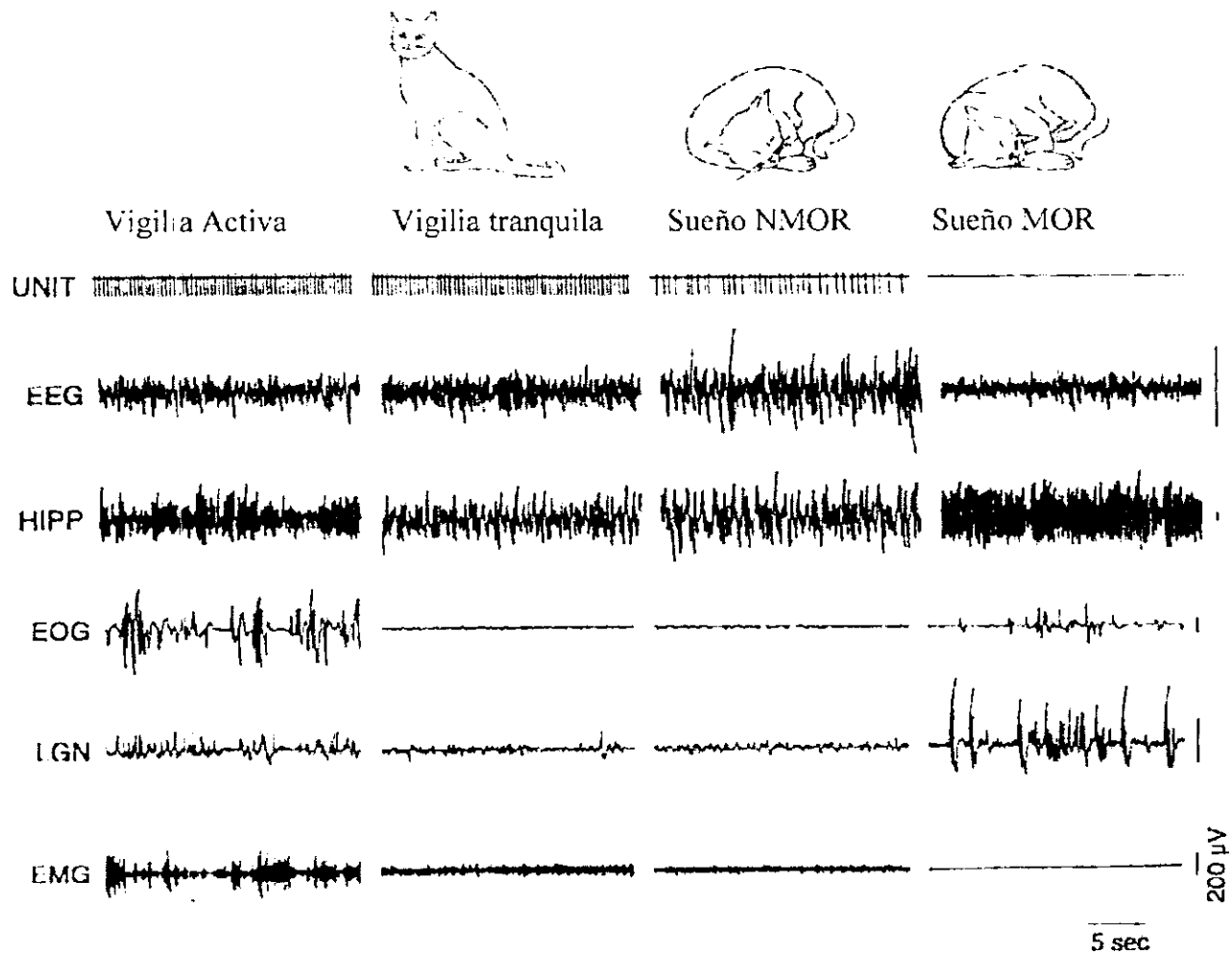
El NDR por mucho contiene la mayor cantidad de células serotoninérgicas del cerebro, sin embargo es importante señalar que solo una tercera parte de las células de este núcleo sintetiza 5-HT (Descarries y col. 1982). Análisis posteriores detallaron que las otras poblaciones neuronales en el NDR incluyen células GABAérgicas, dopaminérgicas, y noradrenérgicas principalmente (Johnson y col. 1994).

Es en base a una combinación de criterios electrofisiológicos (Van der Maelen y Aghajanian 1983; Jacobs y Fornal 1999), farmacológicos y anatómicos lo que permite su identificación para estudios tanto *in vitro* como *in vivo*. Entre estos criterios se incluye: 1) patrón de disparo tónico y regular con frecuencias de disparo baja (0.5 - 5 espigas por

segundo), 2) potenciales de acción de larga duración ( $> 2$  mseg), 3) respuesta inhibitorio con la aplicación de agonistas del receptor  $5\text{-HT}_{1A}$ , asimismo es importante notar que en gatos en libre movimiento estas células exhiben el patrón de disparo REM-off

La actividad unitaria de este núcleo ha sido extensamente estudiada mediante registros extracelulares en rebanadas de cerebro, en ratas anestesiadas (Aghajanian y col., 1968), y en animales en libre movimiento siendo el gato doméstico el más estudiado (Jacobs y Fornal 1999). Solo un estudio de la actividad unitaria de células serotoninérgicas del NRD ha sido llevado a cabo en ratas (Vertes y Kocsis 1992) en libre movimiento. Sin embargo son pocos los detalles en cuanto a las propiedades de estas células a lo largo del ciclo sueño-vigilia aportados por ese trabajo.

Los cambios más dramáticos en la actividad de estas células en gatos ocurren a lo largo del ciclo sueño-vigilia (figura 6). Durante la fase de vigilia la actividad de estas neuronas es lenta y regular (Trulson y Jacobs, 1979) tal y como sucede cuando se registra en ratas anestesiadas (Aghajanian y col. 1968) e *in vitro* (Mosko y Jacobs, 1976). De una frecuencia de disparo de aproximadamente tres espigas por segundo, la actividad de estas neuronas es típicamente incrementada en un 10-30% en respuesta a estímulos que incrementan el estado de alerta. Recíprocamente, la actividad de estas células disminuye conforme el gato se vuelve somnoliento, haciéndose aún más lenta cuando el animal entra a la fase de sueño de ondas lentas y prácticamente cesan de disparar cuando el animal pasa a la fase de sueño MOR (McGinty y Harper 1976; Trulson y Jacobs 1979; Lydic y col. 1983). En general, el patrón de actividad a través del ciclo sueño-vigilia en las células 5-HT del



**Figura 6.** Actividad Unitaria de una célula serotonérgica del NDR con el registro polisomnográfico a lo largo del ciclo vigilia-sueño en un gato en libre movimiento. Note la relación inversa entre la actividad de la célula del NDR y el estado de vigilia del animal, así como el cese de disparo de esta célula durante el SMOR. Durante el SMOR las espigas PGO son registradas en el LGN. EEG = electroencefalógrafa; HIPP = electroencefalograma del hipocampo; EOG = electrooculograma; LGN = PGOs en el núcleo geniculado lateral; EMG = electromiograma. Modificado de Jacobs B.L y Fornal C. 1999).

NDR es paralelo al de las células serotoninérgicas en otros núcleos serotoninérgicos: NCS y NRM (Heym y col. 1982; Fornal y Jacobs 1988).

### **Aspectos conductuales de la función serotoninérgica.**

Sobre la base de un trabajo extenso de la actividad de estas células llevado a cabo en gatos en libre movimiento se ha demostrado que las neuronas serotoninérgicas exhiben un incremento de la actividad neuronal durante patrones motores repetitivos, por ejemplo cuando los gatos son registrados cuando caminan en una banda móvil (treadmill). Así, se ha propuesto que un incremento en la actividad tónica de las neuronas serotoninérgicas durante vigilia serviría para incrementar la excitabilidad neuronal motora vía proyecciones descendentes al cuerno ventral de la médula espinal (Veasey y col. 1997) y al mismo tiempo suprimiría el procesamiento de información sensorial (Jacobs y Fornal, 1993). Así cuando estas células cesan de disparar durante la fase de sueño MOR esto imposibilitaría la función motora en este estado (Jacobs y col., 1983).

### **Serotonina y Depresión.**

En años recientes considerable atención ha sido puesta en entender los procesos involucrados en la patogenia de la depresión, de hecho aproximadamente un 20% de la población mundial padece o ha padecido algún trastorno asociado a la depresión (Boyd y col. 1981). Como mencionamos al principio de esta sección se ha sugerido que una función serotoninérgica alterada conduce a la depresión, así como a otras alteraciones psiquiátricas que incluyen estados de hiper agresividad y esquizofrenia (Cooper y col. 1996). En apoyo a esta hipótesis de la participación serotoninérgica en la patogenia de la depresión se conoce que la mayoría de los tratamientos utilizados actualmente en el manejo de la

depresión incrementan la neurotransmisión mediada por 5-HT (Blier y de Montigny 1994).

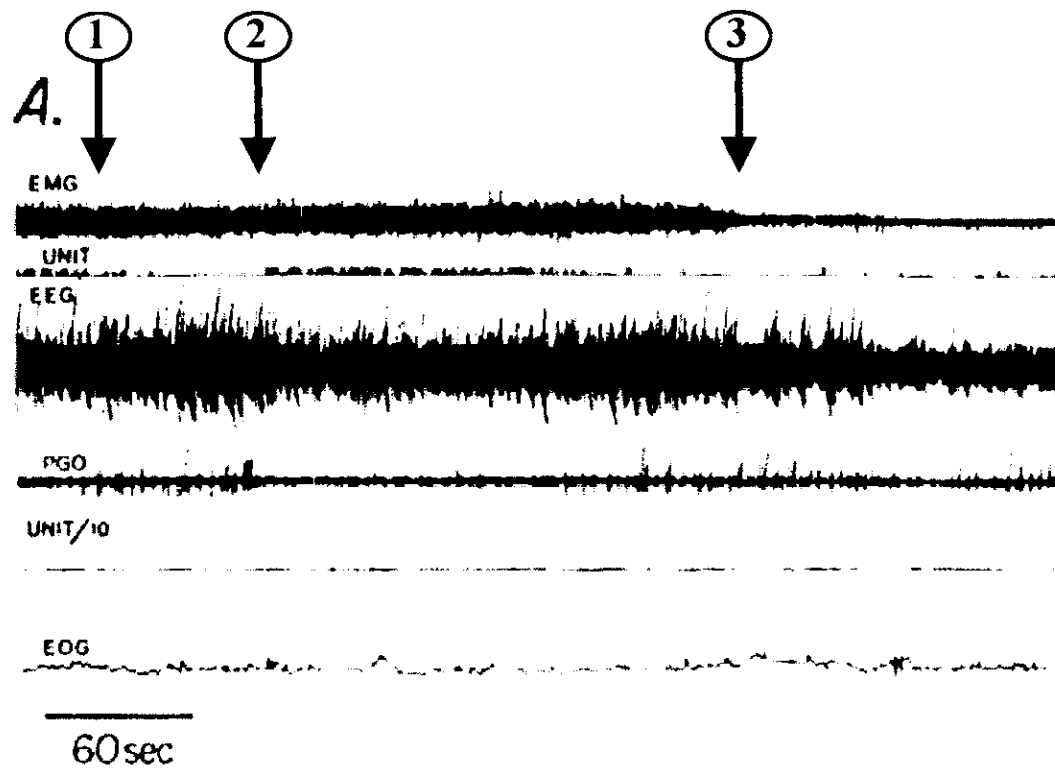
Por otro lado en aquellos modelos animales de depresión (Vogel y col. 1990) se ha podido demostrar que las células del NDR exhiben una menor actividad (Kinney y col., 1997) y este efecto parece ser mediado por desensibilización del receptor 5-HT<sub>1A</sub> (Madhuit y col. 1995). Estos resultados parecen contradictorios ya que una desensibilización de este receptor conduciría a un incremento en la frecuencia de disparo. Sin embargo debido a que en este modelo en ratas se aplica un inhibidor de la recaptura de serotonina en el primer mes de vida postnatal, es posible que se desarrollen mecanismos compensatorios que explicarían esta disminución en la frecuencia de disparo con un receptor desensibilizado.

Uno de los tratamientos utilizados en la depresión es la privación de sueño por una noche, si la 5-HT tiene un papel en la patogenia de la depresión, esta maniobra debe producir cambios en la actividad de estas células. En un trabajo realizado recientemente por Gardner y col. (1997) registrando la actividad unitaria de células identificadas como serotoninérgicas exhibiendo el patrón de disparo REM-off, se demostró que la privación de sueño por 24 horas producía cambios en la sensibilidad del receptor 5-HT<sub>1A</sub> lo que apoya la hipótesis de que la privación de sueño tiene cambios importantes sobre la actividad serotoninérgica. Asimismo en experimentos de privación de sueño ha sido documentado un incremento en el recambio de serotonina (Asikainen y col., 1997) y una disminución de la actividad de la MAO B la enzima encargada de degradar a la 5-HT (Pérez y col. 1998).

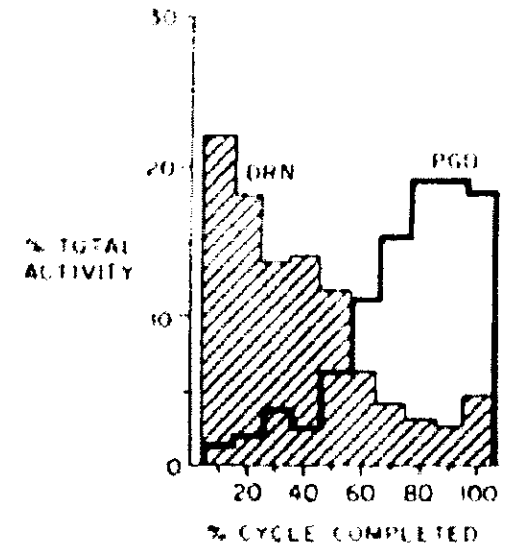
## 5-HT y espigas PGO

Evidencia actual indica que las células serotoninérgicas del NDR juegan un papel permisivo en la generación de las espigas PGO. Como señalamos anteriormente estas espigas preceden la aparición del sueño MOR, y la aparición de estas espigas durante la fase de sueño NMOR generalmente indica la transición hacia el sueño MOR. Estudios neurofarmacológicos apoyan la idea de que la 5-HT inhibe la generación de las espigas PGO. Así, la administración sistémica de fármacos que vacían el contenido de las vesículas presinápticas serotoninérgicas (reserpina) (Brooks y col. 1971) o que inhiben la síntesis de 5-HT como el para-cloro fenilalanina (PCPA) (Jacobs y col. 1972) han demostrado inducir espigas PGO fuera de la fase de SMOR. La subsecuente administración de 5-hidroxitriptofano restablece los niveles de 5-HT en estos animales y suprime la actividad PGO de la vigilia. Además de esta supresión farmacológica la eliminación de la actividad del NDR inducida por enfriamiento (Laurent y Ayala-Guerrero, 1975) o cortando sus fibras hacia la zona peribraquial generadora de PGOs (Simon y col., 1973) son otra forma de generar espigas PGO.

Estudios de la actividad unitaria de neuronas 5-HT apoyan la hipótesis de que la 5-HT ejerce una influencia inhibitoria en la generación de espigas PGO. Estos estudios han demostrado que la frecuencia de disparo de las células serotoninérgicas del NDR exhibe una correlación inversa (figura 7) con la presencia de espigas PGO (McGinty y Harper 1976; Trulson y Jacobs 1983; Lydic y col. 1983; 1985). Estas células exhiben una marcada reducción o completo cese de disparo varios segundos antes de, y durante la presencia de las espigas PGO. Inversamente, el reinicio del disparo de estas células al final de un



*B.*



**Figura 7.**

A. Registro polisomnográfico ilustrando la actividad de una célula serotoninérgica del NDR con la presencia de espigas PGO. Las células serotoninérgicas del NDR exhiben una marcada reducción o completo cese de disparo varios segundos (flecha 3) antes y durante (flecha 1) la presencia de las PGOs. Inversamente el reinicio del disparo de estas células coincide con la supresión de espigas PGO (flecha 2).

B. Histograma que correlaciona la actividad de una célula del NDR con la presencia de PGOs a lo largo del ciclo sueño-vigilia. (Modificado de Lydic y col. 1983)

periodo de sueño MOR es asociado con la supresión de las espigas PGO. Por otro lado otros núcleos serotoninérgicos como el NRM exhiben actividad que no está relacionada con la presencia de espigas PGO. Finalmente la estimulación eléctrica del NDR durante la fase de sueño MOR suprime la presencia de estas espigas (Jacobs y col. 1973).

Recientemente estudios llevados a cabo *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la aplicación de 5-HT en los núcleos PPT y LDT hiperpolariza a las neuronas colinérgicas de estos núcleos (Luebcke y col. 1992; Leonard y Llinás 1994), mientras que la aplicación del agonista de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> 8-OH-DPAT en el LDT en gatos en libre movimiento inhibe a las células REM-on, es decir aquellas que disparan predominantemente durante la fase de sueño MOR (Thakkar y col., 1998). Así, es posible que interacciones serotoninérgicas-colinérgicas regulen la inhibición tónica de la generación de las espigas PGO.

#### **Proyecciones anatómicas NDR/PPT-LDT (interacciones serotoninino-colinérgicas).**

A pesar que por muchos años se ha considerado que las células serotoninérgicas del NDR juegan un papel importante en la regulación de las células que participan en la generación del sueño MOR y de las espigas PGO (McCarley y Hobson, 1975) la presencia de vías anatómicas entre estos núcleos no había sido reportado, sino hasta recientemente. En base a la utilización de marcadores retrógrados (Semba y Fibiger, 1992; Semba 1993) inyectados en el PPT, o anterógrados (inyectados en el NRD) se ha identificado la presencia de interacciones entre neuronas serotoninérgicas y colinérgicas a nivel del PPT (Vertes y Kocsis 1994) e incluso se ha podido visualizar a nivel sináptico utilizando microscopía electrónica (Steininger y col. 1997). Asimismo interacciones entre el NRD y el



núcleo subcoeruleus (el generador de espigas PGO en ratas) han sido documentadas (Datta y col., 1999).

### **Modelo de Interacción Recíproca.**

En 1975, Hobson y McCarley postularon un modelo, el cual relacionaba la actividad de los núcleos monoaminérgicos (locus coeruleus LC y el NDR) y colinérgicos en la generación de SMOR. Este modelo relacionaba la oscilación de dos poblaciones neuronales. Por un lado, las células localizadas en la formación reticular pontina (PRF) responsables de la generación de SMOR las cuales incrementaban su actividad de manera importante durante esta fase de sueño, denominándose a estas células como REM-on, mientras que las células del LC y del NDR de naturaleza aminérgica, las cuales decrecen su actividad para permitir la activación de las células pontinas (células REM-off). Este modelo fue apoyado por experimentos realizados subsecuentemente los cuales han demostrado que la administración de agonistas colinérgicos en PRF (Baghdoyan y col., 1987) incrementa la cantidad de SMOR. Asimismo se ha indicado que la actividad de las neuronas del PRF incrementan su frecuencia de disparo unos segundos antes y durante el SMOR (El Mansari y col., 1989).

Este modelo originalmente proponía que la PRF era el centro generador de la fase de SMOR. No obstante, registros electrofisiológicos realizados en animales en libre movimiento han mostrado que las neuronas de este núcleo además de disparar durante SMOR también exhibían un patrón de disparo relacionados con los movimientos durante la vigilia (Siegel y McGinty, 1977). Asimismo Drucker-Colin y Bernal-Pedraza (1983) demostraron que lesionando con ácido kainico a las células del campo tegmental

gigantocelular (FTG) el cual forma parte de la FRP no abolía la generación de SMOR. Hoy en día es ampliamente aceptado que las células del PPT y del LDT son los núcleos encargados de generar esta fase de sueño (Gillin y col., 1993), y proyecciones anatómicas entre el NDR y estos núcleos han sido establecidas como señalamos anteriormente.

### **NICOTINA Y RECEPTORES NICOTINICOS.**

Los receptores nicotínicos de la acetilcolina pertenecen a la superfamilia de canales iónicos activados por ligandos que incluye a los receptores del ácido gama aminobutírico (GABA), glicina y el receptor 5-HT<sub>3</sub> de la serotonina. Estos canales iónicos juegan un papel clave en la transmisión sináptica a través del sistema nervioso. En los términos más simples cuando la acetilcolina (el ligando endógeno para este receptor) se une al receptor el canal iónico se abre por unos cuantos milisegundos, aumentando la conductancia a cationes específicos a través de la membrana. Durante estos eventos el receptor se desensibiliza, por varios milisegundos o más. Estos receptores están diferencialmente expresados en varias regiones del SNC y del SNP y participan en un amplio rango de funciones que incluyen a algunas cognitivas, en el desarrollo neuronal y en procesos neurodegenerativos (Changeux y col., 1998). Asimismo estos receptores son un blanco importante para la nicotina el producto activo del cigarro y es un elemento importante para mantener la adicción al tabaco (Benowitz 1996).

El receptor nicotínico está formado por cinco subunidades dispuestas de tal manera que forman un canal catiónico central (homo o heteropentámeros). Asimismo contienen dos o cinco sitios de unión para el ligando endógeno. En el SNC estas subunidades son denominadas  $\alpha$  o  $\beta$  de acuerdo a la presencia o no de dos cisteínas en el sitio de unión para

gigantocelular (FTG) el cual forma parte de la FRP no abolía la generación de SMOR. Hoy en día es ampliamente aceptado que las células del PPT y del LDT son los núcleos encargados de generar esta fase de sueño (Gillin y col., 1993), y proyecciones anatómicas entre el NDR y estos núcleos han sido establecidas como señalamos anteriormente.

### **NICOTINA Y RECEPTORES NICOTINICOS.**

Los receptores nicotínicos de la acetilcolina pertenecen a la superfamilia de canales iónicos activados por ligandos que incluye a los receptores del ácido gama aminobutírico (GABA), glicina y el receptor 5-HT<sub>3</sub> de la serotonina. Estos canales iónicos juegan un papel clave en la transmisión sináptica a través del sistema nervioso. En los términos más simples cuando la acetilcolina (el ligando endógeno para este receptor) se une al receptor el canal iónico se abre por unos cuantos milisegundos, aumentando la conductancia a cationes específicos a través de la membrana. Durante estos eventos el receptor se desensibiliza, por varios milisegundos o más. Estos receptores están diferencialmente expresados en varias regiones del SNC y del SNP y participan en un amplio rango de funciones que incluyen a algunas cognitivas, en el desarrollo neuronal y en procesos neurodegenerativos (Changeux y col., 1998). Asimismo estos receptores son un blanco importante para la nicotina el producto activo del cigarro y es un elemento importante para mantener la adicción al tabaco (Benowitz 1996).

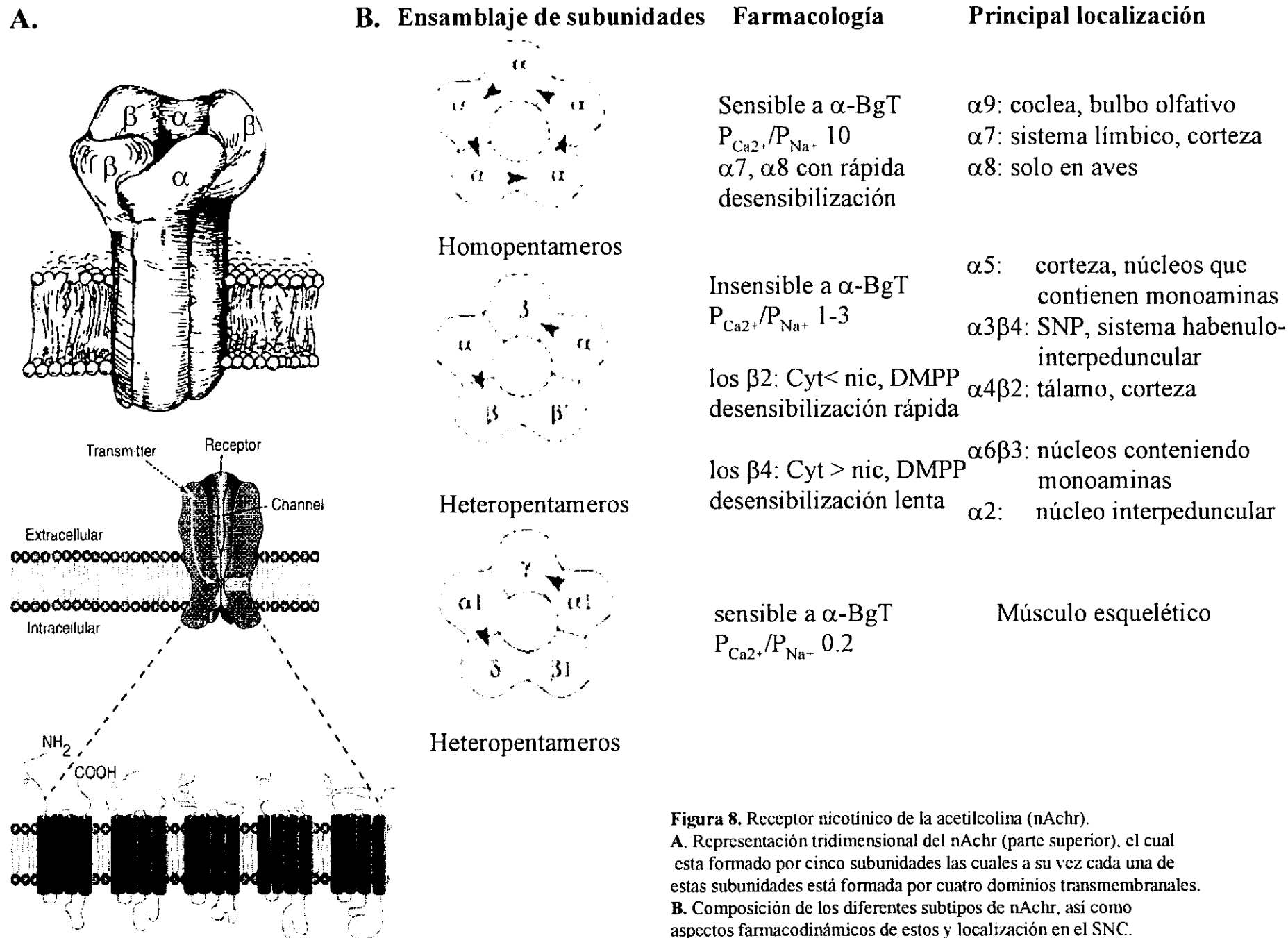
El receptor nicotínico está formado por cinco subunidades dispuestas de tal manera que forman un canal catiónico central (homo o heteropentámeros). Asimismo contienen dos o cinco sitios de unión para el ligando endógeno. En el SNC estas subunidades son denominadas  $\alpha$  o  $\beta$  de acuerdo a la presencia o no de dos cisteínas en el sitio de unión para

acetilcolina, mientras que la presencia de una subunidad  $\gamma$  se da en el receptor nicotínico a nivel muscular. Asimismo cada una de estas subunidades está formada por cuatro dominios transmembranales (denominados como TM1 - TM4). En la figura 8 se representa un esquema del ensamblaje del pentámero de subunidades, así como la composición de los homo o heteropentámeros.

En el SNC de mamíferos, se han identificado nueve subunidades ( $\alpha 2$  -  $\alpha 7$  y  $\beta 2$ -  $\beta 4$ ), mientras que la subunidad  $\alpha 9$  está presente en las terminaciones nerviosas sensoriales (Cordero-Erausquin y col. 2000).

### **Propiedades Farmacológicas de los receptores nicotínicos.**

En base a estudios de pegado de fármacos marcados con radioisótopos (binding) ha sido posible distinguir dos principales categorías de receptores en base a su afinidad a nicotina o  $\alpha$ -bungarotoxina ( $\alpha$ -BgT). Un ejemplo del primer grupo, es el tipo  $\alpha 4\beta 2$  (el subtipo más abundante en el SNC de mamíferos), mientras que un ejemplo del segundo (grupo con mayor afinidad por el  $\alpha$ -BgT) pertenecen al tipo  $\alpha 7$ . Asimismo un análisis más detallado indica que el subtipo  $\alpha 7$  exhibe baja afinidad por la acetilcolina y nicotina, se desensibiliza rápido y están involucrados en respuestas sinápticas fásicas, mientras que el  $\alpha 4\beta 2$  posee una alta afinidad por la acetilcolina y la nicotina (Alkondon y col. 1993), se desensibilizan lentamente y se postula participan en la transmisión tipo parácrina (Descarries y col. 1997). Un tercer grupo de receptores nicotínicos estaría representado por los receptores nicotínicos a nivel de la unión neuromuscular.



**Figura 8.** Receptor nicotínico de la acetilcolina (nAChr).  
**A.** Representación tridimensional del nAChr (parte superior), el cual está formado por cinco subunidades las cuales a su vez cada una de estas subunidades está formada por cuatro dominios transmembranales.  
**B.** Composición de los diferentes subtipos de nAChr, así como aspectos farmacodinámicos de estos y localización en el SNC.

Los receptores nicotínicos se encuentran localizados tanto pre (Lena y col. 1993) como post sinápticamente (Clarke 1993), sin embargo es probable que la mayoría de los receptores nicotínicos se encuentran localizados presinápticamente y al parecer su papel es modular la liberación de varios neurotransmisores que incluyen al GABA, 5-HT, noradrenalina y acetilcolina (Summers y col. 1995; Wonnacott 1997).

En cuanto a las propiedades electrofisiológicas y farmacológicas de los diferentes subtipos de receptores nicotínicos estas incluyen: una alta permeabilidad al calcio, desensibilización rápida y de larga duración y una mayor expresión (up regulation) de receptores cuando hay exposición crónica al agonista (Wonnacot, 1990).

Mencionaremos aquí que los subtipos  $\alpha 6$  (Le Novere N. y col. 1996) y el  $\beta 3$  (Deneris y col. 1989) parecen estar localizados en varios sitios a nivel del SNC incluyendo a los núcleos aminérgicos. Por otro lado se ha reportado la presencia de receptores nicotínicos a nivel del NDR en diferentes especies que incluyen a ratones (Marks y col., 1992) ratas (Segal y col., 1978; Deutch y col., 1987) gatos (Pin y col., 1968) y humanos (Benwell y col., 1988). En ratas reportes recientes indican que a nivel del NDR predominan el subtipo  $\alpha 7$ , el cual exhibe permeabilidad al  $Ca^{2+}$  (Bitner y col. 2000).

#### **Aspectos Farmacológicos de la nicotina.**

La nicotina es la sustancia activa que se encuentra en el tabaco y es responsable de la adicción al tabaco (Benowitz 1996). La nicotina es una amina terciaria que consiste de un anillo de piridina y de pirrolidina. Esta sustancia es absorbida del humo del cigarro entrando a la circulación rápidamente siendo distribuido a todo el organismo y toma

aproximadamente entre 10-19 segundos para alcanzar el cerebro (Jones 1987). La vida media de la nicotina es de 2-3 h y su vida media terminal puede ser hasta de 20 horas.

La nicotina es extensamente metabolizado en el hígado. Aproximadamente 70 – 80% es metabolizada a cotinina y alrededor de 4% a N'-oxido de nicotina, los cuales son eliminados por vía renal (Benowitz y col. 1996).

### **Nicotina y liberación de neurotransmisores.**

Como hemos señalado anteriormente la activación del receptor nicotínico incrementa la conductancia de cationes particularmente  $Ca^{2+}$  y  $Na^+$ . Sin embargo, estos receptores poseen mayor selectividad para el  $Ca^{2+}$ . Debido a que la localización de los receptores nicotínicos es predominantemente presináptico (Clarke 1993) esto ha llevado a sugerir que la activación de los receptores nicotínicos juega un papel importante en la liberación de neurotransmisores (Wonnacot 1997). Esto ha sido demostrado recientemente y cabe señalar que entre los neurotransmisores que se ha demostrado se liberan tras la estimulación con nicotina están: GABA, Acetilcolina, Dopamina y Serotonina. En cuanto a este último se ha demostrado *in vivo* en animales anestesiados que la administración sistémica de nicotina incrementa la liberación de este neurotransmisor colectado por microdiálisis a nivel de la corteza frontal (Ribeiro y col. 1993; Summers y col. 1995 y 1996). Recientemente experimentos *in vitro* llevados a cabo en el laboratorio (Mihailescu y col., 1998) han demostrado que la aplicación local de nicotina en el NDR incrementa tanto la frecuencia de disparo como la liberación de 5-HT de una manera dosis-dependiente. Li y col. (1998) demostraron que este efecto se da a través de la estimulación presináptica de los receptores nicotínicos a nivel del NDR.

### **Aspectos funcionales de los receptores nicotínicos.**

En cuanto a las funciones en las que están implicados estos subtipos, esta información proviene de estudios llevados a cabo en ratones knockout donde se encuentra mutado alguno de estos subtipos. Algunas de las mutaciones llevadas a cabo en estos ratones se encuentran representados en la tabla 2, así como los efectos observados tras realizar esta mutación.

Por otro lado un interés creciente se ha originado en los últimos años por el papel que posiblemente tienen en la patogenia de algunas enfermedades, entre otras podemos mencionar a la enfermedad de Parkinson, Alzheimer, el síndrome de Tourette, esquizofrenia, en el desorden de hiperactividad y déficit de atención, así como en la depresión (Mihailescu y Drucker-Colín 2000). Asimismo estos receptores juegan un papel importante en funciones cerebrales complejas como atención, memoria y cognición y generación de sueño MOR (Mihailescu y Drucker-Colín 2000).

### **Nicotina y Sueño.**

En cuanto al papel del agonista colinérgico nicotina en la generación de sueño MOR, este no ha sido tan ampliamente estudiado como ha sucedido con la acetilcolina, salvo por los primeros trabajos llevados a cabo por Domino (1965), y por Jewet y Norton (1966) quienes demostraron que la administración tanto intravenosa como subcutánea de nicotina aumentaba la duración de la fase de sueño MOR. Velázquez-Moctezuma y col. (1990) han encontrado que la microinyección de nicotina dentro de la formación reticular medial pontina (mPRF) en el gato induce sueño MOR. Consistente con esta observación,

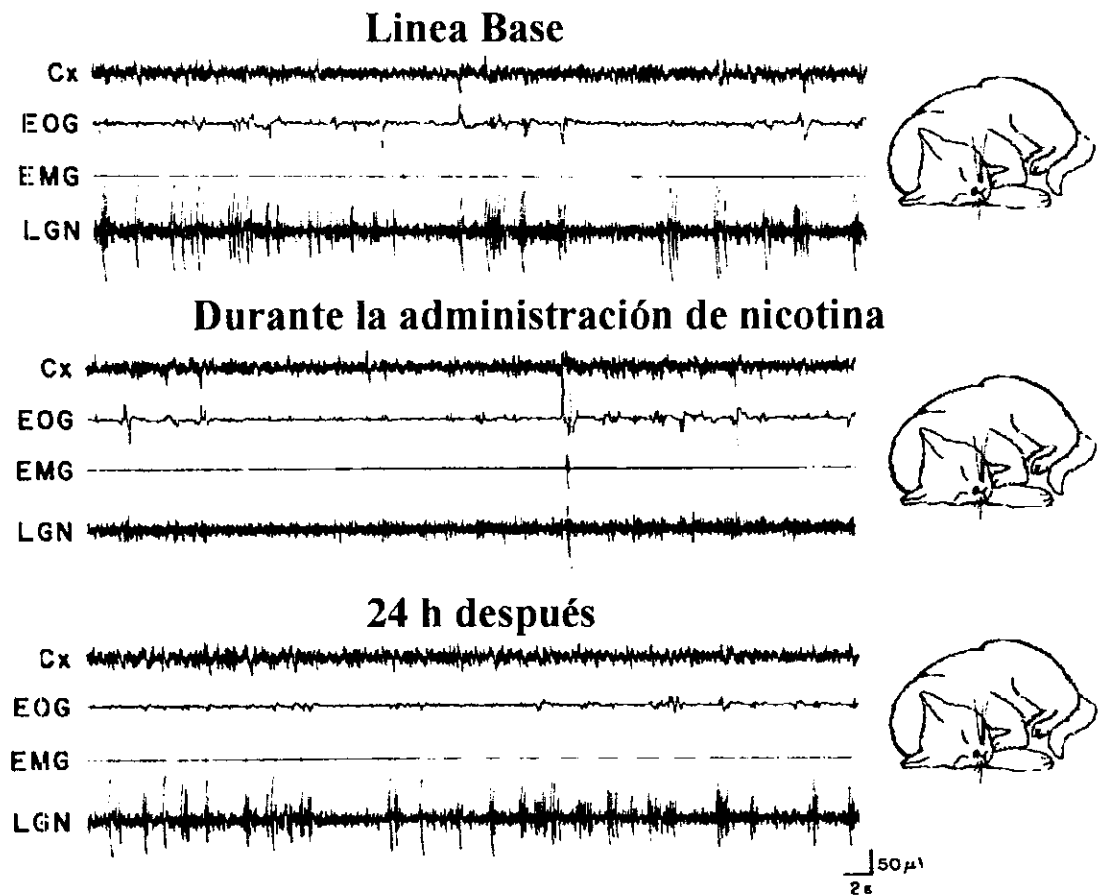


<i>Subunidad mutada</i>	<i>Fenotipo Basal</i>	<i>Conducta inducida por la nicotina</i>	<i>Sobrevivencia</i>
alfa 3	Defectos en el Sist. Nervioso autónomo megaquistes	No determinado	Fallece 1-7 días postnatal
alfa4	Pérdida de afinidad al sitio de unión de la nicotina; pérdida de respuestas mediada por nicotina	antinocicepción mediada por nicotina disminuida	Adulto
alfa7	ausencia de desensibilización en neuronas del hipocampo	efecto neuroprotector	Adulto
alfa9	Innervación eferente anormal de las células pilosas de la coclea	Supresión de respuestas cocleares	Adulto
Beta2	Ausente la liberación de dopamina inducida por nicotina; ausencia de actividad presináptica, envejecimiento acelerado.	Latencia alargada en la prueba de prevención pasiva; déficits de aprendizaje	Adulto
Beta3	Pérdida del sitio de unión de la alfa-conotoxin en sinaptosomas del estriado.	Incremento en la actividad motora	Adulto
Beta2 + Beta4	Defectos en el sistema nervioso autónomo	No determinado	Letal 1-3 semanas post natal

Tabla 2. Ratones knock-out de algunas subnidades del receptor de nicotina.

Birnstiel y col. (1991) reportaron que la nicotina depolarizó a las células dentro de la mPRF de manera similar a como lo hacen los agonistas muscarínicos conocidos que inducen sueño MOR cuando son inyectados dentro de esta área. Recientemente se demostró que la administración i.p. sub crónica de nicotina incrementó la duración de SMOR en ratas en libre movimiento (Salin-Pascual y col., 1999).

Por otro lado en trabajos llevados a cabo por nuestro laboratorio en los últimos años han demostrado que la aplicación de nicotina por vía transdérmica mejora el estado de ánimo en pacientes con depresión (Salin-Pascual y Drucker-Colín 1998), e incrementa la duración de la fase de sueño MOR en estos pacientes. Algunos estudios han reportado que los fumadores tuvieron latencia de sueño incrementada comparada con no fumadores y que la supresión aguda normalizaba la latencia de sueño (Soldatos y col. 1980). Recientemente Vázquez y col. (1996) recientemente reportamos que la administración de nicotina por la misma vía suprime la presencia de espigas PGO durante la fase de sueño MOR (figura 9). Previamente Ruch-Monachon y col. (1976) reportaron en que la administración intravenosa de nicotina suprimía la presencia de estas espigas. Por otro lado Hu y col. (1989) reportaron que la administración del antagonista de receptores nicotínicos mecamilamina a nivel del núcleo geniculado lateral (NGL) suprimía la presencia de estas espigas.



**Figura 9.** Registro polisomnográfico durante la fase de SMOR en tres diferentes condiciones: línea base (registro superior), durante la administración de nicotina (registro de enmedio) y 24 h después de retirar el parche (registro inferior). Obsérvese que durante la administración de nicotina no hay presencia de espigas PGO, las cuales reaparecen 24 h después de retirar el parche de nicotina.

### **Planteamiento del Problema**

Evidencia farmacológica (Brooks y col., 1972; Jacobs y col., 1972) y electrofisiológica (McGinty y Harper, 1976; Lydic y col., 1983; 1985) indica que las células serotoninérgicas del NDR juegan un papel permisivo en la generación de espigas PGO. Asimismo, trabajos llevados a cabo recientemente demuestran que la aplicación directa de 5-HT en el NLD hiperpolariza a las células colinérgicas de este núcleo (Luebcke y col., 1992; Leonard y Llinás 1994). Así, es posible que interacciones serotoninérgicas-colinérgicas regulen la generación de sueño MOR y la generación de espigas PGO.

El papel de los receptores nicotínicos ha crecido de manera notable en los últimos años. Uno de los papeles en los que han sido implicados ha sido en la liberación de varios neurotransmisores dentro de los cuales se encuentra la 5-HT.

Trabajos llevados a cabo en el laboratorio han indicado que la administración transdérmica de nicotina suprime la presencia de espigas PGO (Vázquez y col., 1996). Hallazgos similares fueron reportados por Ruch-Monachon y col., (1976) tras la administración intravenosa de este fármaco. Por otro lado la administración del antagonista nicotínico mecamilamina a nivel del núcleo geniculado lateral (NGL) suprimió las espigas PGO. Resulta interesante que tanto el agonista como el antagonista produzcan el mismo efecto, sin embargo es posible que la mecamilamina actúa bloqueando a los receptores nicotínicos presentes a nivel del NGL (Swanson y col. 1990) mientras que la nicotina actúa estimulando a las células serotoninérgicas de NDR. Así, es posible que el efecto de la nicotina en la supresión de las espigas PGO sea mediado a través de la estimulación de las

células serotoninérgicas del NDR las cuales vía proyecciones a los núcleos generadores de PGOs hiperpolarizarían a las células colinérgicas de estos núcleos durante la fase de sueño MOR, suprimiendo por tanto la generación de PGOs.

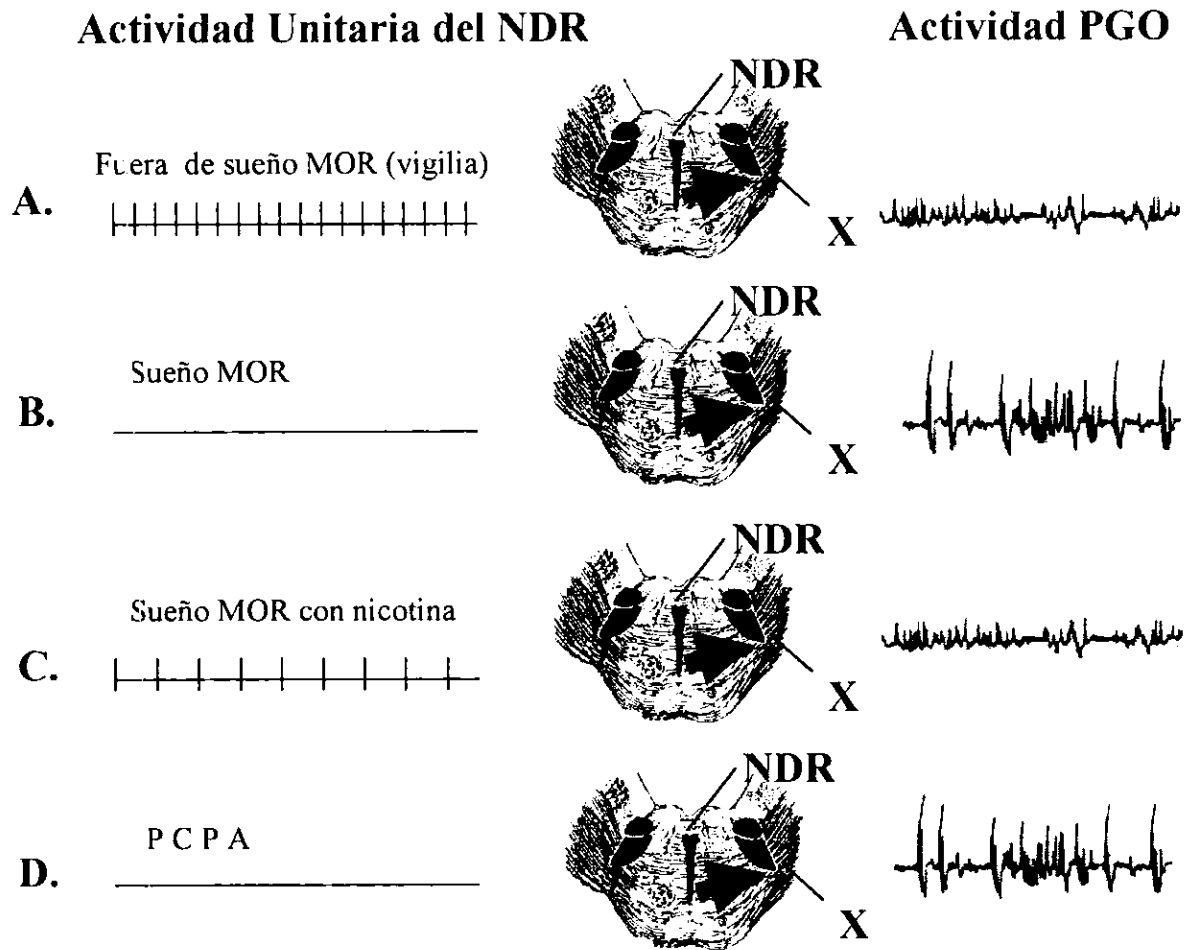
Por tanto el objetivo principal de este trabajo es demostrar que la administración de nicotina estimula a las células del NDR las cuales a su vez inhiben a las células del LDT/PPT lo cual explicaría el efecto sobre la supresión de las espigas PGO (figura 10).

#### **Objetivos:**

\*Determinar si la administración sistémica de nicotina incrementa la frecuencia de disparo de células serotoninérgicas del NDR.

\*Determinar si el efecto estimulador sobre las células del NDR produce inhibición de las células de LDT / PPT.

\*Determinar si los efectos estimuladores de la nicotina sobre las células del NDR son mediados directamente a través de la estimulación de células serotoninérgicas.



**Figura 10.** Modelo propuesto para explicar la supresión de las espigas PGO tras la administración de nicotina. Fuera de la fase de SMOR (vigilia o sueño NMOR) la actividad de las células serotoninérgicas del NDR alcanza su mayor frecuencia de disparo (A) y no se registra la presencia de espigas PGOs. La frecuencia de disparo de estas células disminuye progresivamente cesando durante la fase de SMOR (B) permitiendo la generación de espigas PGO. La nicotina incrementa la frecuencia de disparo de las células serotoninérgicas del NDR durante la fase de SMOR lo cual inhibe la generación de espigas PGO en esta fase (C). La administración de PCPA induce la presencia de espigas PGO fuera de la fase de sueño MOR (D).

Experimento 1: Identificación y caracterización de células serotoninérgicas del NDR con el patrón de disparo REM-off en ratas en libre movimientos.

Artículo Anexo:

**Discharge modulation of rat dorsal raphe neurons during sleep and waking.**

Research report

## Discharge modulation of rat dorsal raphe neurons during sleep and waking: effects of preoptic/basal forebrain warming

Rubén Guzmán-Marín<sup>a</sup>, Md. Noor Alam<sup>b,c</sup>, Ronald Szymusiak<sup>b,d</sup>, René Drucker-Colín<sup>e</sup>, Hui Gong<sup>e</sup>, Dennis McGinty<sup>b,c,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-250, 04510 México, D.F., Mexico

<sup>b</sup>Veterans Affairs Greater Los Angeles HealthCare System, 16111 Plummer Street, North Hills, CA 91343, USA

<sup>c</sup>Department of Psychology, University of California, Los Angeles, CA, USA

<sup>d</sup>Department of Medicine, School of Medicine, University of California, Los Angeles, CA, USA

<sup>e</sup>Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D.F., Mexico

Accepted 30 May 2000

### Abstract

In cats, putative serotonergic neurons (PSNs) recorded from the dorsal raphe nucleus (DRN) across the sleep-wake cycle exhibit the so-called rapid eye movement sleep-off (REM-off) discharge pattern. Since, the sleep-wake discharge patterns of DRN neurons in behaving rats is poorly known, the present study examined this neuronal populations. The PSNs recorded in this study exhibited: (1) progressive decrease in discharge rate from waking to NREM to REM sleep; (2) long action potential duration, and (3) reduction of discharge rate after systemic administration of a selective 5-HT<sub>1A</sub> agonist, ( $\pm$ )-8-hydroxy-2-(di-*n*-propylamino) tetralin hydrobromide (8-OH-DPAT). Evidence supports the hypothesis that NREM sleep is modulated by thermoregulatory mechanisms localized in the preoptic area and adjacent basal forebrain (POA/BF). We previously reported that POA/BF warming suppresses the discharge of wake-promoting neurons in the posterior hypothalamus and the basal forebrain. Since the DRN is one component of the brainstem arousal system and receives projections from POA/BF, we examined the effects of local POA/BF warming by 1.5–2.0°C during waking on the discharge of DRN neurons. POA/BF warming reduced the discharge in 14 of 19 PSNs and in 12 of 17 other wake-related neurons in the DRN. DRN neuronal discharge reduction occurred without accompanying EEG frequency or behavioral changes. These results suggest that PSNs recorded in DRN in unrestrained and unanesthetized rats exhibit a “wake-active REM-off” discharge pattern and further support the hypothesis that the POA/BF warm-sensitive hypnogenic system induces sleep by a coordinated inhibition of multiple arousal systems including that modulated by the DRN. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

*Theme:* Neural basis of behavior

*Topic:* Biological rhythms and sleep

*Keywords:* Preoptic area; Basal forebrain; Preoptic warming; Serotonergic neurons; REM-off neuron; Single unit recording; Rat

### 1. Introduction

In behaving cats single cell activity recorded from putative serotonin containing neurons of the dorsal raphe nucleus (DRN) displays a slow and regular firing rate during waking, a decreased firing rate during NREM sleep and a near cessation of discharge during REM sleep

[25,30,52]. During quiet waking, the activity of DRN serotonergic neurons in cats is slow and regular [52] as it is when examined under anesthesia [1] and in vitro in rats [33]. The rat is commonly used as a model for investigation of serotonin pharmacology. However, to date only one study in behaving rats describes putative serotonergic neurons recorded across the sleep-waking cycle and this study provides few details concerning the behavior of these neurons [21]. The first aim of this report is to fill this gap.

Studies have identified a preoptic area and basal forebrain (POA/BF) neuronal network that integrates thermoregulation and control of sleep mechanisms [28,34].

\*Corresponding author. Veterans Affairs Greater Los Angeles Health-Care System, 16111 Plummer Street, North Hills, CA 91343, USA. Tel.: +1-818-891-7711; fax: +1-818-898-9575.  
E-mail address: mcginty@ucla.edu (D. McGinty).



The POA/BF is a site of critical thermoregulatory mechanisms and contains populations of warm-sensitive and cold-sensitive neurons that can control both autonomic and behavioral thermoeffector activities [8,17,28,43]. Neurons responsive to local warming and cooling have been described in these sites in anesthetized and unanesthetized animals [3,15,37,54]. The existence of a sleep controlling mechanism in the POA/BF has been confirmed by several research groups. This is the only brain site where lesion, stimulation and neuronal recording methods all provide evidence for a sleep-promoting function (for review see [27]).

Current evidence supports a hypothesis that NREM sleep is modulated by thermoregulatory mechanisms [28]. Local POA/BF warming promotes sleep onset and increases NREM sleep [36,42]. Whole body warming evokes and enhances NREM sleep, and increases EEG delta power during NREM sleep [18,29,32,41,42,49]. The POA/BF network induces EEG and behavioral deactivation, in part, through suppression of arousal systems. POA/BF warming suppresses discharge of putative wake-promoting neurons recorded in the posterior lateral hypothalamus [22], magnocellular basal forebrain [2] and mesencephalic reticular formation [11].

One component of the brainstem arousal system is the ascending serotonergic neuronal system originating in the dorsal and median raphe nuclei. Projections from the POA/BF to the DRN have been described recently [39]. We hypothesized that the DRN arousal system may be inhibited by POA/BF neurons that can be activated during warming. The second aim of the present study was to examine the hypothesis that POA/BF warming will inhibit the discharge of putative DRN serotonergic neurons in behaving rats.

## 2. Materials and methods

Experiments were carried out in 5 adult male Sprague-Dawley rats weighing 300–350 g at the surgery time. All experiments were conducted in accordance with the National Research Council Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Under deep anesthesia [a mixture of ketamine (80 mg/kg)+xylazine (10 mg/kg) i.p.] and using aseptic conditions, rats were surgically prepared for chronic recording of DRN neuronal activity across the sleep-waking cycle.

For polysomnographic determination of sleep-waking state, four stainless steel machine screws were placed into the skull (2 over frontal bones and 2 over parietal bones) to record the electroencephalogram (EEG) and 3 teflon-coated stainless steel wires were inserted into the dorsal neck muscle to record electromyogram (EMG). One frontal-parietal EEG electrode pair was selected for use in polygraphic studies. For recording of extracellular unit activity, a single 23 G stainless steel cannula attached to a

mechanical microdrive was stereotaxically placed with its tip 3 mm above DRN (AP  $-7.8$ , L  $0.0$ , H  $5.8$ ; see [38]). Five pairs of microwires (25  $\mu\text{m}$  insulated stainless steel wires, glued together except for 2 mm at the tip) were introduced through the cannula. A stainless steel water perfused thermode (21 G) was implanted into the POA/BF. To record the temperature near the thermode, a thermocouple re-entry stainless steel tube (23 G) was placed next to the thermode (1.0 mm of separation).

Experiments were started at least 4 days after surgery. Each rat was studied for 3–4 weeks. Neuronal discharge was obtained from bipolar DRN derivations. The microdrive was advanced in 25  $\mu\text{m}$  steps until isolated single units with signal/noise ratio  $\geq 2$  were found, as confirmed by oscilloscopic traces. Typically, the microdrive was advanced 100–150  $\mu\text{m}$  per day. Action potentials were discriminated from background activity by a window discriminator (SA Instrumentation, San Diego, CA, USA). The pulse output of the level detector was displayed on a polygraph along with EEG, EMG and hypothalamic temperature. In addition, these signals were digitized and stored on disk for subsequent off-line analysis (Cambridge Electronic Design [CED] micro 1401, UK; Spike 2 software). Multiple spikes, when present, were sorted on the basis of spike parameters (spike amplitude, duration, waveform shape), from the amplified microwire signals. A predetermined spike shape template based on these parameters was used to select spikes throughout each experiment. After sorting, averaged spike waveforms were derived from samples of 30 to 60 spikes. Spike waveform parameters were determined from averaged waveforms with noise levels eliminated by averaging. The triphasic spike waveform duration was measured from the initial inflection to the point at which the after-potential returned to baseline.

The response of DRN neurons to POA/BF warming was tested during waking by recording firing rate at baseline temperature, after stabilization of temperature at 1.5–2.0°C above baseline temperature, and following return of temperature to baseline. Each sample was 60–90 s in duration.

### 2.1. Histology

At the end of last recording session, rats were deeply anesthetized with pentobarbital (100 mg/kg, i.p.), perfused through the heart with phosphate buffered saline followed by 4% paraformaldehyde. Frozen sections (40  $\mu\text{m}$  in thickness) were cut. The positions of the microwire tracts were histologically identified in Nissl stained sections and the distribution of the recorded neurons were plotted (see Fig. 1).

### 2.2. Data analysis

Each isolated neuron was recorded continuously through 2–3 complete sleep-waking cycles. Waking, NREM and

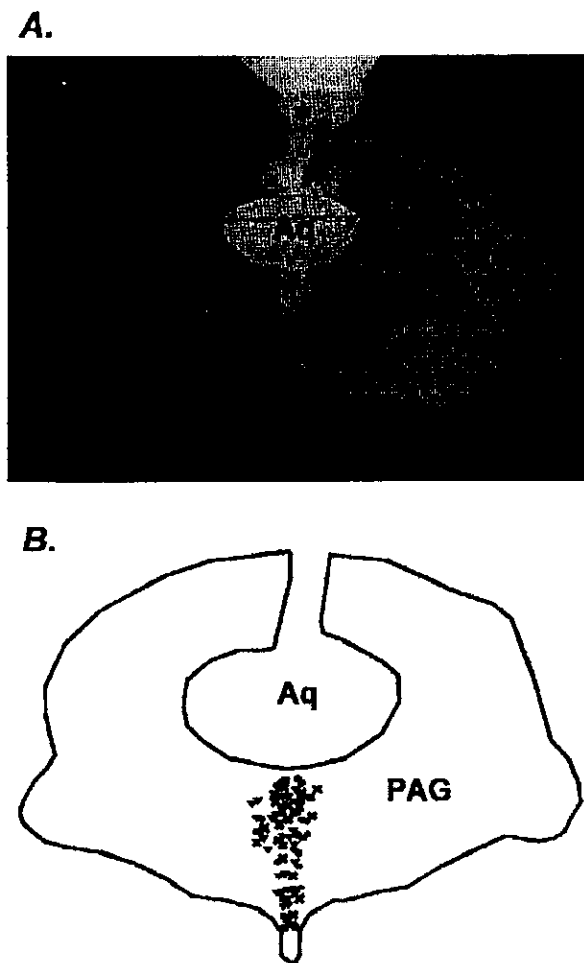


Fig. 1. Example of a microwire pass through the DRN and the anatomical distribution of the recorded neurons. (A) Photomicrograph of a Nissl stained coronal section through the DRN showing the microwire tracts. The arrows indicate the microwire tracts and the star indicates the space occupied by the microdrive guide cannula. (B) A camera lucida drawing of the section shown in "A" with the location of recorded neurons. Triangles represent putative serotonergic neurons exhibiting the so-called REM-off pattern, squares represent sleep-related neurons, crosses represent state-indifferent and circles represent wake-related neurons. Note that putative serotonergic neurons are mixed with other types of neurons with no apparent grouping. Abbreviations: Aq, cerebral aqueduct; PAG, periaqueductal gray matter.

REM sleep were scored in 30 s epochs on the basis of EEG and EMG patterns according to standard criteria [51]. The mean discharge rate per second during waking, NREM and REM sleep was calculated from 30 to 1155 s epochs from 2 to 3 sleep-waking cycles. The mean epoch durations in seconds ( $\pm$ S.E.M.) during waking, NREM sleep, and REM sleep were  $283.95 \pm 31.19$  (range 30–1155 s),  $365.42 \pm 18.62$  (range 30–974 s), and  $136.91 \pm 6.49$  (range 30–212 s), respectively. Neurons were classified as wake-related if their NREM/Wake discharge ratio was  $\leq 0.8$ , as NREM sleep-related if NREM/Wake discharge ratio was  $\geq 1.2$ , and state-indifferent if NREM/Wake discharge ratio

was  $>0.8$  and  $<1.2$ , according to criteria previously established [2].

Identification of putative serotonergic neurons (PSNs) was based on following parameters: (1) wake related firing pattern; (2) action potentials of relatively long duration ( $>2$  ms); (3) marked suppression of activity during REM sleep; and (4) histological localization of recorded neurons in the region of the DRN. In addition the response to systemic administration (0.01 mg/kg, dissolved in saline; [5,14]) of the selective 5-HT<sub>1A</sub> agonist, 8-OH-DPAT (Research Biochemicals International Natick, MA) was determined in 5 neurons.

The neurons were identified as responsive to POA/BF warming if they exhibited at least 10% change compared with their baseline firing rate per  $^{\circ}\text{C}$  change in POA/BF temperature ( $\% \text{change}/^{\circ}\text{C}$ ), as previously established [2]. Most of the neurons were tested for sensitivity to repeated warming trials during waking. Individual neuronal responses to POA/BF warming were determined by averaging the  $\% \text{change}/^{\circ}\text{C}$  during all warming trials.

Since changes in behavioral state could alter DRN neuron discharge rate during POAH warming, behavior and EEG recordings were carefully monitored during baseline, warming, and recovery periods. Wakefulness was maintained during trials by gentle cage tapping. Warming trials during which animals exhibited changes in behavior or arousal were discarded. In order to rule out the possibility that during warming trials, changes in discharge rate were due to the subtle EEG changes, power spectral analysis by fast Fourier transformations (FFTs) was performed on 50 s blocks of EEG wave forms selected randomly from different rats during baseline, warming, and recovery periods. Average power in delta (0.3–4 Hz) and theta (4.5–8 Hz) ranges from six warming trials were calculated. Finally, the percent change in delta and theta power during warming and recovery were calculated relative to baseline values.

For those neurons classified as putative serotonergic, we determined discharge rates during the wake to sleep transition [50] and during NREM to REM sleep transitions, as follows. We selected consolidated periods of waking (from 60 to 100 s in duration) that preceded a consolidated period of NREM sleep (from 60 to 100 s in duration). Discharge rate was then determined during the immediate wake to sleep transition period, defined as the 20–25 s period immediately preceding the initial signs of EEG synchrony, and compared to the 20–25 s from initial segment following onset of EEG synchrony. In the same way we identified segments from 60 to 100 s of NREM sleep preceding the onset of REM sleep. This pre-REM NREM sleep segment was divided into four segments. Mean discharge rates were calculated for each of these four NREM segments and the initial 25 s of REM sleep. The onset of REM sleep was defined as the onset of EEG desynchronization and presence of muscle atonia. In addition we calculated rates from 50 s of sustained waking

(defined as waking episode of at least 120 s duration) for comparison with discharge rates during transitions.

The Student's independent *t*-test and Student's paired *t*-test were used to determine statistical reliability of variables between two different groups and variables within the group, respectively; results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.

### 3. Results

Data were obtained from 75 neurons recorded in DRN. The details of the findings regarding different neuronal groups encountered are summarized in Table 1. Wake-related neurons represented 64% of the total sample ( $n=48$ ). From this group a total of 24 neurons were classified as PSNs according to our criteria (Table 2, see Materials and methods). This population of PSNs exhibited a 69% reduction in discharge rate during NREM sleep and 93% reduction in REM sleep compared to waking (see Fig. 2). During waking, rates varied over a narrow range as described previously in cats (Fig. 1, see introduction for references). The REM-off behavior of these neurons was notable, but the 69% reduction in discharge in NREM sleep from waking rates was also significant.

Mean spike duration of PSNs was significantly longer than wake-related non-PSNs ( $2.88 \pm 0.09$  ms vs.  $1.99 \pm 0.07$ ;  $P < 0.01$ , independent *t*-test), state-indifferent neurons ( $2.88 \pm 0.09$  ms vs.  $2.03 \pm 0.07$ ;  $P < 0.01$ , independent *t*-test) and sleep-related neurons ( $2.88 \pm 0.09$  ms vs.  $1.84 \pm 0.11$ ;  $P < 0.01$ , independent *t*-test). Examples of the long action potential waveforms are shown in Figs. 4, 5 and 7.

The response of 5 neurons to systemic injection of 8-OH-DPAT was determined. Waking discharge of these neurons declined dramatically beginning within 3–5 min

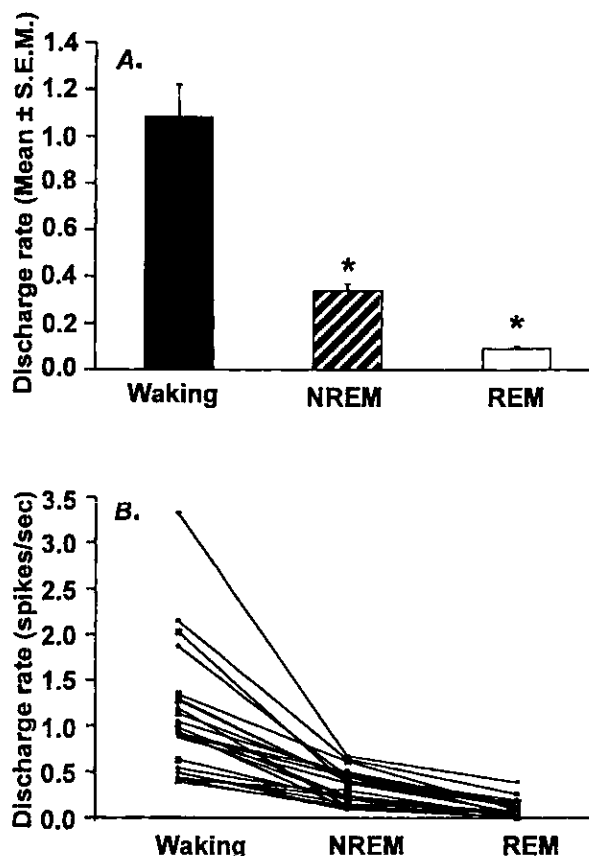


Fig. 2. Sleep-wake discharge profile of putative serotonergic neurons. (A) Mean discharge rate of putative serotonergic neurons ( $n=24$ ) across sleep-waking cycle. These neurons as a group exhibited significant decreases in discharge rate from waking to NREM sleep, waking to REM sleep and from NREM to REM sleep (\*  $P < 0.001$ , paired *t*-test). This discharge rate profile across the sleep-waking cycle is similar to those described previously in behaving cats. (B) Discharge rate of individual putative serotonergic neurons across the sleep-waking cycle.

Table 1  
Discharge pattern of neurons recorded in DRN

	<i>n</i> <sup>a</sup>	Waking	NREM sleep	REM sleep	NREM/Wake ratio
Putative serotonergic neurons (PSNs)	24	1.08 $\pm$ 0.14	0.33 $\pm$ 0.12	0.09 $\pm$ 0.03	0.35 $\pm$ 0.03
Wake-related non-PSNs	24	2.51 $\pm$ 0.34	1.23 $\pm$ 0.20	2.14 $\pm$ 0.36	0.46 $\pm$ 0.03
Sleep-related neurons	9	0.28 $\pm$ 0.09	0.50 $\pm$ 0.13	0.99 $\pm$ 0.58	3.45 $\pm$ 1.46
State-indifferent neurons	18	1.51 $\pm$ 0.40	1.47 $\pm$ 0.37	2.02 $\pm$ 0.60	0.97 $\pm$ 0.02

<sup>a</sup> *n* = Number of neurons.

Table 2  
Criteria used for classification of putative serotonergic neurons ( $n=24$ )

	Waking	Quite waking	NREM	REM	NREM/Waking ratio	Action potential duration (ms)	Percent decrease from waking to REM
Mean	1.08	0.67 <sup>b</sup>	0.33*	0.09*	0.35	2.88	92.58%
S.E.M.	0.14	0.12	0.03	0.01	0.03	0.09	0.83
Range	0.4–3.32	0.25–1.63	0.1–0.68	0.006–0.39	0.1–0.73	2.0–3.4	88.4–98.4

<sup>b</sup>  $n=12$ .

\*  $P < 0.001$  for W vs. NREM sleep, W vs. REM sleep and NREM vs. REM sleep. Paired *t*-test.

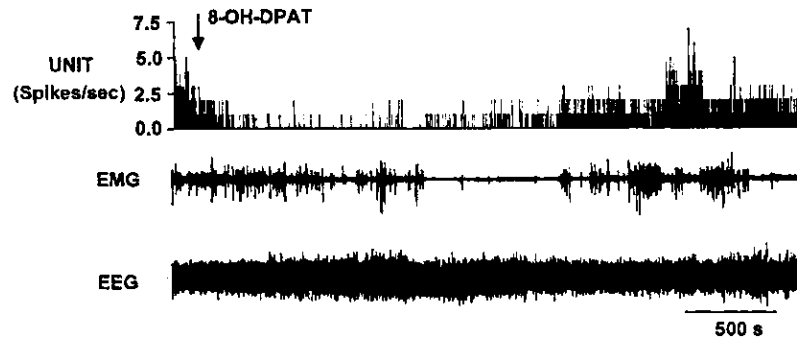


Fig. 3. Effects of 8-OH-DPAT on discharge rate of a DRN putative serotonergic neuron. The effect of subcutaneous administration of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist, 8-OH-DPAT (0.01 mg/kg) on the discharge of a DRN neuron. Neuronal discharge is displayed as a rate histogram (bin width 1 s, top trace). The arrow indicates the time of injection. A marked reduction in the discharge rate of this neuron beginning after 5 min of injection can be seen. Discharge returns to baseline level after about 45 min. EEG, electroencephalogram; EMG, nuchal electromyogram.

and lasted 35–45 min after 8-OH-DPAT administration (see Fig. 3). The mean maximum reduction in discharge rate after 8-OH-DPAT was 97% ( $1.72 \pm 0.50$  vs.  $0.05 \pm 0.05$  spikes/s).

Reconstruction of electrode tracks is shown in Fig. 1. All neurons were recorded within the DRN. It is worth noting that even within the DRN, 68% of recorded neurons did not meet criteria for PSNs (see Table 1). The remaining population included neurons that exhibited a lower rate in NREM sleep, but increased discharge in REM sleep (32%), state-indifferent neurons (24%), and an interesting group of sleep-related neurons (12%) whose rate profile was opposite to that of putative serotonergic neurons, that is progressively increasing rate from wake to NREM and in some cases, to REM sleep.

Discharge rate changes across successive sleep-wake

cycles were stable in each neuron. A typical neuron recorded across 2 sleep-waking cycles is illustrated in Fig. 4. This 50 min recording includes two typical 2.5 min of REM sleep periods, identified by episodic elevation of brain temperature, as well as EEG and EMG criteria. Waking discharge was higher than NREM sleep discharge. Regarding the regularity or “clock like” properties of DRN neurons reported previously [44] we found neurons that exhibited very regular discharge as well as neurons that displayed less regular discharge as demonstrated by interval histograms (see Fig. 5). Both highly regular and less regular neuron types exhibited a similar discharge pattern through the sleep-waking cycle, including REM-off behavior.

Fig. 6 shows the discharge rates of twenty PSNs during transitions from waking to NREM sleep and from NREM

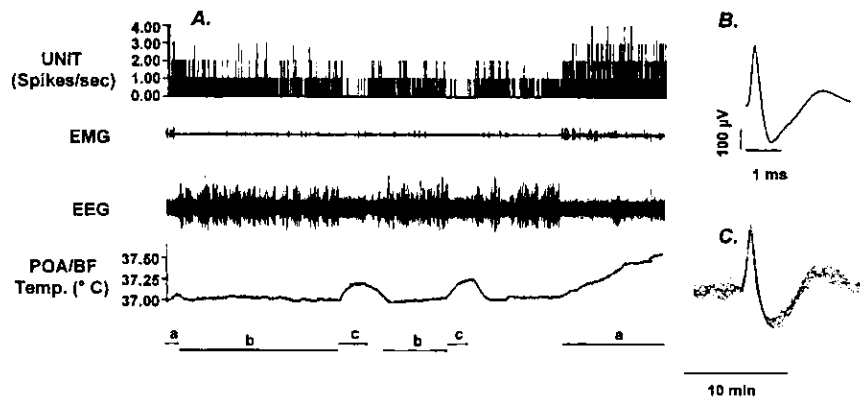


Fig. 4. The discharge pattern and spike characteristics of a putative serotonergic neuron. (A) Neuronal discharge of a putative serotonergic neuron across 2 sleep-waking cycles including 2 REM sleep periods (total of 3100 s of recording). Neuronal discharge is displayed as a rate histogram (bin width 1 s, top trace). This neuron exhibited the highest discharge during waking (line ‘a’), declining discharge during NREM sleep (line ‘b’) and near cessation in discharge during REM sleep (line ‘c’). Note the changes in the POA/BF temperature associated with sleep-wake state. During REM sleep, brain temperature rises episodically, but it falls again during subsequent NREM episodes. There is a sustained increase of POA/BF temperature during waking. (B) The averaged action potential of the neuron recorded in this example. Note the long duration of the action potential as described previously for putative serotonergic neurons. (C) The superimposed waveforms of 12 individual spikes of the recorded neuron shown in this example, showing the background signal variations. This figure emphasizes the point that spike amplitude greatly exceeded the background noise level and the template sorted the same spike across the experiment. EEG, electroencephalogram; EMG, electromyogram; POA/BF Temp., temperature recorded from preoptic area and adjacent basal forebrain.

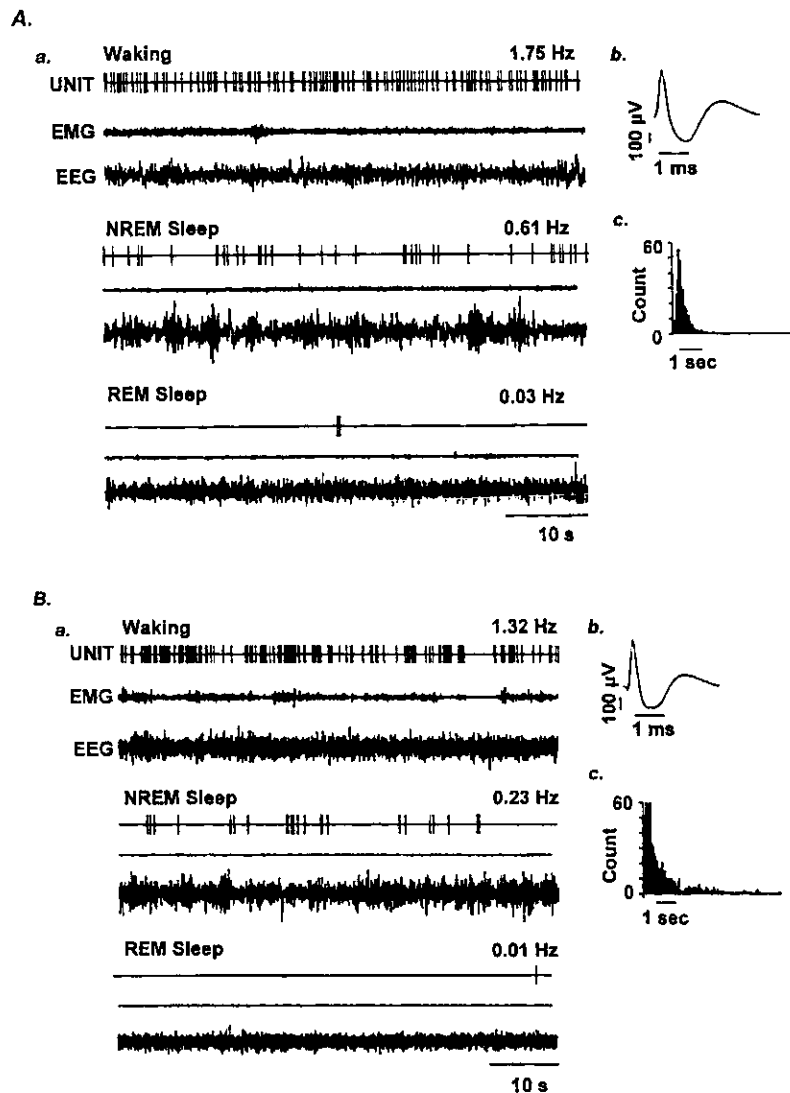


Fig. 5. Discharge patterns of DRN "REM-off" neuronal types. Discharge of two putative serotonergic neurons (from two different rats) during 60 s plots across the sleep-waking cycle. The neuron in "A" exhibited a more regular discharge pattern than neuron in "B", though these neurons exhibited similar discharge patterns across the sleep-waking cycle. (a) Shows the discharge rates of the neurons during each states; (b) action potential waveforms of the neurons and (c) interspike interval histograms corresponding to the same two units recorded. The time base is 50 ms/bin. The interval histogram of the less regular neuron includes long intervals [B(c)] not seen in the regular neuron [A(c)]. Histograms are based on 450 spikes. EEG, electroencephalogram; EMG, electromyogram.

to REM sleep. There was a significant decrease in discharge rate at the immediate wake/NREM transition. The lowest NREM sleep rates were observed just prior to REM sleep onset, but discharge rate further decreased significantly during REM sleep. In twelve neurons it was possible to measure the firing rate during short periods of quiet waking (see Table 2). Rates during quiet waking were lower than active waking rates.

### 3.1. Effects of POA/BF warming

The effect of POA/BF warming was examined in 68 neurons (90.66%). Of these, 47 (69.11%) met the criterion

for responsiveness to POA/BF warming. An example of a warming trial conducted on a PSN is shown in Fig. 7. In this case waking discharge was reduced by 64% during warming. As in this example, changes in discharge rate in response to POA/BF warming were always time-locked to the warming stimulus. A 1.5–2.0°C POA/BF warming stimulus was used because it increases warm-sensitive neuronal discharge to a level approaching that occurring during spontaneous NREM sleep (see discussion).

Fig. 8 shows the mean discharge suppression induced by 1.5 2°C of POA/BF warming stimuli in all PSNs and wake-related non-PSNs. Details of results of POA/BF warming experiments are summarized in Table 3. A total

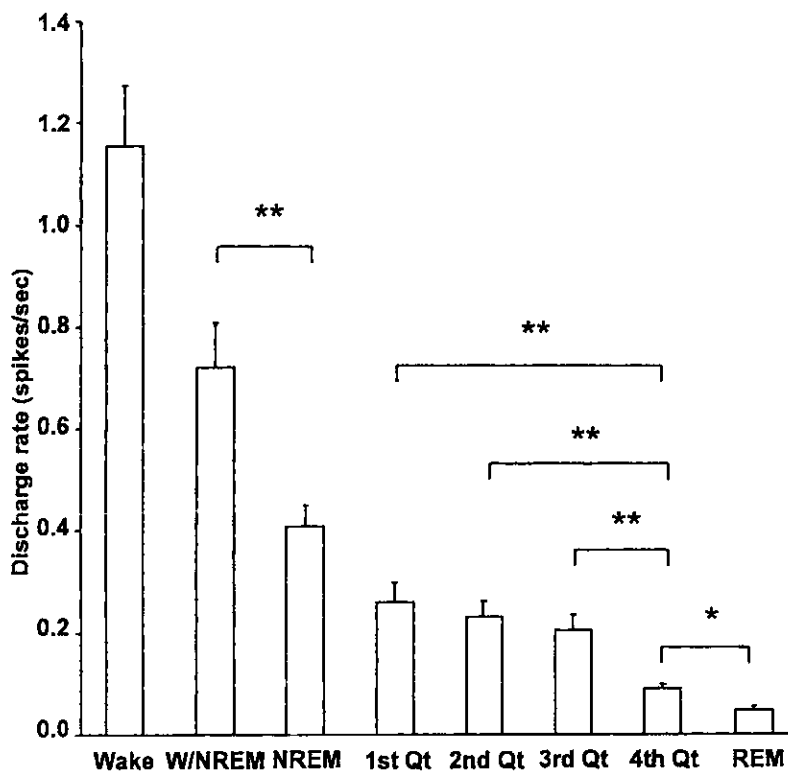


Fig. 6. Discharge rate changes in putative serotonergic neurons during wake-NREM-REM transition. Discharge rates (spikes/s) during waking/NREM sleep and NREM/REM sleep transitions. W/NREM represents the 25 s prior onset of EEG synchrony, NREM is the first 25 s following sleep synchrony onset, and each Qt represents 15–25 s NREM epochs prior to REM sleep onset (see methods). Note the gradual decrease in the discharge rate of these neurons during transitions. Wake represents 50 s of unambiguous waking (from a wake episode of at least 120 s) for comparison with discharge rates during transitions. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.001$  (paired *t*-test).

of 20 PSNs and 22 wake-related non-PSNs were examined for their responsiveness to POA/BF warming. Among PSNs, a majority of neurons ( $n = 14$ , 70%) exhibited

decreased discharge (mean discharge suppression,  $-25.27 \pm 4.58\% / ^\circ\text{C}$ ), five neurons exhibited increased discharge ( $28.1 \pm 6.04\% / ^\circ\text{C}$ ), and one neuron did not

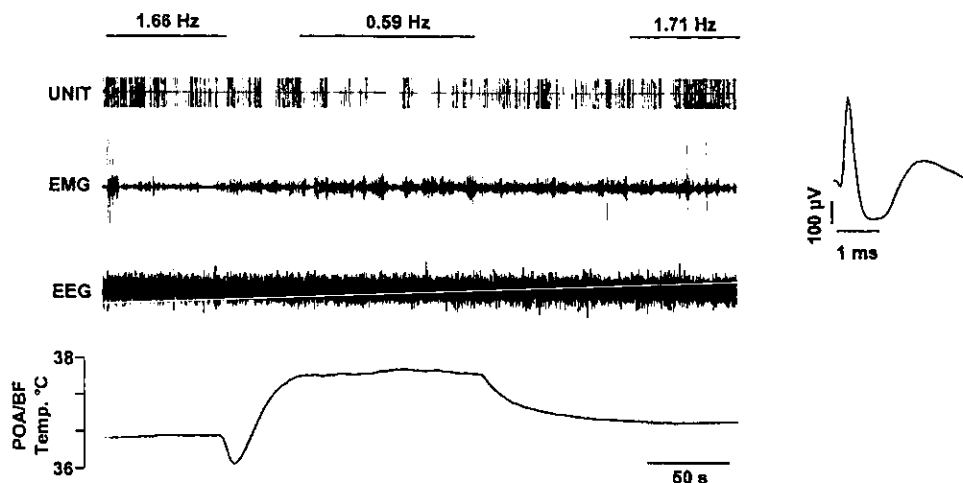


Fig. 7. An example of a warming trial testing the response of a putative serotonergic neuron to POA/BF warming during wakefulness. Shown from top to bottom are extracellular unit activity of a putative serotonergic neuron, dorsal neck muscle EMG, cortical EEG, and POA/BF temperature. EEG and EMG recordings indicate that the animal was in the same state throughout the test. This neuron exhibited a 64% decrease in its firing rate during the warming trial. Discharge rate is expressed in Hz (top). Averaged spike waveforms are shown on the right.

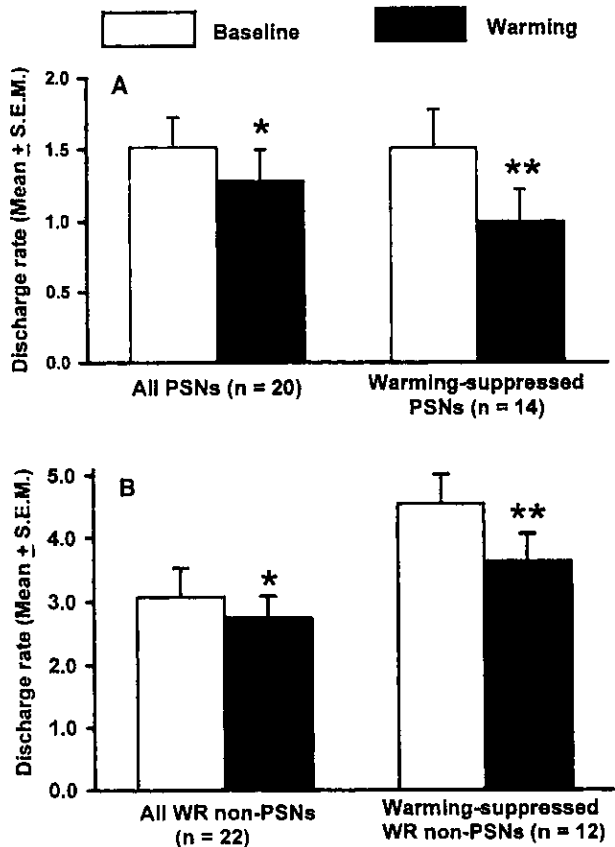


Fig. 8. Effects of POA/BF warming on the discharge rate of putative serotonergic neurons (PSNs) and wake-related non-PSNs. The discharge rate of PSNs (A) and wake-related non-PSNs (B) during baseline (blank bars) and during POA/BF warming (filled bars). Both PSNs and wake-related non-PSNs exhibited significant discharge suppression in response to POA/BF warming. Neurons that were not suppressed by POA/BF warming may be regulated by POA/BF inputs contralateral to our warming probe. To better assess the strength of the POA/BF warming effect, we have separated the sub-group of neurons exhibiting warming-induced discharge suppression. These are shown on right side of figures (A) and (B). In both PSNs and wake-related non-PSNs, a majority of neurons exhibited warming-induced discharge suppression. The responsive subset of PSNs exhibited a 25.3%/°C discharge suppression and the responsive subset of wake-related non-PSNs exhibited a 43.0%/°C discharge suppression. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P \leq 0.01$  level of significant decrease (paired *t*-test).

exhibit any change in response to POA/BF warming. Among wake-related non-PSNs, a majority of neurons ( $n=12$ , 54%) exhibited decreased discharge (mean discharge suppression,  $-43.04 \pm 6.71\%/^{\circ}\text{C}$ ), five neurons exhibited increased discharge ( $43.48 \pm 16.55/^{\circ}\text{C}$ ), and 5 neurons were not responsive to POA/BF warming. As a group, both PSNs and wake-related non-PSNs, exhibited significant discharge suppression in response to POA/BF warming, though, as noted above, both neuronal groups contained subgroups of neurons exhibiting increased, decreased or non warm-responsive neurons. State-indifferent neurons and sleep-related neurons were not consistently affected by POA/BF warming.

To determine if POAH warming evoked subtle changes in EEG state that could not be detected in the raw EEG tracings, EEG power spectral analyses of delta (0.3 to 4 Hz) and theta ranges (4.5 to 8 Hz) were calculated during baseline, warming and recovery for six representative warming trials (Fig. 9). EEG delta and theta powers during warming were not significantly different from their values during baseline and recovery periods. During the recovery period though there was an increase in delta power but that change was not statistically significant.

#### 4. Discussion

The electrophysiological properties of the putative serotonergic neurons analyzed in this study are consistent with the electrophysiological properties of putative serotonergic neurons reported in previous studies in unrestrained and unanesthetized cats [25,30,52]. These characteristics include: (1) low spontaneous firing rate during waking; (2) a long duration action potential (see Table 2); (3) steady decline in discharge rate across the sleep-wake cycle, which was significant when comparing wake vs. NREM sleep, wake vs. REM sleep, and NREM vs. REM sleep; (4) exhibition of a marked discharge suppression during REM sleep (see Fig. 2); (5) inhibition of spontaneous unit activity after systemic injection of the 5-HT<sub>1A</sub> agonist 8-OH-DPAT; and (6) location of electrode tracks in the DRN. We found some neurons that exhibited more

Table 3  
Effects of POA/BF warming on DRN neurons (Mean ± S.E.M.)

	<i>n</i> <sup>1</sup>	Responsive to POA/BF warming	Mean response to POA/BF warming (%/°C)	Number of cells with decrease/increase in response to POA/BF warming
Putative serotonergic neurons (PSNs)	20	19 (79.16%)	$-10.47 \pm 6.33$	14/5
Wake-related non-PSNs	22	17 (77.27%)	$-13.51 \pm 9.20$	12/5
Sleep-related neurons	9	2 (22.22%)	$14.37 \pm 11.60$	0/2
State-indifferent neurons	18	9 (50%)	$-0.19 \pm 4.99$	6/3

<sup>1</sup> *n*—Number of neurons tested for POA/BF warming.

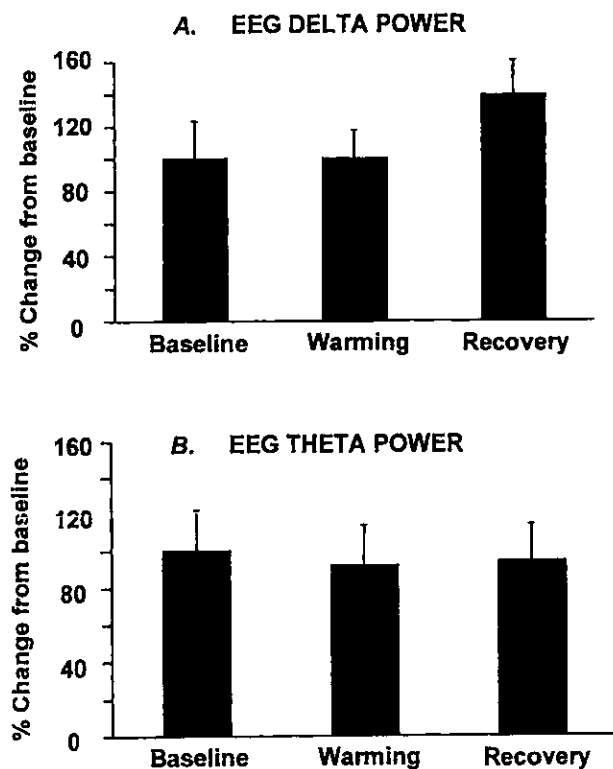


Fig. 9. Effects of warming on EEG spectral power. Percent change in EEG power in delta (0.3 to 4 Hz; A) and theta ranges (4.5 to 8 Hz; B) during warming and recovery periods as compared to respective baseline values taken as 100%. The changes in EEG delta and theta power during warming and recovery were not significantly different from their values during baseline.

regularity in waking discharge than others, in agreement with previous reports [21,31,44]. However, neurons with either very regular and less regular discharge exhibited the REM-off discharge pattern, long spike waveforms, and were located in DRN. It has also been reported previously in cats that DRN neurons exhibit a progressive decline in the activity during NREM preceding REM sleep [25,26]. In rats, lowest discharge rates were also observed in NREM sleep just prior to REM sleep onset. We also found significant reductions in discharge rate during wake to NREM sleep transitions in rat. Thus, the neurons recorded in our study exhibited a strikingly similar pattern to neurons recorded in behaving cats.

The inhibitory response of putative serotonergic neurons to the selective 5-HT<sub>1A</sub> agonist, 8-OH-DPAT, is hypothesized to stem from binding to inhibitory 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors [46] that are localized on DRN serotonergic neurons [45]. In awake cats, inhibition of DRN putative serotonergic neuronal discharge after IV administration of 8-OH-DPAT is rapid, beginning within 20 s, and is reduced by pretreatment with 5HT<sub>1A</sub> antagonists [7,14]. These studies support the interpretation that systemic 8-OH-DPAT has rapid access to the brain and direct effects on DRN neurons. The present study confirmed in rats that

putative serotonergic neurons exhibit strong inhibition after subcutaneous 8-OH-DPAT administration

This study extends a previous report of DRN neurons recorded in behaving rats exhibiting the so-called REM-off pattern described previously in cats [21]. The earlier study described 8 neurons with rates ranging from 0.9 Hz to 10 Hz during waking which exhibited greatly reduced discharge in NREM sleep and still lower discharge in REM sleep [21]. These results provide a basis for the interpretation of serotonin pharmacological studies of sleep employing rats (e.g., [6]). During waking, our REM-off neurons discharged somewhat more slowly than those reported in cats. Further studies will be necessary to assess if additional properties found in cats are also exhibited in rats. It should be noted that we assessed responses to 8-OH-DPAT only in REM-Off neurons in order to compare our findings with those reported in the cat. We cannot exclude the possibility that some non REM-off neurons exhibit responses to 8-OH-DPAT. Of 75 DRN neurons studied, 32% were classified as putative serotonergic. Only approximately one third of the neurons in the DRN are serotonergic [12] and serotonergic neurons are mixed with GABAergic neurons in the raphe nuclei of rats [24,47].

The interpretation that neurons exhibiting progressive decreases in discharge from wake to NREM to REM sleep are serotonergic is supported by studies in rats and cats showing that the release of serotonin in target sites exhibits a parallel decline across the wake-sleep cycle (e.g., [40,53]). Although REM-off behavior is a striking attribute of putative serotonergic neurons, our analyses showed the progressive nature of the changes across the sleep cycle. Discharge during quiet waking was lower than in active waking. Discharge declined in the wake episode preceding NREM onset, declined progressively within NREM sleep, and declined further in the NREM episode preceding REM sleep. These findings are consistent with the hypothesis of Jacobs and Fornal that serotonergic neuronal discharge is associated with motor activity or muscle tone [19,20]. Quiet waking is distinguished from active waking by a reduction in motor activity. Muscle tone declines progressively with NREM sleep and is strongly inhibited in REM sleep [10].

In this study we found that most of the neurons recorded in DRN (64%) were wake-related. During POA/BF warming this group exhibited a significant reduction in their firing rate. We observed similar significant discharge reduction in the putative serotonergic neurons. Fourteen of 20 putative serotonergic neurons exhibited reduction of their discharge during POA/BF warming. The slowing of the DRN neuronal discharge was coincident with POA/BF warming. The reduction of DRN neuronal discharge induced by POA/BF warming cannot be attributed to subtle changes in state such as a shift to drowsiness. Normally, drowsiness is associated with observable EEG slowing. We carefully maintained wakefulness during our warming experiments by observing the animal and con-



comitant EEG activity and applying gentle stimulation such as cage tapping if necessary. EEG power spectral analyses comparing EEG activity during baseline, POA/BF warming, and recovery revealed no evidence of EEG slowing during brief warming trials (see Fig. 9). In the absence of mild arousing stimulation sustained POA/BF warming would be expected to induce sleep onset and associated DRN slowing [16]. Our findings suggest that DRN slowing can be dissociated from EEG changes through the use of gentle stimulation. This is plausible since multiple arousal systems regulate thalamocortical networks that generate EEG slow wave activity, and all of them may not be controlled by POA/BF outputs.

Previous works in cats showed that whole body warming did not change DRN serotonergic neuronal discharge [13]. In addition, pyrogen-induced hyperthermia (fever) was not associated with either changed DRN discharge or changed release of serotonin in the POA if behavioral state was constant [53]. The studies of pyrogen-induced hyperthermia are compatible with our results since pyrogens were found to induce hyperthermia, in part, by inhibiting POA warm-sensitive neurons (WSNs), both *in vivo* and *in vitro* (e.g., [9,35]). Since WSNs are inhibited rather than excited by pyrogens, we would not predict pyrogen-induced reduction of DRN neuronal discharge. Whole body warming might be expected to activate WSNs, but the populations of WSNs affected may depend on the intensity of the thermal load. Mild whole body warming increases sleep in several species (e.g., [32]). However, in the study of Fornal et al. [13], noted above, hyperthermia was induced by raising ambient temperature to 43°C. This high ambient temperature suppresses sleep and induces agitation in the cat [49], and causes progressively increasing brain temperature in spite of thermoregulatory responses such as panting [13]. Thus, different sets of WSNs may be activated by mild as compared to strong thermal stimuli. According to this hypothesis, mild warming stimuli activate sleep-promoting POA WSNs and associated DRN discharge suppression whereas strong heat activates other thermoregulatory responses and induce behavioral arousal without DRN slowing. Such a mechanism would be adaptive, since sleep can induce lower body temperature in moderate ambient temperatures [16] but at high ambient temperatures other behavioral strategies such as escape are required to avoid hyperthermia.

Local warming of the POA/BF is hypothesized to enhance NREM sleep occurrence in part by suppression of arousal-related systems. POA/BF warming was shown previously to suppress discharge of putative wake-promoting neurons recorded in the posterior lateral hypothalamus [22], the magnocellular basal forebrain [2] and mesencephalic reticular formation [11]. The suppression in discharge of putative serotonergic as well as other wake-related neurons in DRN by POA/BF warming is consistent with these findings. Taken together, these studies suggest that the POA/BF warm-sensitive hypnogenic system in-

duces sleep by a coordinated inhibition of multiple arousal systems. It is important to point out that although thermal stimuli can be used to activate POA/BF WSNs, the spontaneous sleep-related activation of these neurons is not due to thermal stimuli. Sleep-related activation may be brought about by sleep factors acting in the hypothalamus.

Our results do not show that the effects of POA/BF warming on putative serotonergic neurons reflect a direct inhibitory pathway from POA/BF. However there is some evidence in support of this possibility. GABAergic input to the DRN from medial and lateral preoptic areas has been shown in studies using retrograde labeling and GAD immunostaining [24]. The GABA antagonist, bicuculline, reversed the typical reduction in the activity of DRN neurons during NREM sleep, but did not change neuronal activity during waking [23]. This suggests that a GABAergic input to brain serotonergic neurons becomes activated during sleep and exerts an important inhibitory influence preferentially during this state. Direct GABAergic afferents from the POA/BF to DRN could provide this input. Effects of the POA/BF warming on DRN neurons could also be mediated by indirect pathways through posterior hypothalamus, central gray, or habenula [48].

The extent to which activation of WSNs during sleep is responsible for the sleep-related decrease of DRN neuronal discharge is not established. However, the following points should be considered. The WSN neuronal activation induced by POA/BF warming in our study is well within the range occurring during spontaneous sleep. We previously showed that sleep-active WSNs in the rat diagonal band exhibit a more than doubling of discharge during NREM sleep and a thermosensitivity of 36.7%/°C during waking [4]. Therefore, the change in discharge that occurs during natural NREM sleep is equivalent to that which would be induced by an approximately 3.0°C POA/BF warming stimulus during waking. Putative DRN serotonergic neurons including non-responsive neurons decreased 11%/°C in response to unilateral POA/BF warming during waking (Table 3). On the basis of these calculations, increased WSN discharge during NREM sleep would be expected to induce an approximately 33% decrease in DRN discharge during NREM (3.0°C × 11%, i.e., ~33%). Our POA/BF warming stimulus was unilateral, and natural sleep is associated with bilateral increases in WSN discharge. Some putative serotonergic neurons in our study including the minority of neurons, which were not inhibited by POA/BF warming, could have received direct or indirect afferents primarily from POA/BF sites contralateral to our thermodes. A subset of warm-responsive PSNs exhibited a 25.27% per °C reduction in discharge during warming (see Fig. 8). Therefore, the 50–70% decrease in discharge seen in putative serotonergic neurons during spontaneous NREM sleep could reasonably be induced by the spontaneous activation of POA/BF WSNs. Since activation of WSNs can induce NREM sleep, and lesions of the POA/BF region suppress sleep, it is reasonable to speculate that

the suppression of DRN discharge by POA/BF WSNs is a component of the natural sleep onset process.

## Acknowledgements

This research was supported by V.A. Medical Research Service and National Institute of Mental Health Grants, MH 47480 and HL 60296. Rubén Guzmán-Marín is recipient of a scholarship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) and DGEP-UNAM.

## References

- [1] G.K. Aghajanian, W.E. Foote, M.H. Sheard, Lysergic acid diethylamide: sensitive neuronal units in the midbrain raphe, *Science* 161 (1968) 706–708.
- [2] M.N. Alam, R. Szymusiak, D. McGinty, Local preoptic/anterior hypothalamic warming alters spontaneous and evoked neuronal activity in the magnocellular basal forebrain, *Brain Res.* 696 (1995) 221–230.
- [3] M.N. Alam, D. McGinty, R. Szymusiak, Neuronal discharge of preoptic/anterior hypothalamic thermosensitive neurons: relation to NREM sleep, *Am. J. Physiol.* 269 (1995) R1240–R1249.
- [4] M.N. Alam, D. McGinty, R. Szymusiak, Thermosensitive neurons of the diagonal band in rats: relation to wakefulness and nonrapid eye movement sleep, *Brain Res.* 752 (1997) 81–89.
- [5] B. Bjorvatn, S. Fagerland, T. Eid, R. Ursin, Sleep/waking effects of a selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist given systemically as well as perfused in the dorsal raphe nucleus in rats, *Brain Res.* 770 (1997) 81–88.
- [6] B. Bjorvatn, R. Ursin, Changes in sleep and wakefulness following 5-HT<sub>1A</sub> ligands given systemically and locally in different brain regions, *Rev. Neurosci.* 9 (1998) 265–273.
- [7] B. Bjorvatn, C.A. Fornal, F.J. Martin, C.W. Metzler, B.L. Jacobs, The 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist p-MPPI blocks 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors and increases dorsal raphe unit activity in awake cats, *Eur. J. Pharmacol.* 356 (1998) 167–178.
- [8] J.A. Boulant, J.B. Dean, Temperature receptors in the central nervous system, *Ann. Rev. Physiol.* 48 (1986) 639–654.
- [9] M. Cabanac, J.A. Stolwijk, J.D. Hardy, Effect of temperature and pyrogens on single-unit activity in the rabbit's brain stem, *J. Appl. Physiol.* 24 (1968) 645–652.
- [10] M.H. Chase, D.J. McGinty, M.B. Sterman, Cyclic variation in the amplitude of a brain stem reflex during sleep and wakefulness, *Experientia* 24 (1968) 47–48.
- [11] S.J. De Armond, M.M. Fusco, The effect of preoptic warming on the arousal system of the mesencephalic reticular formation, *Exp. Neurol.* 33 (1971) 653–670.
- [12] L. Descarries, K.C. Watkins, S. Garcia, A. Brouder, The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study, *J. Comp. Neurol.* 207 (1982) 239–254.
- [13] C.A. Fornal, W.J. Litto, D.A. Morilak, B.L. Jacobs, Single-unit responses of serotonergic dorsal raphe nucleus neurons to environmental heating and pyrogen administration in freely moving cats, *Exp. Neurol.* 98 (1987) 388–403.
- [14] C.A. Fornal, W.J. Litto, C.W. Metzler, F. Marrosu, K. Tada, B.L. Jacobs, Single-unit responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT<sub>1A</sub> agonist and antagonist drug administration in behaving cats, *J. Pharm. Exp. Ther.* 270 (1994) 1345–1358.
- [15] S.F. Glotzbach, C.H. Heller, Changes in the thermal characteristics of hypothalamic neurons during sleep and wakefulness, *Brain Res.* 309 (1984) 17–26.
- [16] S.F. Glotzbach, H.C. Heller, Temperature regulation, in: M.H. Kryger, T. Roth, W.C. Dement (Eds.), *Principles and Practice of Sleep Medicine*, W.B. Saunders, Philadelphia, 1994, pp. 260–276.
- [17] C.J. Gordon, J.E. Heath, Integration and central processing in temperature regulation, *Ann. Rev. Physiol.* 48 (1986) 595–612.
- [18] J.A. Home, A.J. Reid, Night-time sleep EEG changes following body heating in a warm bath, *Electroencephal. Clin. Neurophysiol.* 60 (1985) 154–157.
- [19] B.L. Jacobs, C.A. Fornal, 5-HT and motor control: a hypothesis, *Trends Neurosci.* 16 (1993) 346–352.
- [20] B.L. Jacobs, C.A. Fornal, An integrative role for serotonin in the central nervous system, in: R. Lydic, H. Baghdoyan (Eds.), *Handbook of Behavioral State Control*, CRC Press, Boca Raton, 1999, pp. 181–193.
- [21] B. Kocsis, R.P. Vertes, Dorsal raphe neurons: synchronous discharge with the theta rhythm of the hippocampus in the freely behaving rat, *J. Neurophysiol.* 68 (1992) 1463–1467.
- [22] B.L. Krilowicz, R. Szymusiak, D. McGinty, Regulation of posterior lateral hypothalamic arousal related neuronal discharge by preoptic anterior hypothalamic warming, *Brain Res.* 668 (1994) 30–38.
- [23] E.S. Levine, B.L. Jacobs, Neurochemical afferents controlling the activity of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus: microiontophoretic studies in the awake cat, *J. Neurosci.* 12 (1992) 4037–4044.
- [24] P.H. Luppi, C. Peyron, C. Rampon, D. Gervasoni, B. Barbagli, R. Boissard, P. Fort, Inhibitory mechanisms in the dorsal raphe nucleus and locus coeruleus during sleep, in: R. Lydic, H. Baghdoyan (Eds.), *Handbook of Behavioral State Control*, CRC Press, Boca Raton, 1999, pp. 195–211.
- [25] R. Lydic, W. McCarley, J.A. Hobson, The time-course of dorsal raphe discharge, PGO waves, and muscle tone averaged across multiple sleep cycles, *Brain Res.* 274 (1983) 365–370.
- [26] R. Lydic, W. McCarley, J.A. Hobson, Timing function of the dorsal raphe nucleus and the temporal organization of the ultradian sleep cycle, *Exp. Brain Res. Suppl.* 12 (1985) 131–144.
- [27] D. McGinty, R. Szymusiak, The basal forebrain and slow wave sleep: mechanistic and functional aspects, in: A. Wauquier, C. Dugovic, M. Radulovacki (Eds.), *Slow Wave Sleep: Physiological, Pathophysiological and Functional Aspects*, Raven Press, Ltd, New York, 1989, pp. 61–73.
- [28] D. McGinty, R. Szymusiak, Keeping cool: a hypothesis about the mechanisms and functions of slow-wave sleep, *Trends Neurosci.* 13 (1990) 480–487.
- [29] D. McGinty, R. Szymusiak, D. Thomson, Preoptic/anterior hypothalamic warming increases EEG delta frequency activity within non-rapid eye movement sleep, *Brain Res.* 667 (1994) 273–277.
- [30] D.J. McGinty, R.M. Harper, Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleep in cats, *Brain Res.* 101 (1976) 569–575.
- [31] J. Montagne-Clavel, J.L. Oliveras, G. Martin, Single-unit recordings at dorsal raphe nucleus in the awake-anesthetized rat: spontaneous activity and responses to cutaneous innocuous and noxious stimulations, *Pain* 60 (1995) 303–310.
- [32] S. Moraitis, R. Szymusiak, D. Thomson, D. McGinty, Selective increases in nonrapid eye movement sleep following whole body heating in rats, *Brain Res.* 617 (1993) 10–16.
- [33] S. Mosko, B. Jacobs, Recording of dorsal raphe unit activity in vitro, *Neurosci. Lett.* 2 (1976) 195–200.
- [34] M. Nakao, D. McGinty, R. Szymusiak, M. Yamamoto, A thermoregulatory model of sleep control, *Jpn. J. Physiol.* 45 (1995) 291–309.
- [35] T. Nakashima, T. Hori, T. Kiyohara, M. Shibata, Effects of endotoxin and sodium salicylate on the preoptic thermosensitive neurons in tissue slices, *Brain Res. Bull.* 15 (1985) 459–463.
- [36] F. Obal Jr., Thermoregulation during sleep, *Exp. Brain Res. Suppl.* 8 (1984) 157–172.

- [37] P.L. Parmeggiani, D. Cevolani, A. Azzaroni, G. Ferrari, Thermosensitivity of anterior hypothalamic-preoptic neurons during the waking-sleeping cycle: a study in brain functional states, *Brain Res.* 415 (1987) 79–89.
- [38] G. Paxinos, C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, San Diego, 1997.
- [39] C. Peyron, J.M. Petit, C. Rampon, M. Jouvet, P.H. Luppi, Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods, *Neuroscience* 82 (1998) 443–468.
- [40] C.M. Portas, B. Bjorvatn, S. Fagerland, J. Gronli, V. Mundal, E. Sorensen, R. Ursin, On-line detection of extracellular levels of serotonin in dorsal raphe nucleus and frontal cortex over the sleep/wake cycle in the freely moving rat, *Neuroscience* 83 (1998) 807–814.
- [41] B. Roussel, P. Turrillo, K. Kitahama, Effect of ambient temperature on the sleep-waking cycle in two strains of mice, *Brain Res.* 294 (1984) 67–73.
- [42] S. Sakaguchi, S.F. Glotzbach, H.C. Heller, Influence of hypothalamic and ambient temperatures on sleep in kangaroo rats, *Am. J. Physiol.* 237 (1979) R80–R88.
- [43] E. Satinoff, Neural organization and evolution of thermal regulation in mammals, *Science* 201 (1978) 16–22.
- [44] K. Shima, H. Nakahama, M. Yamamoto, Firing properties of two types of nucleus raphe dorsalis neurons during the sleep-waking cycle and their responses to sensory stimuli, *Brain Res.* 399 (1986) 317–326.
- [45] C. Sotelo, B. Cholely, S. El Mestikawy, H. Gozlan, M. Hamon, Direct immunohistochemical evidence of the existence of 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors on serotonergic neurons in the midbrain raphe nuclei, *Eur. J. Neurosci.* 2 (1990) 1144–1154.
- [46] J.S. Sprouse, G.K. Aghajanian, (–)-Propranolol blocks the inhibition of serotonergic dorsal raphe cell firing by 5-HT<sub>1A</sub> selective agonists, *Fur. J. Pharmacol.* 128 (1986) 295–298.
- [47] J.A. Stamp, K. Semba, Extent of colocalization of serotonin and GABA in the neurons of the rat raphe nuclei, *Brain Res.* 677 (1995) 39–49.
- [48] T.L. Steininger, H. Gong, D. McGinty, R. Szymusiak, Preoptic area projections to habenula and thalamic paraventricular nucleus: implications for control of sleep, *Sleep* 22 (1999) 323.
- [49] R. Szymusiak, J. Danowski, D. McGinty, Exposure to heat restores sleep in cats with preoptic/anterior hypothalamic cell loss, *Brain Res.* 541 (1991) 134–138.
- [50] R. Szymusiak, N. Alam, T.L. Steininger, D. McGinty, Sleep-waking discharge patterns of ventrolateral preoptic/anterior hypothalamic neurons in rats, *Brain Res.* 803 (1998) 178–188.
- [51] C. Timofar, N. Negro, W.R. Schmidek, K. Hoshino, C.E.L. deMenezes, T.L. daRocha, Phases and states of sleep in rat, *Physiol. Behav.* 5 (1970) 1057–1062.
- [52] M.E. Trulson, B.L. Jacobs, Raphe unit activity in freely moving cats: correlation with level of behavioral arousal, *Brain Res.* 163 (1979) 135–150.
- [53] L.O. Wilkinson, S.B. Auerbach, B.L. Jacobs, Extracellular serotonin levels change with behavioral state but not with pyrogen-induced hyperthermia, *J. Neurosci.* 11 (1991) 2732–2741.
- [54] A. Wit, S.C. Wang, Temperature-sensitive neurons in preoptic-anterior hypothalamic region: effects of increasing ambient temperature, *Am. J. Physiol.* 215 (1968) 1151–1159.

Experimento 2: Efecto de la administración sistémica de nicotina sobre la actividad de células serotoninérgicas del NDR durante la fase de SMOR en ratas en libre movimiento.

Artículo Anexo:

**Subcutaneous administration of nicotine changes dorsal raphe serotonergic neurons discharge rate during REM sleep.**

Short communication

## Subcutaneous administration of nicotine changes dorsal raphe serotonergic neurons discharge rate during REM sleep

Rubén Guzmán-Marín<sup>a</sup>, Md Noor Alam<sup>b,c</sup>, Stefan Mihailescu<sup>a</sup>, Ron Szymusiak<sup>b,d</sup>,  
Dennis McGinty<sup>b,c</sup>, René Drucker-Colín<sup>e,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-250, 04510 México, D.F., Mexico

<sup>b</sup> Veterans Affairs Greater Los Angeles HealthCare System, 16111 Plummer Street, North Hills, CA 91343, USA

<sup>c</sup> Department of Psychology, University of California, Los Angeles, CA, USA

<sup>d</sup> Department of Medicine, School of Medicine, University of California, Los Angeles, CA, USA

<sup>e</sup> Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-600, 04510 México, D.F., Mexico

Accepted 10 October 2000

### Abstract

In the present study nicotine (0.1 mg/kg, s.c.) increased discharge rate of putative dorsal raphe (DRN) serotonergic neurons of behaving rats during REM sleep (362.61%), without any significant change during waking and non-REM sleep. Since serotonergic DRN neurons gate PGO onset, these results suggest that nicotine-induced suppression of PGO spikes during REM sleep previously reported is achieved through stimulation of dorsal raphe serotonergic cells. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

*Theme:* Neural basis of behavior

*Topic:* Biological rhythms and sleep

*Keywords:* Nicotine; Serotonergic neurons; Dorsal raphe nucleus; REM-off neurons; Single-unit recording

In previous studies we have shown that nicotine suppresses the ponto-geniculo-occipital spikes (PGOs) of rapid eye movement (REM) sleep [21] and improves mood in patients with major depression [17]. It is possible that these effects are serotonin-mediated since pharmacological [8] and electrophysiological [9] studies indicated that serotonergic neurons from the dorsal raphe nucleus (DRN) play a permissive role in PGO spikes generation and most of treatments currently employed in depression increase brain 5-HT traffic [2]. In vitro experiments have shown that nicotine increases discharge rate of 5-HT DRN neurons and 5-HT release in a dose-dependent manner [12,15]. Systemic administration of nicotine in rats facilitates 5-HT release as measured by microdialysis in frontal cortex [19]. However less is known regarding nicotine actions on DRN 5-HT neurons in behaving rats.

In this study, we hypothesize that nicotine increases

discharge rate of putative serotonergic neurons (PSNs) during REM sleep. This may account for PGO spikes suppression [21] and mood improvement previously reported [17]. This hypothesis is supported by the presence of nicotinic receptors in the DRN of rats [18] and by reports showing anatomical projections [5] from PSNs to the PGO wave generator [4].

The present study, therefore, examined the effects of systemic nicotine administration on single-unit activity of PSNs in undrugged and unrestrained rats during the sleep-wake cycle and especially during REM sleep.

Experiments were conducted in six Sprague–Dawley rats (300–350 g). Under deep anesthesia (ketamine [80 mg/kg] + xylazine [10 mg/kg], i.p.) and aseptic conditions, rats were surgically prepared for chronic recording of DRN unit activity along with electroencephalogram (EEG) and electromyogram (EMG) across the sleep–wake cycle, as previously described [7].

In order to record DRN unit activity, stainless steel microelectrodes (20 μm) inserted into a microdrive were

\*Corresponding author. Tel.: +52-5-550-6662; fax: +52-5-550-0904.  
E-mail address: drucker@servidor.unam.mx (R. Drucker-Colín).

sterereotaxically aimed at the DRN (AP  $-7.8$ , L  $0.0$ , H  $4.5$ ). The microdrive was advanced in steps of  $25\ \mu\text{m}$ , until stable single-units (signal:noise, 3:1) were found. For each cell, recordings were performed across 2 to 3 sleep-waking complete cycles for identification of the REM-off pattern.

After baseline recording, nicotine (bitartrate Sigma  $0.1\ \text{mg/kg}$ , dissolved in sodium chloride  $0.9\%$ ) was administered s.c. in a volume less than  $1\ \text{ml}$  [10]. After nicotine administration recordings continued for 2 h. Action potential waveform of individual neurons was continuously monitored during the experiments to ensure that the same cell was recorded.

Mean discharge rate per second (spikes/s) was calculated from 30 s epochs both during baseline and after nicotine injection. Cells were classified as wake-related, sleep-related and as state-indifferent according to its NREM/Wake ratio as previously established [1].

Since previous analysis of the DRN PSNs stated that these cells cease discharge before onset of PGO spikes during the NREM-REM transition, we carried out an analysis of this transition [7]. In order to achieve this goal we selected periods of NREM sleep ( $60\text{--}75\ \text{s}$  in duration) which preceded a REM sleep period (defined by the presence of desynchronization and atonia longer than 1 min), being divided into thirds ( $20\text{--}25\ \text{s}$  each one). The mean discharge rate was calculated in each third as well as the initial  $20\text{--}25\ \text{s}$  of REM sleep.

The final position of the microwires was histologically identified in Nissl-stained sections.

A total of 36 cells were recorded from the DRN. Sixteen of these cells were classified as PSNs according to the criteria previously established [7]. The mean duration of the action potential was  $2.74\pm 0.11\ \text{ms}$ . Firing rates declined progressively across the sleep-wake cycle ( $1.28\pm 0.19\ \text{spikes/s}$  during waking,  $0.45\pm 0.06$  during NREM sleep and  $0.10\pm 0.01$  in REM sleep). The mean percentage of reduction in discharge rate from waking to REM sleep was  $-90.39\pm 1.61\%$ . In addition in six of these presumed serotonergic neurons systemic administration of ( $\pm$ )8-OH-DPAT displayed a marked suppression of unit activity ( $-94.55\pm 3.31\%$ ,  $P\leq 0.01$ , paired  $t$ -test).

The remaining 20 neurons did not meet the criteria for putative 5-HT and were classified as sleep-related ( $n=3$ ), state-indifferent ( $n=5$ ) and wake-related neurons ( $n=12$ ).

The effect of systemic administration of nicotine was examined in all 16 PSNs. Nicotine administration increased discharge rate during REM sleep by  $362.61\pm 145.29\%$  ( $P<0.05$ , repeated measures ANOVA followed by Bonferroni test). No statistical differences were observed in the mean discharge rate during waking and NREM sleep (Fig. 1A). Fig. 2A and B illustrates polysomnographic recordings both during baseline and after nicotine administration of PSNs recorded across the sleep-wake cycle.

There was an increase in discharge rate after nicotine

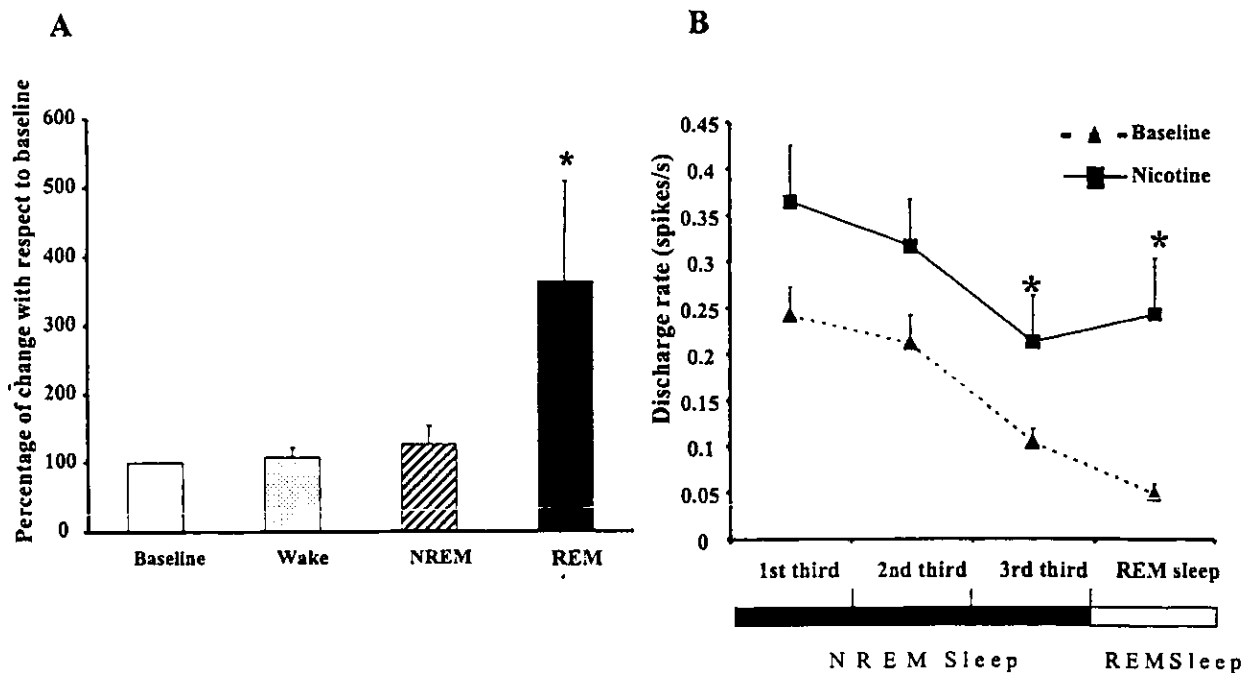
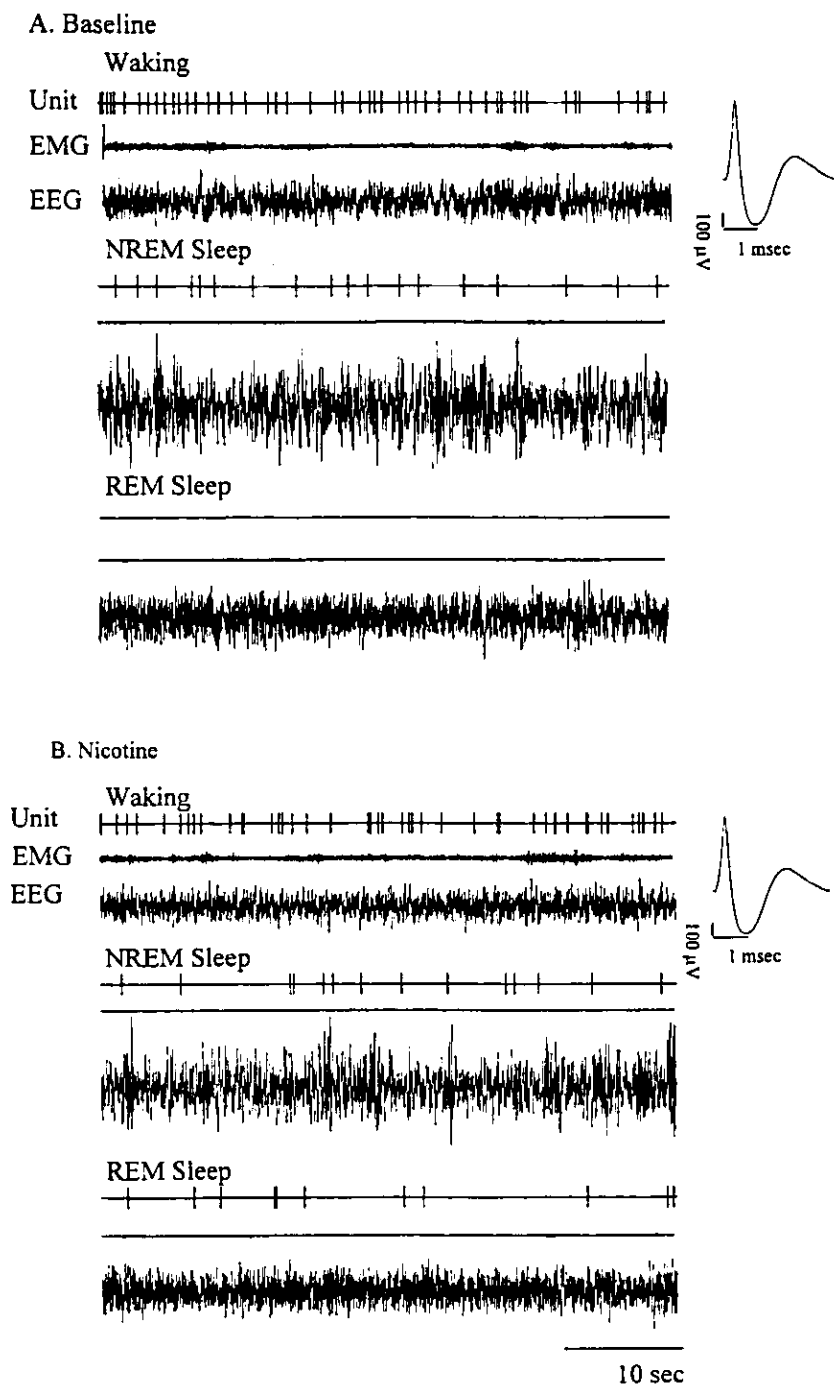


Fig. 1. (A) Nicotine effects on discharge rate. Nicotine effects ( $0.1\ \text{mg/kg}$ , s.c.) on discharge rate of presumed serotonergic neurons recorded across the sleep-wake cycle. Mean discharge rate during baseline was  $1.28\pm 0.19$  in waking,  $0.45\pm 0.06$  in NREM sleep and  $0.10\pm 0.01$  during REM sleep.  $*P<0.05$  (Repeated measures ANOVA followed by Bonferroni test). (B) Analyses of the NREM-REM sleep transition. During baseline there is a progressive decline in discharge rate (spikes/s). After nicotine administration there is an increase in discharge rate (compared with baseline), however, the most significant increase is during the  $20\text{--}25\ \text{s}$  previous to REM sleep onset and the initial  $20\text{--}25\ \text{s}$  of REM sleep.  $*P<0.05$ , unpaired  $t$ -test.



133

134 Fig. 2. Polygraph recording and unit activity of a putative serotonergic neuron. The profile discharge of a presumed serotonergic neuron across the  
 135 sleep–wake cycle. Discharge rate is displayed as unit. (A) Polygraph plot during baseline. Note that during REM sleep this cell almost ceases firing. (B)  
 136 Polygraph plot showing activity from the same cell recorded in A. During REM sleep there is an increase in discharge rate following nicotine  
 137 administration (0.1 mg/kg, s.c.). Abbreviations: EEG, electroencephalogram; EMG, electromyogram.

138 administration during the NREM–REM transition (Fig.  
 139 1B). This increase was significant in the last third of the  
 140 NREM sleep (20–25 s prior to REM sleep onset,  $P < 0.05$ ,  
 141 unpaired  $t$ -test) and the 20–25 initial seconds of the REM  
 142 sleep stage ( $P < 0.05$  unpaired  $t$ -test).

143 The other cell populations (state-indifferent, sleep-re-  
 144 lated and wake-related groups) exhibited a decrease in

discharge rate across the sleep–wake cycle after systemic  
 nicotine administration but this trend was not statistically  
 significant. For those cells classified as wake-related the  
 percentage of reduction during REM sleep after nicotine  
 administration was  $63.95 \pm 17.33$ ,  $77.22 \pm 45.03$  in sleep-  
 related neurons and  $49.45 \pm 10.91$  in stated indifferent  
 neurons.

145

146

147

148

149

150

151

153 Additionally we measured the mean duration of each  
154 REM sleep episode. Nicotine induced an increase in  
155 duration of REM sleep episodes from  $118.09 \pm 3.62$  to  
156  $138.01 \pm 3.51$  s ( $P < 0.05$ , unpaired *t*-test) without signifi-  
157 cantly affecting the frequency of events ( $2.24 \pm 0.16$  during  
158 baseline vs.  $2.38 \pm 0.23$  after nicotine administration).

159 The principal finding of this report is that nicotine (0.1  
160 mg/kg) increased the discharge rate of PSNs during REM  
161 sleep. In addition there was also a significant increase in  
162 firing rate during the NREM–REM sleep transition. Taken  
163 together these data support the view that PGO spikes  
164 suppression [21] and mood improvement by nicotine [17]  
165 is mediated by its stimulatory effect on DRN PSNs during  
166 REM sleep.

167 This interpretation is consistent with the observation of  
168 Jacobs et al. [9], that electrical stimulation of the DRN  
169 during REM sleep suppresses the presence of the PGO  
170 spikes.

171 Aside from the increase in discharge rate during REM  
172 sleep, as mentioned above, it was observed that nicotine  
173 increased discharge rate in the DRN PSNs in the 20–25 s  
174 prior to REM sleep. It has been shown that in cats PGO  
175 spikes appear 30–60 s before REM sleep onset [3],  
176 coincidentally with the lowest discharge level of 5-HT  
177 DRN cells [13,14]. Therefore it is possible that the  
178 increase in discharge rate of DRN PSNs induced by  
179 nicotine during the NREM–REM sleep transition accounts  
180 for the inhibition of PGO spikes. This is consistent with  
181 the report that sertraline (an 5-HT reuptake inhibitor)  
182 decreases the presence of PGO spikes in the NREM–REM  
183 sleep transition [16].

184 Our study also is in agreement with previous reports in  
185 vitro, showing that nicotine increases PSNs discharge rate  
186 as well as serotonin release [15].

187 As concerns sleep-related, state indifferent and wake-  
188 related neurons, the consistent finding in this study was a  
189 reduction in the discharge rate along the sleep–wake cycle  
190 which, however, was not statistically significant. It is  
191 evident that these neurons represent different neuronal  
192 populations, which agrees with reports showing that DRN  
193 neuronal composition is not homogeneous and serotonergic  
194 neurons represent only one third of the neurons in this  
195 nucleus [11].

196 As concerns the influence of nicotine on sleep architec-  
197 ture, the mean duration of each REM sleep period was  
198 increased without affecting the frequency of episodes. No  
199 significant changes were observed during waking and  
200 NREM sleep. Similar findings were reported previously  
201 [10] in studies that used similar doses and routes of  
202 administration. This increase in REM sleep duration along  
203 with an increase in discharge rate of 5-HT neurons seems  
204 paradoxical, since DRN serotonergic neurons inhibit [20]  
205 the pedunculopontine (PPT) and laterodorsal tegmental  
206 (LDT) neurons, generators of REM sleep [6]. In our  
207 experimental conditions however it may be assumed that  
208 nicotine increased REM sleep by directly stimulating PPT

and LDT neurons. The previously reported PGO spike  
suppression by nicotine may be explained by serotonergic  
inhibition of PGO wave generator located in rats in the  
subcoeruleus nuclei [4].

In sum, our study shows that nicotine increases dis-  
charge rate selectively during REM sleep in PSNs. This  
effect could be responsible at least in part for mood  
improvement in-patients with major depression having  
nicotine patches [17] and suppression of PGO spikes [21]  
in cats after nicotine administration.

## Acknowledgements

This work was supported by V.A. Medical Research  
Service. RGM is recipient of a scholarship from the  
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)  
and DGEP-UNAM. Support from the UC-Mexus Program  
to RD-C is also acknowledged. We wish to thank Janice  
King, Darrell Thomson and Lindsay Chiu for their excel-  
lent technical support, and Mrs Ma. Teresa Torres-Peralta  
for typing the manuscript.

## References

- [1] M.N. Alam, D. McGinty, R. Szymusiak, Neuronal discharge of preoptical anterior hypothalamic thermosensitive neurons: relation to NREM sleep, *Amer. J. Physiol.* 269 (1995) R1240–R1249.
- [2] P. Blier, C. de Montigny, Possible serotonergic mechanisms underlying the antidepressant and anti-obsessive-compulsive disorder responses, *Biol. Psychiatry* 44 (1998) 313–323.
- [3] D.C. Brooks, E. Bizzi, Brain stem electrical activity during deep sleep, *Arch. Ital. Biol.* 101 (1972) 648–665.
- [4] S. Datta, D.F. Siwek, E.H. Patterson, P.B. Cipolloni, Localization of pontine PGO wave generation sites and their anatomical projections in the rat, *Synapse* 30 (1998) 409–423.
- [5] S. Datta, E.H. Patterson, D. Siwek, Brainstem afferents of the cholinceptive pontine wave generation sites in the rat, *Sleep Res.* Online 2 (1999) 79–82.
- [6] J.C. Gillin, R. Salin-Pascual, J. Velazquez-Moctezuma, P. Shiromani, R. Zoltoski, Cholinergic receptor subtypes and REM sleep in animals and normal controls, *Prog. Brain Res.* 98 (1993) 379–387.
- [7] R. Guzmán-Marín, Md. Noor Alam, R. Szymusiak, R. Drucker-Colin, H. Gong, D. McGinty, Discharge modulation of rat dorsal raphe neurons during sleep and wakefulness: effects of preoptic/basal forebrain warming, *Brain Res.* 875 (2000) 23–34.
- [8] B.L. Jacobs, S.J. Hennksen, W.C. Dement, Neurochemical basis of the PGO wave, *Brain Res.* 48 (1972) 406–411.
- [9] B.L. Jacobs, R. Asher, W.C. Dement, Electrophysiological and behavioral effects of electrical stimulation on the raphe nuclei in cats, *Physiol. Behav.* 11 (1973) 489–495.
- [10] R.E. Jewett, S. Norton, Effects of some stimulant and depressant drugs on sleep cycles of cats, *Exp. Neurol.* 15 (1966) 463–474.
- [11] M.D. Johnson, Electrophysiological and histochemical properties of postnatal rat serotonergic neurons in dissociated cell culture, *Neuroscience* 63 (1994) 775–787.
- [12] X. Li, D.G. Rainnie, R.W. McCarley, R.W. Greene, Presynaptic nicotinic receptors facilitate monoaminergic transmission, *J. Neurosci.* 18 (1998) 1904–1912.
- [13] R. Lydic, R.W. McCarley, A. Hobson, The time-course of dorsal

209  
210  
211  
212  
213  
214  
215  
216  
217  
218  
  
219  
  
220  
221  
222  
223  
224  
225  
226  
227  
  
228  
  
229  
230  
231  
232  
233  
234  
235  
236  
237  
238  
239  
240  
241  
242  
243  
244  
245  
246  
247  
248  
249  
250  
251  
252  
253  
254  
255  
256  
257  
258  
259  
260  
261  
262  
263



- 265 raphe discharge. PGO waves, and muscle tone averaged across  
 266 multiple sleep cycles, *Brain Res.* 274 (1983) 365–370.
- [14] D.J. McGinty, R.M. Harper, Dorsal raphe neurons: depression of  
 267 firing during sleep in rats, *Brain Res.* 101 (1976) 569–575. 280
- [15] S. Mihailescu, M. Palomero-Rivero, P. Meade-Huerta, A. Maza-  
 268 Flores, R. Drucker-Colin, Effects of nicotine and mecamlamine on  
 269 rat dorsal raphe neurons, *Eur. J. Pharmacol.* 360 (1998) 31–36. 282
- [16] R.J. Ross, W.A. Ball, D.R. Levitt, P.J. Gresch, A.R. Morrison,  
 270 Effects of monoamine reuptake blockade on ponto-gemulo-occipi-  
 271 tal wave activity, *Neuropharmacology* 29 (10) (1990) 965–968. 283
- [17] R.J. Salin-Pascual, R. Drucker-Colin, A novel effect of nicotine on  
 272 mood and sleep in major depression, *NeuroReport* 9 (1998) 57–60. 284
- [18] M. Segal, Y. Dudai, A. Amsterdam, Distribution of bungarotoxin-  
 273 binding cholinergic nicotinic receptor in rat brain, *Brain Res.* 148  
 274 (1978) 105–119. 279
- [19] K.L. Summers, E. Giacobini, Effects of local and repeated systemic  
 275 administration of (-)nicotine on extracellular levels of acetylcho-  
 276 line, norepinephrine, dopamine and serotonin in rat cortex, *Neuro-  
 277 chem. Res.* 20 (1995) 753–759. 281
- [20] M. Thakkar, R.E. Strecker, R.W. McCarley, Behavioural state  
 278 control through differential serotonergic inhibition in the mesopon-  
 279 tine cholinergic nuclei: a simultaneous unit recording and mi-  
 280 crodialysis study, *J. Neurosci.* 18 (1998) 5490–5497. 282
- [21] J. Vazquez, R. Guzman-Marín, R.J. Salin-Pascual, R. Drucker-Colin,  
 283 Transdermal nicotine on sleep and PGO spikes, *Brain Res.* 737  
 284 (1996) 317–320. 285
- 286  
287  
288  
289  
290

Experimento 3: Efectos de la administración de nicotina en el NDR sobre la actividad de las células del LDT/PPT en rebanadas de cerebro medio de rata.

Artículo anexo:

**Nicotine stimulation of dorsal raphe neurons: effects on laterodorsal raphe neurons: effects on laterodorsal and pedunculopontine neurons.**

**NICOTINE STIMULATION OF DORSAL RAPHE NEURONS:  
EFFECTS ON LATERODORSAL AND PEDUNCULOPONTINE  
NEURONS**

Stefan Mihailescu<sup>1</sup>, Ruben Guzmán-Marín<sup>1</sup>, and René Drucker-Colín<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, <sup>2</sup>Depto. de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma de México, México

Please send all correspondence regarding this manuscript to:

Dr. René Drucker-Colín  
Depto. de Neurociencias,  
Instituto de Fisiología Celular.  
Universidad Nacional Autónoma de México,  
04510 México, D:F., México  
Telephone: +525-550-6662  
Fax: +525-550-0904  
E-mail: drucker@servidor.unam.mx

## ABSTRACT

Previous studies showed that nicotine suppresses the ponto-geniculo-occipital (PGO) spikes of Rapid Eye Movement sleep in cats. This effect may depend on stimulation of dorsal raphe nucleus (DRN) serotonergic neurons that inhibit the pedunculo pontine (PPT) and laterodorsal tegmental (LDT) cholinergic neurons, generators of PGO spikes. For testing this hypothesis 37 experiments were performed in rat midbrain slices. Nicotine (2 mM), administered locally into DRN, significantly increased the firing rate of 81.1% DRN neurons ( $99.5 \pm 27.7\%$ ) and serotonin release ( $28.4 \pm 2\%$ ) while simultaneously and significantly decreasing the firing rate of 80.8% LDT neurons ( $65.9 \pm 5.5\%$ ) and of 81.8% PPT neurons ( $53.9 \pm 10\%$ ). The inhibition of LDT neurons by nicotine administered into DRN was blocked by the 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist WAY-100635 (140 nM) administered into LDT. These results indicate that nicotine inhibits the activity of LDT and PPT neurons and consequently the generation of PGO spikes through stimulation of DRN serotonergic neurons.

Keywords: Serotonin, nicotine dorsal raphe nucleus, laterodorsal tegmental nucleus, pedunculo pontine tegmental nucleus

## 1. INTRODUCTION

Previous studies performed in behaving cats (Ruch-Monachon et al., 1976; Vázquez et al., 1996) showed that transdermal administration of nicotine suppresses the ponto-geniculo-occipital (PGO) spikes of the Rapid Eye Movement (REM) sleep. This effect may be mediated by stimulation of serotonergic neurons from the dorsal raphe nucleus (DRN), which inhibit the activity of pedunculopontine (PPT) and laterodorsal tegmental (LDT) cholinergic neurons, considered main generators of PGO spikes (Jones, 1991; McCarley et al., 1995). This hypothesis is based on the following previous experimental findings: a) DRN serotonergic neurons project to LDT and PPT cholinergic neurons (Honda and Semba, 1994; Steininger et al., 1997); b) serotonin hyperpolarizes cholinergic LDT neurons (Leonard and Llinas, 1994; Luebke et al., 1992); c) nicotine increases the firing rate of DRN neurons and serotonin release from rat midbrain slices (Li et al., 1998; Mihailescu et al., 1998); d) the electrical stimulation of DRN suppresses PGO spikes (Jacobs et al., 1973); e) DRN neurons cease firing coincidentally with the appearance of PGO spikes at the onset of REM sleep (Lydic et al., 1983; McGinty and Harper, 1976; Trulson and Jacobs, 1979).

The present study was designed to test directly for the existence of an inhibitory control of DRN serotonergic neurons upon LDT and PPT neurons triggered by nicotine. Therefore, nicotine was injected into the DRN of rat midbrain slices and the effects upon the firing rates of DRN, LDT and PPT neurons were recorded.

## 2. Experimental procedures

### 2.1. Brain slice preparation

The experiments were performed in coronal midbrain slices obtained from young

male Wistar rats (b.w.=140-160 g), anesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg, intraperitoneally). After decapitation, the brain was rapidly (<1 min.) removed and transferred into a Petri dish, containing ice-cold Yamamoto buffer (composition, in mEq/l: NaCl 124, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 2.4, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.24, MgSO<sub>4</sub> 1.3, NaHCO<sub>3</sub> 26 and glucose 10). Coronal slices (350 µm width) were obtained using a McIlwain tissue chopper. The slices containing the area of DRN (4-6 in each experiment), were transferred in a tissue slice recording chamber (Fine Science Tools) and completely immersed into the flowing perfusate (1.5 ml/min, 33°C), oxygenated and maintained at a pH of 7.44 by bubbling it with carbogène. Phenylephrine (30 µM, Sigma) was added to the perfusate, in order to induce the automatic firing of otherwise silent serotonergic DRN neurons (VanderMaelen and Aghajanian, 1983).

The areas occupied by the dorsal raphe, laterodorsal and pedunculo pontine nuclei inside each slice were identified using a stereomicroscope (Reichert) and the stereotaxic atlas of Praxinos and Watson (1986). In coronal midbrain slices the dorsal raphe and pedunculo pontine nuclei coexist in the antero-posterior coordinates of bregma 7.04 mm to 8.30 mm, whereas the dorsal raphe and laterodorsal nuclei coexist in the range of bregma 8.72 mm to 9.30 mm. Dorsal raphe neurons were found in the midline, immediately downwards from the aqueduct (dorso-ventral coordinates 2.40 - 4.00 mm with respect to the interaural vertical plane). Pedunculo pontine neurons were found 1-2 mm laterally from the midline and 2-3 mm above the vertical interaural plane. Laterodorsal neurons were found 1 mm laterally from the midline and 2.2 - 3.2 mm above the vertical interaural plan.

## 2.2. Recordings

The electrical activity of DRN, PPT and LDT neurons was recorded extracellularly, 1-2 hours after the isolation of the slices, with five-barrelled glass micropipettes (World Precision Instruments, OD = 1.2 mm), pulled with a vertical David Kopf Instr. 700C puller and filled, in one of the barrels, with NaCl 3M (microelectrode impedance ranged between 4-8 M $\Omega$ ). The signals, amplified (500 -1000 times) and filtered (100-3000 Hz), using a Grass P5 amplifier, were visualized with a Tektronix 2213A oscilloscope and recorded with a digital tape recorder (BioLogic, 24 kHz sampling rate/channel). Rate histograms were obtained off-line, using a BrainWave system. The recording electrodes were directed into the dorsal raphe and laterodorsal or pedunculopontine nuclei using two micromanipulators (Fine Science Tools, model MM33), placed on opposite sides of the recording chamber.

## 2.3. Drugs

Nicotine (hydrogen tartrate salt, Sigma, 2 mM), dissolved extemporaneously into the perfusate, was administered into DRN, using and a pressure injection system (Picospritzer II, General Valve Corporation). The standard duration of nicotine injection was of 5 ms at a pressure of 20 PSI.

The specific 5-HT<sub>1A</sub> receptor blocker WAY-100635 (RBI/Sigma, 140  $\mu$ M), dissolved extemporaneously into the perfusate, was administered into LDT by pressure injections (5-10 ms, 20 PSI).

## 2.4. Measurement of serotonin release

Serotonin concentration was measured in samples collected at 3-5 min intervals from the vacuum line of the recording chamber. The samples were analyzed by high

performance liquid chromatography with electrochemical detection. We used a 100 x 1 cm column (Bioanalytical Systems, 3 mm) with a 5  $\mu$ l sample loop. The mobile phase contained: 100 mM mono chloroacetic acid, sodium octylsulphate 223 mM, 0.5 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 25 ml acetonitrile 5%, and 4 ml tetrahydrofuran; the pH was set at 3.1 using NaOH. We used a Petit Amper (Bioanalytical Systems) EC detector model LC3C with a glass carbon electrode vs. Ag/AgCl electrode at 0.65V. The flow rate was 80  $\mu$ l/min and the retention time of 15 min. Serotonin was identified using an external standard (pmol/5 $\mu$ l) and was quantified by measuring the area under the identified peaks.

## 2.5. Data analysis

All results are expressed as means  $\pm$  S.E.M. The correlation between the firing rates of DRN and LDT/PPT neurons was assessed using the Pearson Product Moment Correlation. Means were compared by paired t-test. The differences were considered significant for  $P < 0.05$ .

## 3. RESULTS

### 3.1. Effects of nicotine on DRN neurons firing rate

DRN neurons used for recordings met the electrophysiological criteria proposed by VanderMaelen and Aghajanian (1983) for identifying serotonergic neurons: regular, slow firing rate ( $1.79 \pm 0.297$  Hz, n=37), wide (1.5 - 3 ms), biphasic action potentials (Fig. 1A).



-----  
INSERT FIGURE 1 ABOUT HERE  
-----

Nicotine administration into DRN produced a significant increase in firing rate of 30 (81.1%) DRN neurons (Fig. 1B, Fig. 2, Fig. 4), by  $99.5 \pm 27.7\%$  ( $P < 0.05$ , paired t-test). In 27 of these 30 neurons, the increase in firing rate was preceded by a significant transient decrease ( $46.5 \pm 5.2\%$ ,  $P < 0.05$ , paired t-test), with a latency of  $79 \pm 19.7$  s and a duration of  $352 \pm 33.2$  s (Fig. 2B, Fig. 4). The stimulatory component of this biphasic response had a latency of  $430 \pm 59$  s and a magnitude of  $89.7 \pm 21.6\%$  ( $P < 0.05$ , paired t-test).

In three (8.1%) DRN neurons, nicotine produced a monophasic stimulatory response with short latency (0-3 s) and a magnitude of  $119.7 \pm 61.5\%$  ( $P < 0.05$ , paired t-test).

Nicotine administration into DRN reduced the firing rate of 7 (18.9%) DRN neurons by  $74.8 \pm 12.1\%$  ( $P < 0.05$ , paired t-test). This effect had a short latency (0 to 2 s) and a duration of  $516.8 \pm 55.6$  s.

### 3.2 Effects of nicotine administration into DRN upon the firing rate of LDT neurons

LDT neurons had a mean firing rate of  $4.52 \pm 0.33$  Hz ( $n=26$ ). Their extracellular action potentials had biphasic morphology, with an initial positive (downward) abrupt deflection and a slow decaying, negative final deflection (Fig. 1A). The duration of the entire extracellular action potential was  $3.09 \pm 0.09$  ms, whereas the duration of the initial positive deflection was of  $0.99 \pm 0.06$  ms ( $n=26$ ). This relatively low firing rate ( $< 10$

Hz), as well as the wide, biphasic action potentials were described for possibly cholinergic LDT neurons (Kayama et al., 1992; Koyama et al., 1994).

-----  
INSERT FIGURE 2 ABOUT HERE  
-----

Pressure administration of nicotine into DRN (2 mM, 5 ms) decreased the firing rate of 21 (80.8%) LDT neurons by  $65.9 \pm 5.5\%$  ( $P < 0.05$ , paired t-test), effect which coincided with an increase in DRN neuron firing rate by  $111.4 \pm 17.3\%$  ( $P < 0.05$ , paired t-test,  $n=21$ ) (Fig. 1, Fig. 2). In 19 of these 21 LDT neurons the inhibitory response was preceded by a transient increase in firing rate ( $23.1 \pm 5.3\%$ ,  $P < 0.05$ , paired t-test), which coincided with a transient decrease in DRN neuron firing rate (Fig. 2B). In 2 of the 5 experiments in which the firing rate of DRN neurons decreased after nicotine as a monophasic response, there was a simultaneous increase in firing rate of LDT neurons by  $45.5 \pm 5.5\%$  (Fig. 3), whereas in 3 (11.5%) LDT neurons no change in firing rate was observed. The above described reciprocal changes in firing rate of DRN and LDT neurons were significantly correlated (Pearson Product Moment Correlation,  $r = -0.83$ ,  $P < 0.05$ ,  $n=47$ ).

-----  
INSERT FIGURE 3 ABOUT HERE  
-----

### 3.3 Influence of nicotine administration into the DRN upon PPT neuron firing rate of

PPT neurons had a mean firing rate of  $4.9 \pm 0.86$  Hz ( $n=11$ ). Their extracellular action potentials were similar to the ones LDT neurons, e.g. biphasic, with an initial

abrupt positive deflection and a slow decaying final negative deflection (Fig. 1A). The duration of the whole action potential of PPT neurons was of  $3.05 \pm 0.15$  (n=11) and the duration of the initial positive deflection was of  $0.92 \pm 0.06$  ms (n=11). These characteristics of the firing rate, as well as the wide, biphasic morphology of the extracellular action potential were described for possibly cholinergic PPT neuron (Thakkar et al., 1998).

Nicotine administration into the DRN lasting 5 ms induced a significant decrease in firing rate of 9 (81.8%) PPT neurons by  $53.9 \pm 10\%$  ( $P < 0.05$ , paired t-test), which coincided with a significant increase in DRN neuron firing rate ( $74.9 \pm 14.1\%$ ,  $P < 0.05$ , paired t-test, n=9) (Fig. 1B) (Fig. 4). In all these 9 LDT neurons the decrease in firing rate was preceded by a transient increase ( $28.3 \pm 10.8\%$ ,  $P < 0.05$ , paired t-test) which coincided with a transient decrease in firing rate of DRN neurons (Fig. 4A). In 2 (18.2%) PPT neurons no change in firing rate was observed after nicotine administration into DRN. These reciprocal changes in firing rate of DRN and PPT neurons were significantly correlated (Pearson Product Moment Correlation,  $r = -0.963$ ,  $P < 0.05$ , n=20).

-----  
INSERT FIGURE 4 ABOUT HERE  
-----

#### 3.4 Influence of WAY-100635 on nicotine-induced inhibition of laterodorsal neurons.

The administration of the specific 5-HT<sub>1A</sub> receptor blocker WAY-100635 (140 nM) into LDT induced a significant increase in LDT neuron firing rate by  $55.4 \pm 17.5\%$  (n=5,  $P < 0.05$ , paired t-test).

Pre-treatment of LDT neurons with WAY-100635 blocked the inhibitory effect of nicotine administration into DRN upon LDT neurons (n=5, Fig. 5).

-----  
INSERT FIGURE 5 ABOUT HERE  
-----

### 3.5. Influence of nicotine administration into DRN upon serotonin release.

Serotonin release significantly increased following nicotine microinjection into DRN, from  $2.01 \pm 0.26$  pM/5 $\mu$ l to  $2.59 \pm 0.36$  pM/5 $\mu$ l (n=12), by  $28.4\% \pm 2.4\%$  ( $P < 0.05$ , paired t-test).

## 4. DISCUSSION

In the present study we show that nicotine, administered into the DRN of rat midbrain slices, increased the firing rate of most DRN neurons while simultaneously inducing a serotonin - dependent decrease of LDT/PPT neuron firing rate. This finding may explain the disappearance of PGO spikes of REM sleep after systemic administration of nicotine observed with in vivo experiments.

Nicotine, pressure-administered into DRN, induced reciprocal changes in firing rate in DRN and LDT/PPT neurons. Thus, when DRN neuron firing rate increased after nicotine ( $99.5 \pm 27.7\%$ ), LDT and PPT neuron firing rate significantly decreased ( $65.9 \pm 5.5\%$  and  $53.9 \pm 10.1\%$  respectively). When the firing rate of DRN neurons transiently decreased after nicotine ( $46.5 \pm 5.2\%$ ,  $P < 0.05$ ), the firing rate of LDT and PPT neurons increased ( $23.1 \pm 5.3\%$  and  $28.3 \pm 10\%$  respectively,  $P < 0.05$ ), very likely due to a disinhibition process. The reciprocal changes in DRN and LDT/PPT neuron firing rate induced by nicotine were temporally coincident and exhibited a significant

inverse correlation (Pearson Product Moment Correlation,  $r=-0.83$  for LDT neurons and  $r=-0.96$ , for PPT neurons.). The LDT/PPT neuron inhibition was associated with a significant increase in serotonin release ( $28.4 \pm 2.4\%$ ) and, in the case of LDT neurons, was blocked by pre-treatment with the specific 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist WAY-100635. It is worthwhile mentioning that this antagonist induced as own effect, an increase in firing rate of DRN neurons ( $55.4 \pm 17.5\%$ ,  $P < 0.05$ ), which proves the existence of a tonic serotonergic inhibition of LDT neurons.

Taken together these data indicate that nicotine application into DRN stimulated the serotonergic neurons of this nucleus that inhibited LDT and PPT neurons by activating their 5-HT<sub>1A</sub> receptors. This conclusion receives support from previous studies showing that DRN serotonergic neurons send projections to LDT and PPT cholinergic neurons (Honda *et al.*, 1994; Steininger *et al.*, 1997) and that serotonin hyperpolarizes most LDT and PPT neurons by acting on 5-HT<sub>1A</sub> receptors (Leonard and Llinas, 1994; Luebke *et al.*, 1992).

The 11.5% LDT and 18.2% PPT neurons that did not change their firing rate after nicotine belong probably to neuronal subpopulations insensitive to serotonin, the existence of which was demonstrated by both *in vitro* (Leonard and Llinas, 1994; Luebke *et al.*, 1992) and *in vivo* studies (Thakkar *et al.*, 1998)

#### Functional implications: nicotine-induced suppression of PGO spikes

The PGO spikes (60-100 ms, 300  $\mu$ V), were recorded in cats in the pontine tegmentum, lateral geniculate bodies and occipital cortex. They appear as single events during slow wave sleep and acquire a bursting pattern prior to the installation of REM sleep and during its occurrence (Callaway *et al.*, 1987). Their generation was attributed

to cholinergic LDT/PPT neurons (PGO-on neurons) which project to lateral geniculate bodies and start firing 15-20 msec prior to a PGO wave (McCarley et al., 1978; Nelson et al., 1983; Sakai and Jouvet, 1984).

Systemic nicotine administration suppressed PGO spikes in behaving cats (Ruch-Monachon et al., 1976; Vázquez et al., 1996). In the present study nicotine locally administered into the DRN stimulated most DRN neurons and simultaneously inhibited most LDT/PPT neurons, the last effect depending on serotonin release inside mesopontine nuclei. The LDT and PPT neurons inhibited by DRN neuron activation were very likely cholinergic due to their long-lasting action potentials (>3 ms) and relatively low firing rate (mean values of 4.5 Hz for LDT and 4.9 Hz for PPT neurons) (Kayama et al., 1992; Koyama et al., 1994; Thakkar et al., 1998). In young rats the majority of LDT neurons with PGO-related electrophysiological properties were reported to be cholinergic and inhibited by 5-HT<sub>1A</sub> agonists (Luebke et al., 1992). Therefore, it may be assumed that this type of neurons is also inhibited by nicotine administration inside DRN

The present work is relevant to the understanding of the mechanisms involved in nicotine -induced suppression of PGO spikes. It also opens the perspective of using brain slices as a tool for studying the interactions between aminergic and cholinergic neurons at mesopontine level

#### Acknowledgements

This work was supported in part by Fideicomiso UNAM to R.D.- C. We wish to thank Ma. Teresa Torres-Peralta for typing the manuscript and to Marcela Palomero - ivero for performing the HPLC measurements.

## REFERENCES

1. Callaway, C.W., Lydic, R., Baghdoyan, H.A. and Hobson, J.A. (1987) Pontogeniculooccipital waves: Visual system activity during rapid eye movement sleep ( Review ). *Cell. Mol. Neurobiol.* 7, 145-159.
2. Honda, T. and Semba, K. (1994) Serotonergic synaptic input to cholinergic neurons in the rat mesopontine tegmentum. *Brain Res.* 647, 299-306.
3. Jacobs, B.L., Asher, R. and Dement, W.C. (1973) Electrophysiological and behavioral effects of electrical stimulation of the raphe nuclei in the cat. *Phys. Behav.* 11, 489-495.
4. Kayama, Y., Mamoru, O. and Jodo, E. (1992) Firing of "possibly cholinergic" neurons in the rat LDT nucleus during sleep and wakefulness. *Brain Res.* 569, 210-220.
5. Koyama, Y., Jodo, E. and Kayama, Y. (1994) Sensory responses of "broad spike" neurons in the LDT tegmental nucleus, locus coeruleus and dorsal raphe of awake rats: implications for cholinergic and monoaminergic neuron-specific responses. *Neuroscience* 63, 1021-1031.
6. Leonard, C.S. and Llinas, R. (1994) Serotonergic and cholinergic inhibition of mesopontine cholinergic neurons controlling REM sleep: an *in vitro* electrophysiological study. *Neuroscience* 59, 309-330.
7. Li, X., Rainnie, D.G., McCarley, R.W. and Greene, R.W. (1998) Presynaptic nicotinic receptors facilitate monoaminergic transmission. *J. Neurosci.* 18, 1904-1912.
8. Luebke, J.L., Greene, R.W., Semba, K., Kamondi, A., McCarley, R.W. and Reiner, P.B. (1992) Serotonin hyperpolarizes cholinergic low-threshold burst neurons in the rat LDT tegmental nucleus *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 743 -747.
9. Lydic, R., McCarley, R.W. and Hobson, J.A. (1983) The time-course of dorsal raphe discharge, PGO waves and muscle tone averaged across multiple sleep cycles. *Brain Res.* 274, 365-370.

10. McCarley, R.W., Nelson, J.P and Hobson, J.A. (1978) Ponto-geniculo-occipital (PGO) burst neurons : correlative evidence for neural generators of PGO waves. *Science* 201, 269-272.
11. McCarley, R.W., Greene, R.W. and Rainnie, D. (1995) Brainstem neuromodulation and REM sleep. *Semin. Neurosci.* 7, 341-345.
12. McGinty, D.J. and Harper, R.M. (1976) Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleep in cats *Brain Res.* 101, 569-575.
13. Mihailescu S., Palomero-Rivero, M., Meade-Huerta, P., Maza-Flores, A. and Drucker-Colín, R. (1998) Effects of nicotine and mecamylamine on rat dorsal raphe neurons *Eur. J. Pharmacol.* 360, 31-36.
14. Nelson, J.P., McCarley, R.W. and Hobson, J.A., REM sleep burst neurons, PGO waves and eye movement information, *J. Neurophysiol.*, 50 (1983) 784-797.
15. Praxinos, G. and Watson, C. (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, second ed. Academic Press, Sydney.
16. Ruch-Monachon, M.A., Jalfre, M. and Haefely, W. (1976) Drugs and PGO waves in the lateral geniculate body of the curarized cat. IV: The effects of acetylcholine, GABA and benzodiazepines on PGO wave activity. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 219, 308-325.
17. Sakai, K., and Jouvet, M. (1980) Brain-stem PGO-on cells projecting directly to the cat dorsal lateral geniculate nucleus. *Brain Res.* 194, 500-505.
18. Steininger, T.L., Wainer, B.H, Blakely, R.D. and. Rye, D.B. (1997) Serotonergic dorsal raphe nucleus projections to the cholinergic and non-cholinergic neurons of the pedunculo-pontine tegmental region: a light and electron microscopic anterograde tracing and immunohistochemical study. *J. Comp. Neurol.* 382, 302-322.
19. Thakkar, M., Strecker, E. and McCarley, R.W. (1998) Behavioral state control through differential serotonergic inhibition in the mesopontine cholinergic nuclei: a



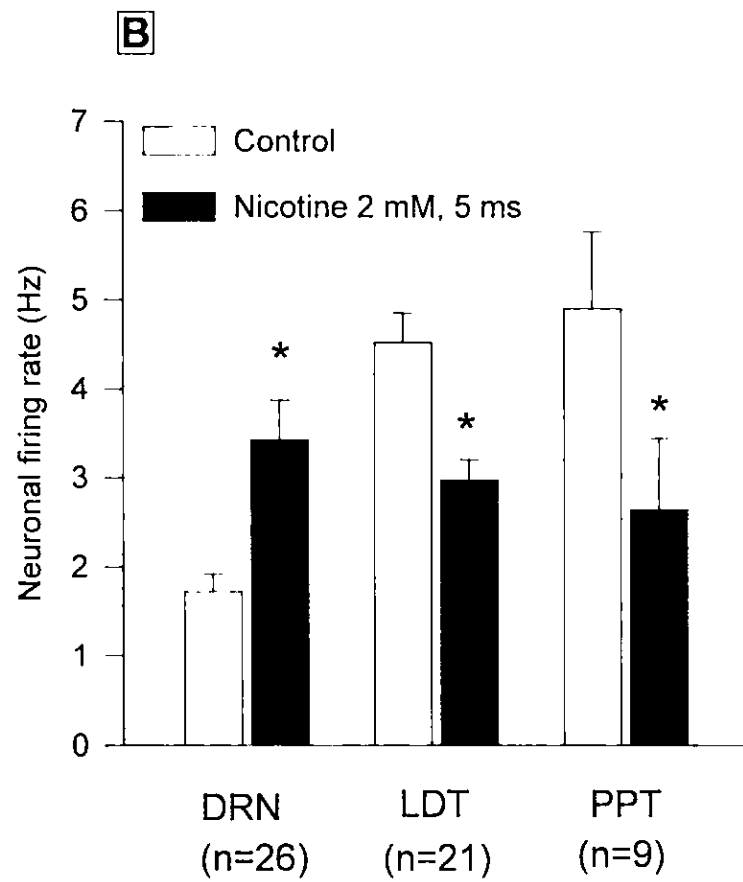
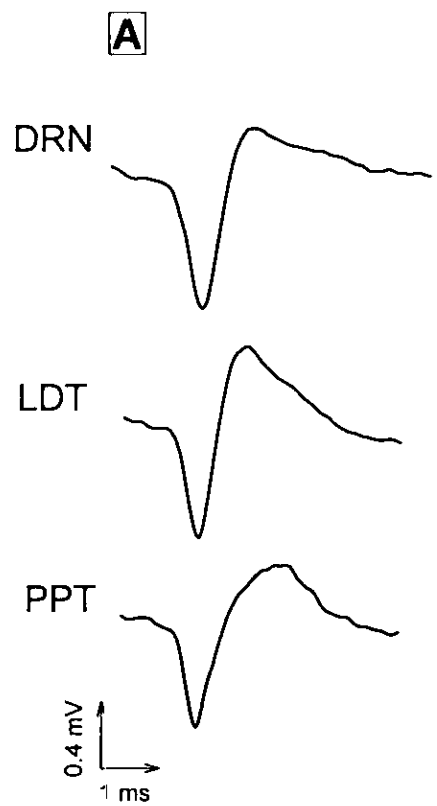
- simultaneous unit recording and microdialysis study. *J. Neurosci.* 18, 5490-5497.
20. Trulson, M.E. and Jacobs, B.L. (1979) Raphe unit activity in freely moving cats: correlation with level of behavioral arousal. *Brain Res.* 163, 135-150.
21. Trulson, M.E. and Crisp T. (1984) Role of norepinephrine in regulating the activity of serotonin - containing dorsal raphe neurons. *Life Sci.* 35, 511-515.
22. VanderMaelen, C.P. and Aghajanian G.K. (1983) Electrophysiological and pharmacological characterization of serotonergic dorsal raphe neurons recorded extracellularly and intracellularly in rat brain slices. *Brain Res.* 289, 109 -119.
23. Vázquez, J., Guzmán-Marín, R., Salín-Pascual, R. and Drucker-Colín, R. (1996) Transdermal nicotine effects on sleep and PGO spikes. *Brain Res.* 737, 317-320.

## FIGURES LEGENDS

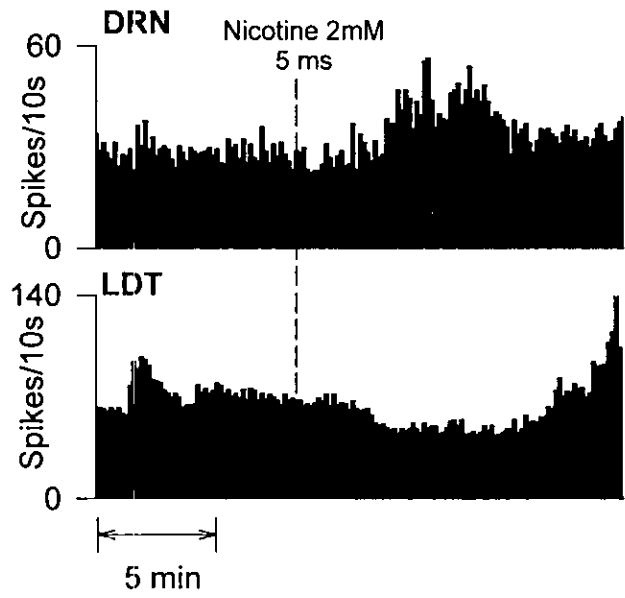
- Fig.1 A: extracellular action potentials recorded from the dorsal raphe (DRN) laterodorsal (LDT) and pedunculo pontine (PPT) nuclei. All records were obtained by averaging 15-20 potentials; B: opposite effects of nicotine injected into DRN upon the firing rate of DRN neurons as compared to LDT and PPT neurons. "" stands for a statistically significant difference ( $P < 0.05$ , paired t-test). The data from nicotine groups correspond to 5 ms injections of the drug into DRN.
- Fig.2 Effects of nicotine administration into DRN on the firing rate of DRN and LDT neurons. A and B: stimulatory effects of a nicotine (2 mM) administered into DRN upon the firing rate of DRN neurons (upper graphs) and inhibitory effects on simultaneously recorded LDT neurons (lower graphs). In figure B note that nicotine produces a transient decrease in firing rate of the DRN neuron which coincides with an increase in firing rate of the LDT neuron.
- Fig. 3 Inhibitory effects of nicotine (Nic.) administered into DRN upon a DRN neuron (upper graph) associated with a simultaneous increase in firing rate of a LDT neuron (lower graph).
- Fig. 4 Effects of nicotine injected into DRN on the firing rate of DRN and PPT neurons simultaneously recorded. A: inhibitory effects of nicotine (Nic.) injection into DRN upon the firing rate of a PPT neuron. Note that the initial effect of nicotine upon the DRN neuron was inhibitory and this period of inhibition coincided with an increase in firing rate of the PPT neuron. B: inhibitory effects of nicotine (Nic.) repeatedly injected into DRN upon a

bursting PPT neuron.

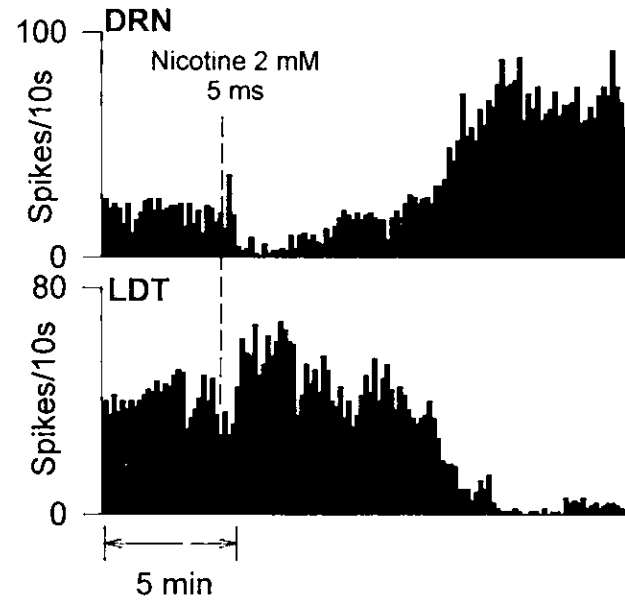
Fig. 5 Effects of the specific 5-HT<sub>1A</sub> receptor blocker WAY-100635 on the inhibition of LDT neurons induced by nicotine injection into DRN. Nicotine (Nic.), injected into DRN, increases the firing rate of a DRN neuron (upper graph) and inhibits the activity of a LDT neuron (lower graph) simultaneously recorded in the same slice. After administration of WAY-100635 into LDT, a new nicotine administration into DRN has no effects on the LDT neuron firing rate, although the firing rate of the DRN neuron increases. Note the increase in the firing rate of LDT neuron after the administration of WAY-100635.

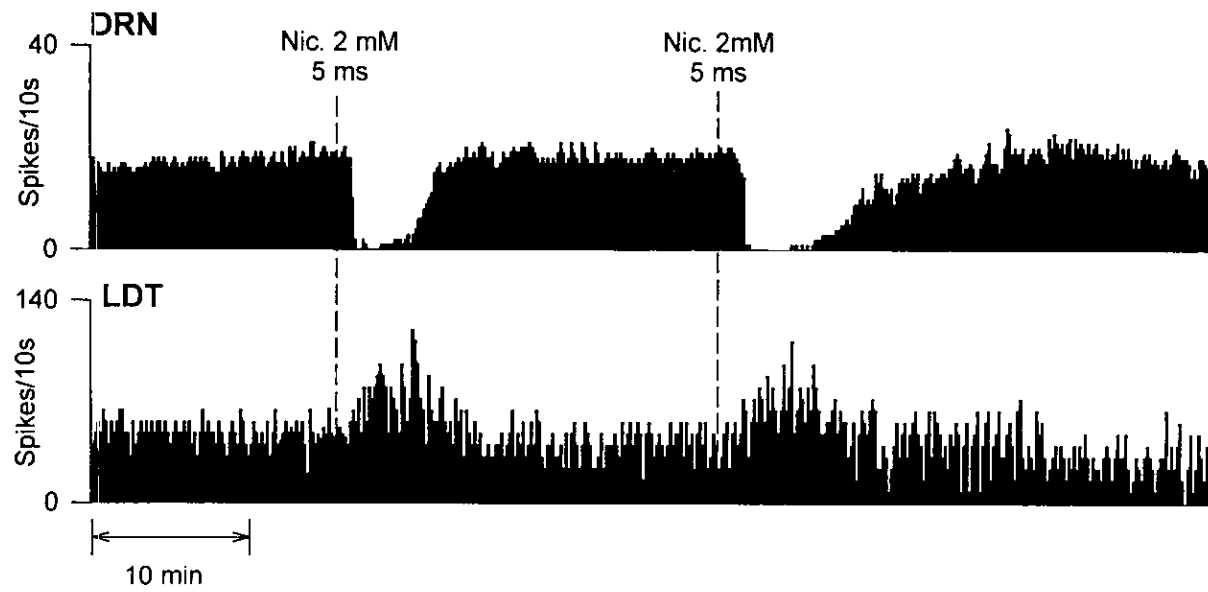


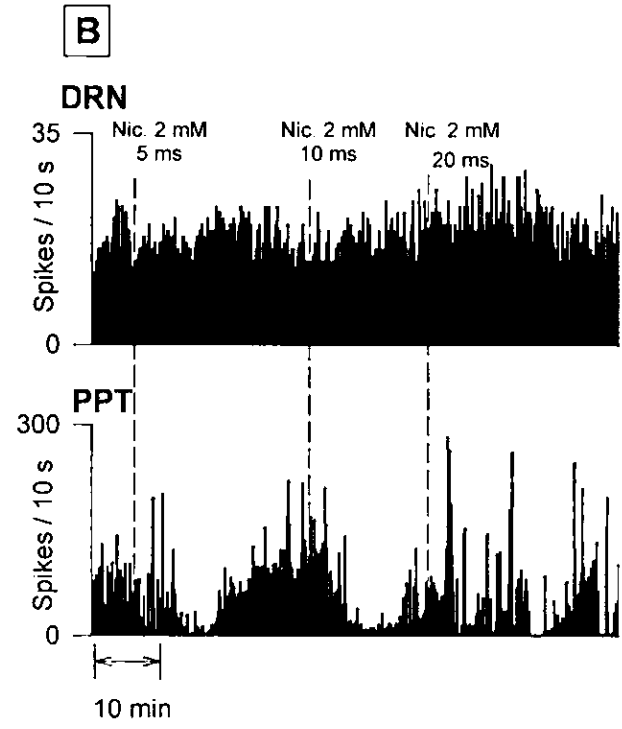
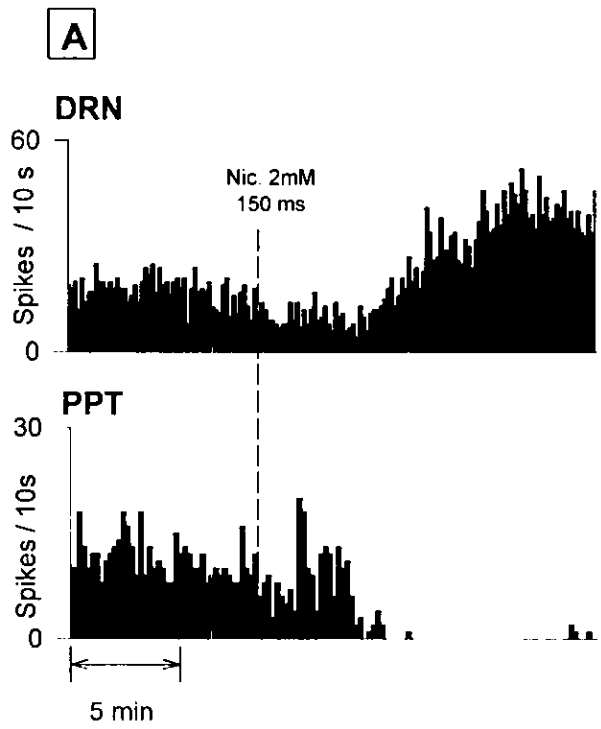
**A**

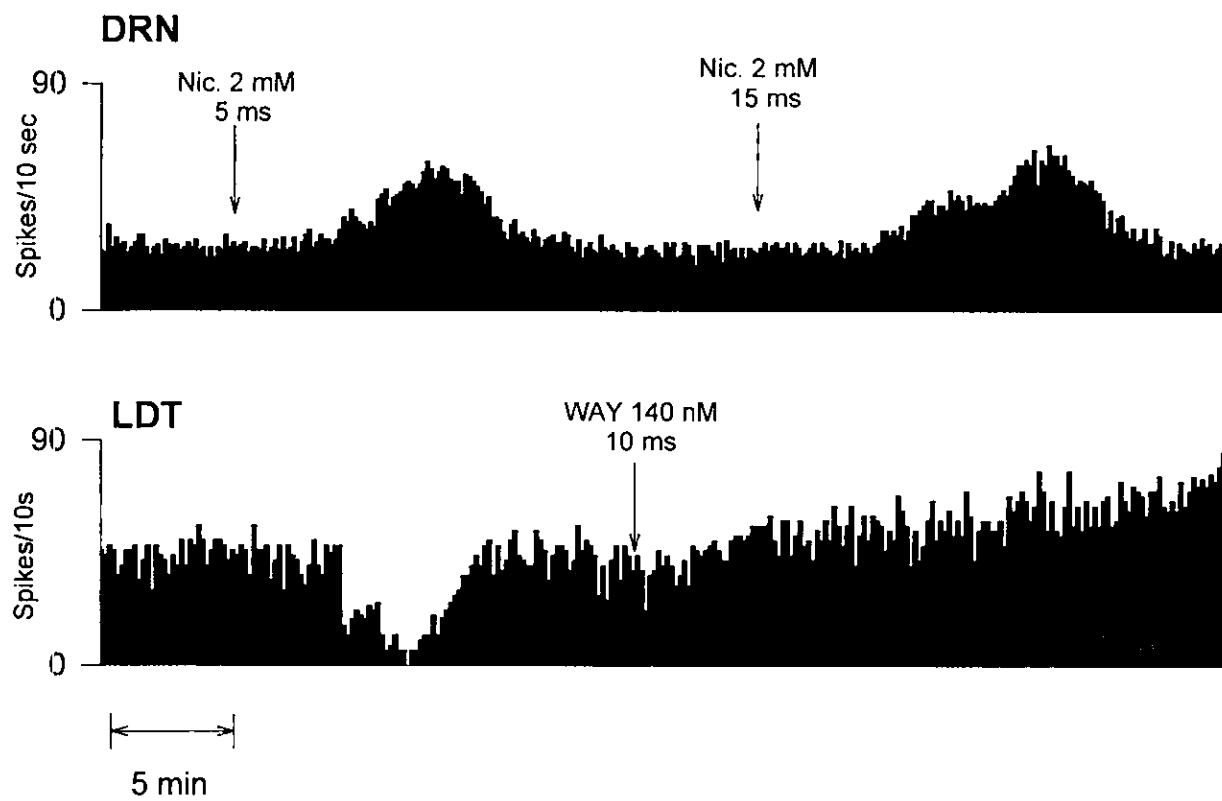


**B**











Experimento 4: Determinación de la respuesta a nicotina de las células del NDR frente a antagonistas de receptores GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> y 5-HT<sub>1A</sub>

#### Experimento 4

La administración sistémica de nicotina suprime la presencia de las espigas pontogeniculo-occipitales (PGOs) de la fase de sueño de movimientos oculares rápidos (SMOR) (Vazquez y col., 1996). Es posible que estos efectos sean mediados a través de la liberación de serotonina, ya que se ha sugerido que: 1) la estimulación eléctrica del núcleo dorsal del rafé (NDR) que contiene la mayoría de las neuronas serotoninérgicas del cerebro suprime las espigas PGOs durante la fase de sueño MOR (Jacobs y col., 1973); 2) la frecuencia de disparo de las neuronas serotoninérgicas del NDR es inversamente correlacionada con la frecuencia de las espigas PGOs (McGinty y col., 1976; Trulson y col., 1979; Lydic y col., 1983); 3) la depleción farmacológica de serotonina induce espigas PGO fuera de la fase de sueño MOR (Jacobs y col., 1972). Así, la supresión de las espigas PGO observada tras la administración de nicotina podría ser explicado por el incremento en la frecuencia de disparo de las células del NDR durante la fase de sueño MOR. Previamente demostramos que la nicotina incrementa la frecuencia de disparo de estas células durante esta fase de sueño. Al igual que en reportes previos (Mihailescu y col., 1998; Li y col., 1998) la administración de nicotina produjo un incremento en la frecuencia de disparo en el 70% de las células. Así es posible que los efectos de la nicotina sobre la frecuencia de disparo de las neuronas del NDR pueden ser directos y/o indirectos.

En cuanto a la primera posibilidad (efectos directos) se ha reportado: la presencia de receptores nicotínicos a nivel del NDR en diferentes especies (Deutch y col., 1987; Segal y col., 1978). Los efectos directos se deben probablemente a la acción de la nicotina sobre receptores nicotínicos presentes en las neuronas serotoninérgicas. Se ha demostrado

la presencia de receptores nicotínicos del tipo  $\alpha 7$ , los cuales exhiben una alta permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ . Así, es posible que la estimulación de neuronas serotoninérgicas del NDR produce este aumento en la frecuencia de disparo y liberación del neurotransmisor. Esto ha sido sugerido en estudios utilizando microdialisis los cuales han mostrado que tras la inyección de nicotina existe un incremento en la liberación de serotonina en corteza cerebral (Ribeiro y col., 1993; Summers y col., 1995; 1996).

Por lo que concierne a los mecanismos indirectos es posible que la interacción con otros sistemas de neurotransmisores pueda intervenir en este efecto estimulador de la nicotina sobre las células del NDR. Se sabe que la composición neuronal del NDR no es homogénea, ya que se ha reportado que solo la tercera parte corresponde a neuronas serotoninérgicas, otra tercera parte a neuronas GABAérgicas y la otra tercera parte la componen células noradrenérgicas, dopaminérgicas, encefalinérgicas, entre otras (Johnson 1994). Dos de estos mecanismos a través de los cuales la nicotina pudiese ejercer su efecto es a través de estimulación de células GABAérgicas o serotoninérgicas.

En cuanto a la primera posibilidad, se han reportado interacciones GABAérgico-serotoninérgicas a nivel del NDR (Nanopoulos y col., 1982; Peyron y col., 1998; Wang y col., 1992). En experimentos in vivo por ejemplo, se ha reportado que los niveles de GABA se incrementan a lo largo del ciclo sueño-vigilia cuando se colectan muestras por medio de microdialisis con sondas insertadas en el NDR. Nitz y Siegel (1997; 1997a) reportaron que los niveles de este neurotransmisor aumentan solo durante la fase de sueño MOR en gatos en libre movimiento. Por otro lado Levine y Jacobs (1992) reportaron que la administración iontoforética de bicuculina (antagonista de los receptores  $\text{GABA}_A$ )

durante la fase de sueño NMOR incrementa la frecuencia de disparo de neuronas serotoninérgicas durante esta fase de sueño. Recientemente se demostró que la administración iontoforética de bicuculina revirtió el patrón de disparo de neuronas serotoninérgicas durante la fase de sueño MOR y sueño NMOR en ratas (Gervasoni y col., 2000).

Por otro lado se ha reportado que la infusión de bicuculina en el NDR produce un incremento en la liberación de serotonina, mientras que la infusión de muscimol disminuyó la liberación de este neurotransmisor (Tao y col., 1996). Estos efectos sobre la liberación de serotonina no fueron inducidos por la estimulación con fármacos agonistas y antagonistas del receptor GABA<sub>B</sub> (Tao y col., 1996). Además, se ha reportado que los niveles del ácido 5-hidroxiindoleacético (5-HIAA) se incrementaron en el núcleo rafé magnus (NRM) tras la inyección con bicuculina (Forchetti y col., 1981; Scatton y col., 1985). Asimismo los niveles de serotonina a nivel del estriado fueron incrementados durante la micro infusión de este fármaco en el NDR (Kalen y col., 1989).

En cuanto a la segunda posibilidad (liberación de 5-HT) se ha propuesto un mecanismo que regula tanto la frecuencia de disparo y la liberación de 5-HT vía estimulación de autorreceptores somatodendríticos del tipo 5-HT<sub>1A</sub>. Este mecanismo consiste en que un incremento en la frecuencia de disparo y/o la liberación de 5-HT, la cual estimula a estos autorreceptores dando como resultado una disminución en la frecuencia de disparo y/o liberación de 5-HT (Wang y Aghajanian 1977). Recientemente (Engberg y col. 2000) reportaron que la administración sistémica de nicotina en ratas anestesiadas disminuye la frecuencia de disparo de células presuntamente serotoninérgicas, este efecto

fue bloqueado con la administración previa del antagonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub> WAY 100635. Este resultado apoya el hecho de que los efectos indirectos de la nicotina sean mediados a través de la liberación de 5-HT.

Por tanto es posible que los efectos indirectos estimulatorios y/o inhibitorios de la nicotina puedan ser mediados a través de interacción con el sistema GABAérgico o serotoninérgico. Para ello el objeto de este trabajo es probar si la nicotina en presencia del antagonista de receptores de GABA<sub>A</sub> bicuculina, de GABA<sub>B</sub> faclofen y de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> incrementa la frecuencia de disparo de neuronas serotoninérgicas del NDR, o bien revierte el efecto inhibitorio producido por la nicotina. Así, hemos planteado las siguientes hipótesis:

**Hipótesis:**

La bicuculina en presencia de nicotina incrementará la frecuencia de disparo de neuronas serotoninérgicas del NDR.

El Faclofen en presencia de nicotina incrementará la frecuencia de disparo de neuronas serotoninérgicas del NDR.

El WAY 100635 en presencia de nicotina incrementará la frecuencia de disparo de neuronas serotoninérgicas.

**Materiales y Métodos.**

-Preparación de rebanadas de cerebro medio.

Estos experimentos fueron llevados a cabo en rebanadas de cerebro medio de ratas Wistar jóvenes (de 140-160 g) anestesiadas con hidrato de cloral. Inmediatamente después

de la decapitación el cerebro fué rápidamente removido (menos de 1 min) y transferido a una caja Petri, conteniendo buffer Yamamoto (composición en mEq/l: NaCl, 124; KCl, 5; CaCl<sub>2</sub> 2.4; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.24; MgSO<sub>4</sub>, 1.3; NaHCO<sub>3</sub>, 26; y glucosa, 10) en refrigeración. Se realizaron cortes coronales (de 350  $\mu$ M de grosor) usando un cortador de tejido McIlwain. Los cortes conteniendo el NDR fueron transferidos a una cámara de registro de rebanadas y completamente sumergidos en el perfusado (buffer Yamamoto, con un flujo de 1.5 ml/min, a 35.5 grados centígrados, oxigenado y mantenido a un pH de 7.44 por burbujeo con carbógeno). Se agregó al perfusado fenilefrina (12 $\mu$ M) con objeto de inducir el disparo de estas neuronas. El área del NDR fue identificada en cada rebanada en la línea media entre el fascículo longitudinal medio y el acueducto cerebral.

### Registros

La actividad eléctrica de 121 neuronas del NDR fué registrada extracelularmente 2 h después de la obtención de las rebanadas, con electrodos de vidrio llenados con una solución 3M de NaCl y con impedancias de 4-8 M $\Omega$ . Las señales fueron amplificadas 500-1000 veces, filtradas (300-3000 Hz), visualizadas en un osciloscopio y registradas en una cinta digital (48 kHz velocidad de muestreo). Se obtuvieron histogramas de frecuencia off-line, usando un sistema de análisis Brain Wave.

### Farmacos

Se realizaron administraciones de nicotina en perfusión a las siguientes concentraciones de nicotina: 0.215  $\mu$ M (n=9), 2.15  $\mu$ M (n=9), 21.5  $\mu$ M (n=10) y 215  $\mu$ M (n=14).

La bicuculina (methiodide RBI) fué administrada utilizando las concentraciones de 0.2  $\mu$ M (n=10) y de 2  $\mu$ M (n =6). El faclofen (RBI) fué administrado a las concentraciones de 2  $\mu$ M (n = 11) y 20  $\mu$ M (n=7). Finalmente el WAY 100635 se administró a la concentración de 140 nM (n = 7). La administración en perfusión se realizó 12 min después de comenzar con el registro y la duración de la perfusión fue de 5 min. para cada uno de estos fármacos de manera independiente.

Por lo que toca a los experimentos de administración de bicuculina, faclofen y WAY 100635 en presencia de nicotina estos se realizaron utilizando la concentración de nicotina de 2.15 y 21.5  $\mu$ M. En este caso la administración en perfusión de la nicotina se realizó después de una línea base de 8 min, la duración de la administración de nicotina fue de 5 min, e inmediatamente después de terminar con la perfusión de nicotina comenzó la perfusión de bicuculina, faclofen o WAY 100635 por 5 min., los registros continuaron por 25 minutos después de la última administración de fármacos.

## **Resultados**

Se presentan los resultados obtenidos en 121 neuronas, estas células fueron clasificadas como serotoninérgicas de acuerdo a los criterios previamente establecidos por VanderMaelen y Aghajanian (1983) para registros extracelulares, dentro de estos tenemos: 1) patrón de disparo rítmico y de baja frecuencia ( $2.35 \pm 0.01$  espigas/s), 2) potenciales de acción de larga duración ( $> 2$  mseg), 3) localización de los sitios de registro en la línea media.

### **Efectos sobre la frecuencia de disparo tras la administración de nicotina.**

La figura 1A resume los efectos de la administración de nicotina sobre la frecuencia de disparo. La administración en perfusión a la concentración 0.215 uM incrementó en el 66.66% (6/9) de las células la frecuencia de disparo, el porcentaje de incremento fue de 208% (\*  $p < 0.01$ ) mientras que el 33.34% exhibió una reducción, y el porcentaje de reducción fue de 35.80%. A la concentración de 2.15 uM el 66.66% (6/9) de las células mostró un incremento en la frecuencia de disparo, el porcentaje de incremento fue de 408.29% (\* $p < 0.01$ ) mientras que el porcentaje de decremento fue de 24.62% en el 33.34% de las células. En la concentración de 21.5 uM el 70% (7/10) de las células mostró un incremento en la frecuencia de disparo de alrededor de 292.38% y un decremento de 63.61% en el restante 30% de las células. Finalmente a la concentración de 215 uM el 64.28% de las células (9/14) incrementó la frecuencia de disparo alrededor de 366.94% (\* $p \leq 0.008$ ) y el porcentaje de decremento en las células que disminuyeron la frecuencia de disparo (35.72%) fue de 60.91%.

### **Efectos sobre la frecuencia de disparo tras la administración de bicuculina.**

La administración de bicuculina en perfusión (figura 2A) a la concentración de 0.2 uM, incrementó la frecuencia de disparo en el 60% de las células (6/10), el porcentaje de incremento fue de 188.4% mientras que las células que redujeron la frecuencia de disparo (40%) el porcentaje de decremento fue de 66.66%. A la concentración de 2 uM la bicuculina incrementó la frecuencia de disparo en el 66.66% (4/6) el porcentaje de incremento fue de 181.04% mientras que en las células que disminuyeron la frecuencia de disparo el porcentaje de decremento fue de 52.14%.



### **Efectos sobre la frecuencia de disparo tras la administración de faclofen.**

La administración de faclofen a la concentración de 2 uM incrementó la frecuencia de disparo en el 72.72% de las células (n = 8), el porcentaje de incremento fue de 445.95% (\*p < 0.05), mientras que aquellas células que disminuyeron su frecuencia de disparo (n = 3) el porcentaje de decremento fue de 27.28% (Figura 3A). En cuanto a la concentración de 20 uM el faclofen produjo un incremento de 214.14% (\* p < 0.05) en el 71.42% de las neuronas (n = 7), mientras que en el restante 28.58% de la población (n = 2) el faclofen redujo la frecuencia de disparo en aproximadamente un 26.45%.

### **Efectos sobre la frecuencia de disparo tras la administración de WAY 100635.**

La administración de este fármaco produjo un incremento en la frecuencia de disparo en el 75% de las células (n = 6), el porcentaje de incremento fue de 205.42% (\* p < 0.05), mientras que en el 25% restante de las células (n = 2) la reducción fue de 50.61% (figura 4A).

### **Efectos de la bicuculina en presencia de nicotina**

En condiciones basales la frecuencia de disparo fue de  $2.46 \pm 0.22$  espigas/seg, esta se incrementó tras la administración de nicotina a  $5.83 \pm 0.73$  espigas/seg y tras la administración de bicuculina  $10.781 \pm 1.22$  espigas/seg (\*p < 0.05) (figura 2B).

### **Efectos del faclofen en presencia de nicotina**

La administración de faclofen en ambas concentraciones (2 y 20 uM) en presencia de nicotina (2.15 y 21.5 uM) produjo un incremento inicial en la frecuencia de disparo tras

la administración de nicotina seguido de un mayor incremento en la frecuencia de disparo con el faclofen (figura 3B).

### **Efectos del antagonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub> en presencia de nicotina**

La administración del WAY 100635 (140 uM) en presencia de ambas concentraciones de nicotina (2.15 y 21.5 uM) produjo dos respuestas, la primera consistió en un incremento inicial tras la administración de nicotina, seguido de un mayor incremento tras la administración de nic + WAY, este efecto solo fué significativo a la concentración más alta de nicotina (n = 5). La segunda respuesta que encontramos fué una disminución en la frecuencia de disparo tras la administración de nicotina, este efecto fué revertido tras la administración de nic + WAY (figura 4B). Esta última respuesta se presentó a las dos concentraciones de nicotina y solo fue significativo a la menor concentración (n = 5).

### **Discusión Experimento 4.**

El objetivo principal de este trabajo fue demostrar que los efectos indirectos de la administración de nicotina sobre células serotoninérgicas del NDR son mediados a través de la liberación de GABA o serotonina.

En la primera parte de este estudio los resultados demostraron que la administración de nicotina incrementó la frecuencia de disparo en un 65% de las células estudiadas y que en el restante 35% ocasionó una disminución en la frecuencia de disparo. Estos resultados son similares a los reportados previamente por Mihalescu y col. (1998) y Li y col. (1998) en cuanto a la administración de nicotina se refiere. De manera similar la administración de bicuculina produjo un incremento en el 62.5 % de nuestra muestra de células y una

reducción en el restante 37.5%. Porcentajes similares encontraron tras la administración de faclofen (72.22% y 21.78% respectivamente) y del antagonista del receptor 5-HT<sub>1A</sub> WAY 100635 (75% y 25%). Estos resultados apoyan trabajos previos los cuales han demostrado que la actividad de las células serotoninérgicas del NDR están reguladas tanto por mecanismos inhibitorios y excitatorios. Por lo que toca a los mecanismos inhibitorios esto es principalmente a través de la estimulación de autorreceptores 5-HT<sub>1A</sub> (Wang y Aghajanian, 1977) y receptores GABAérgicos tanto GABA<sub>A</sub> (Pan y Williams, 1989) como GABA<sub>B</sub> (Colmers y Williams, 1988; Innis y col., 1988; Williams y col., 1988). En cuanto a los mecanismos excitatorios esto se da vía receptores de glutamato (Pan y col., 1989), y alfa adrenérgicos (Van der Maelen y Aghajanian, 1983).

Por lo que toca a la administración de los antagonistas de los receptores de GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> los resultados sugieren la existencia de dos poblaciones neuronales dentro del NDR una que es tónicamente inhibida por GABA y con sensibilidad reducida para la 5-HT y la otra con baja sensibilidad a GABA pero con mayor sensibilidad para la serotonina. En apoyo a esta observación existe evidencia tanto morfológica como neuroquímica de interacciones GABAérgica-serotoninérgicas a nivel del NDR (Harandi y col., 1987; Forchetti y col., 1981), asimismo se ha reportado que en otras regiones del cerebro la nicotina libera GABA (Yang y col., 1996). Recientemente se ha sugerido que receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> podrían estar presentes post sinápticamente sobre las neuronas serotoninérgicas (Bagdy y col. 2000). Así, además del mecanismo de autoinhibición mediado por receptores 5-HT<sub>1A</sub> que regula de manera negativa la actividad de las células serotoninérgicas, recientemente se ha sugerido que otro mecanismo que podría regular de manera negativa la actividad de estas células es a través de la activación de neuronas

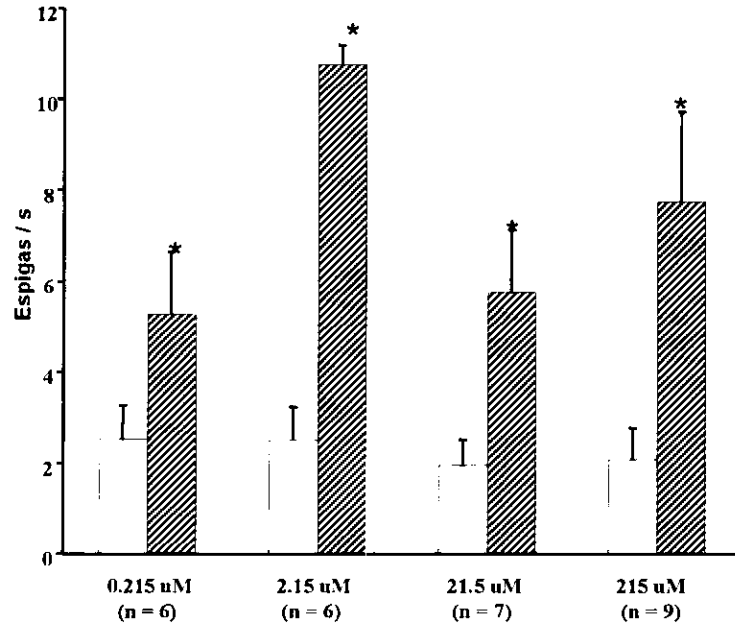
GABAérgicas (Abellán y col., 2000). De tal forma el efecto observado tras administración de la nicotina podría incrementar la liberación de GABA el cual a través de receptores GABA<sub>A</sub> y/o GABA<sub>B</sub> inhibiría la frecuencia de disparo en el 30% de nuestras células serotoninérgicas tras la administración de nicotina.

En cuanto a la administración del antagonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub> WAY 100635, los resultados sugieren que este mecanismo es probablemente el más importante en mediar los efectos inhibitorios indirectos de la nicotina. En aquellas células en las cuales la nicotina inhibió la frecuencia de disparo la administración del WAY 100635 revirtió el efecto, y por el otro lado en aquellos casos en los que la nicotina incrementó la frecuencia de disparo, la administración de este fármaco potenció el efecto de la nicotina. En apoyo a esta observación recientemente Engberg y col., (2000) demostraron que la administración sistémica de nicotina inhibió la frecuencia de disparo de neuronas serotoninérgicas en ratas anestesiadas, y que este efecto fué bloqueado cuando se administró previamente WAY 100635.

Estos datos en conjunto indican que los efectos indirectos de la nicotina se deben a la liberación tanto de GABA como de 5-HT en nuestras células y que el efecto inhibitorio sea debido principalmente a la estimulación de receptores somatodendríticos (5-HT<sub>1A</sub>) en las células serotoninérgicas del NDR.

## Frecuencia de Disparo.

Efecto estimulador nicotina  
n = 26 (65%)



Efecto inhibidor nicotina  
n = 14 (35%)

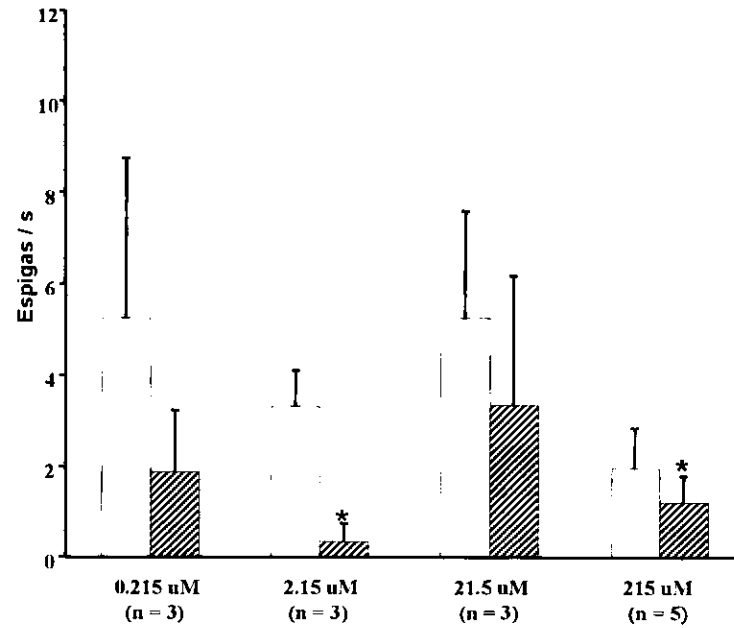
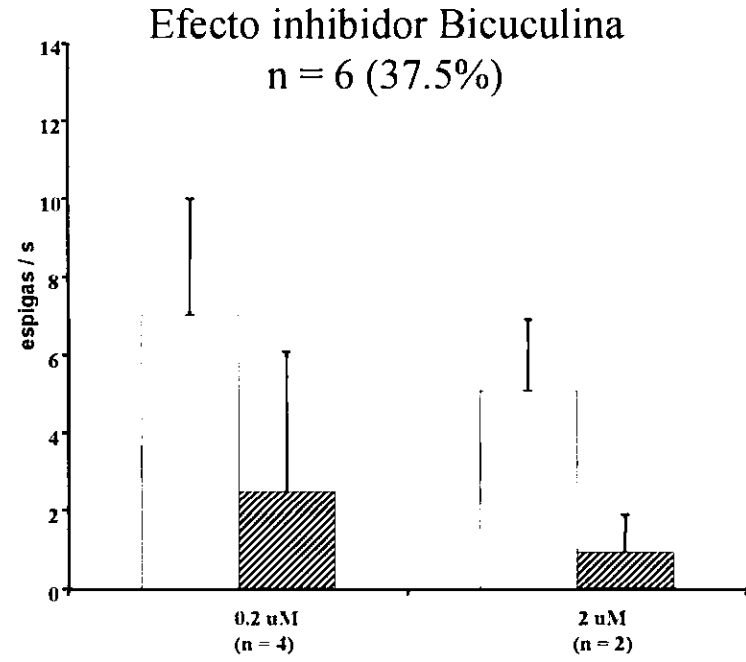
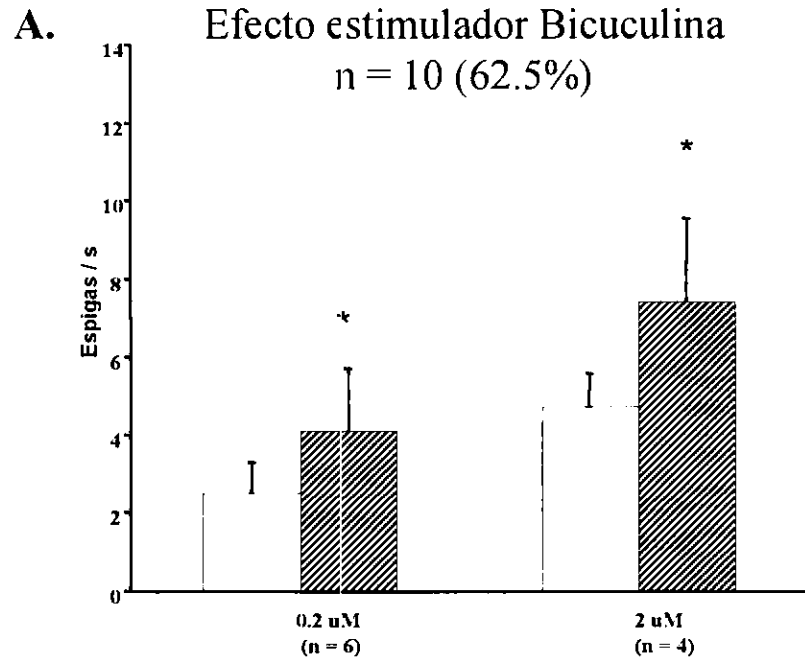


Figura 1

# Frecuencia de Disparo.



**B.** Nic (2.15 uM) / Nic (2.15 uM) + bicuculina (2 uM)

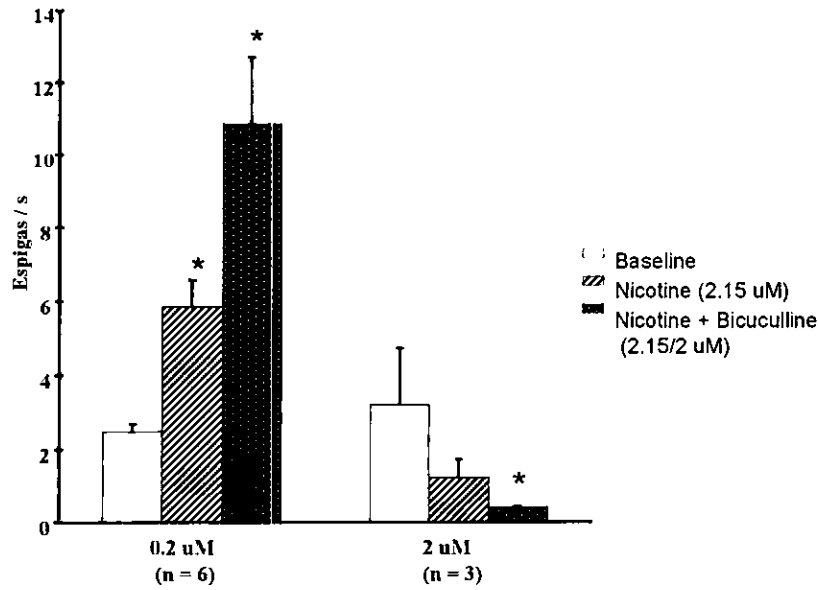


Figura 2

# Frecuencia de Disparo.

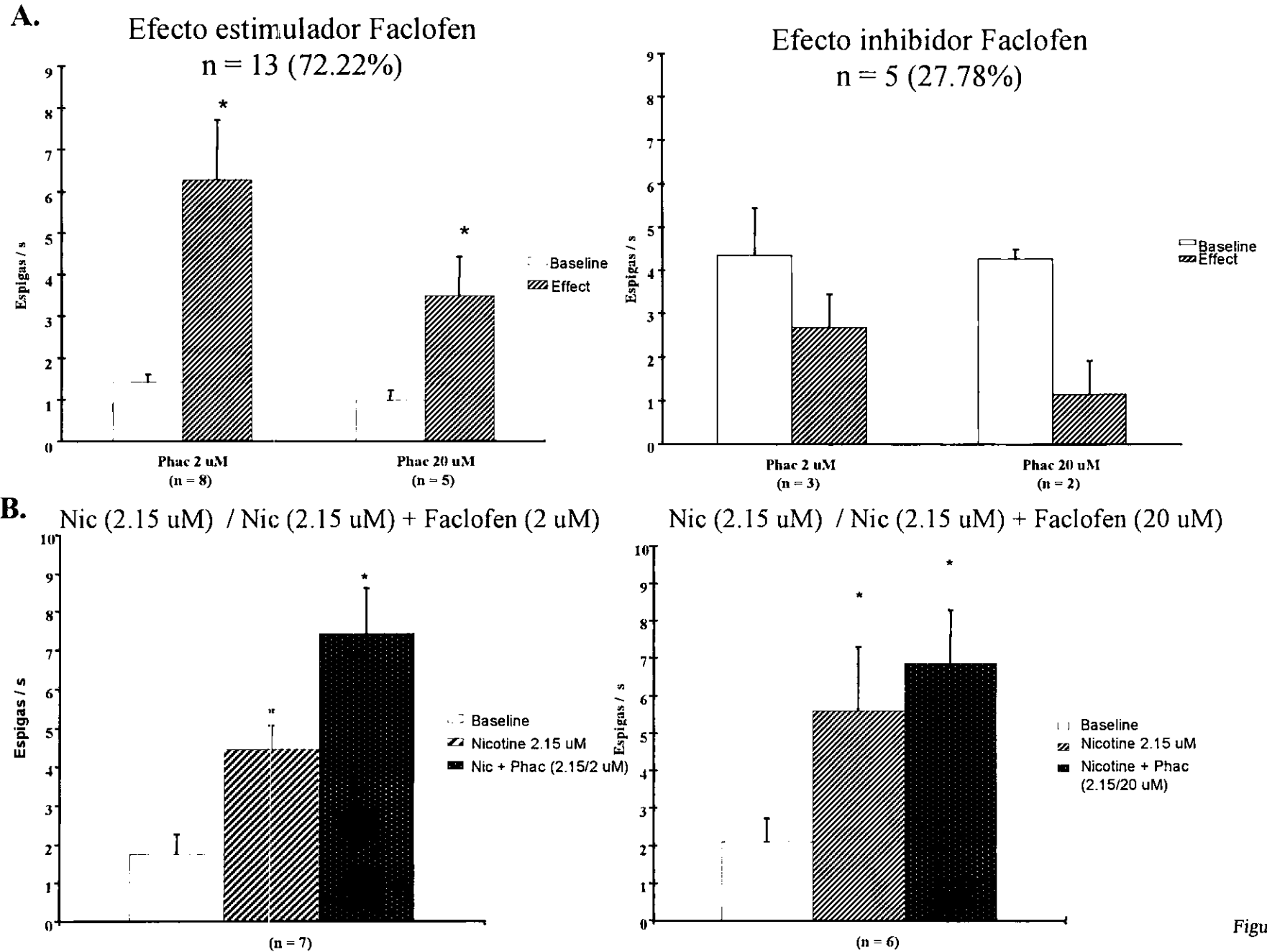
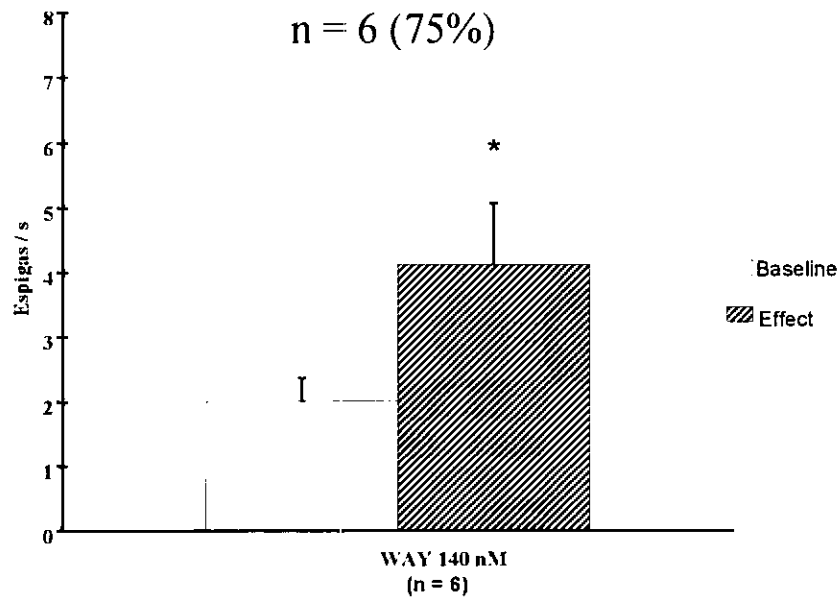


Figura 3

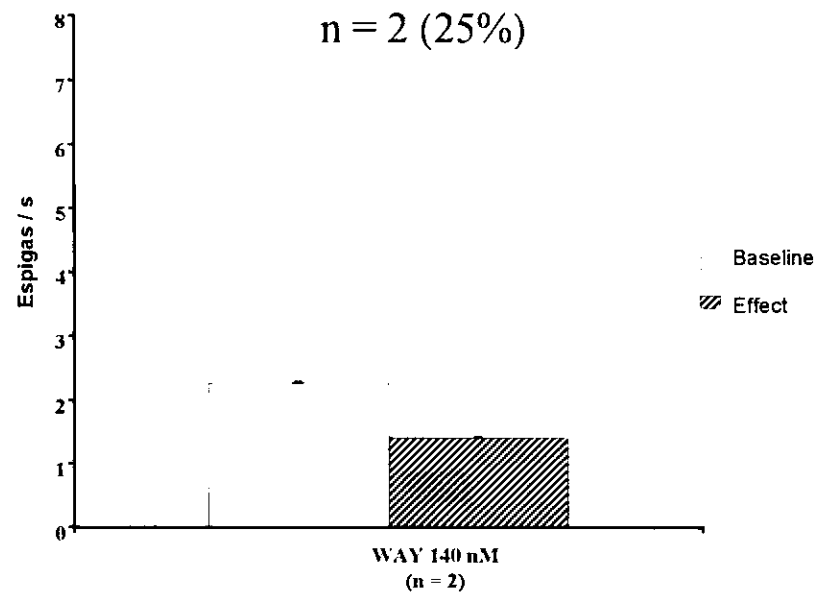
# Frecuencia de Disparo.

**A.**

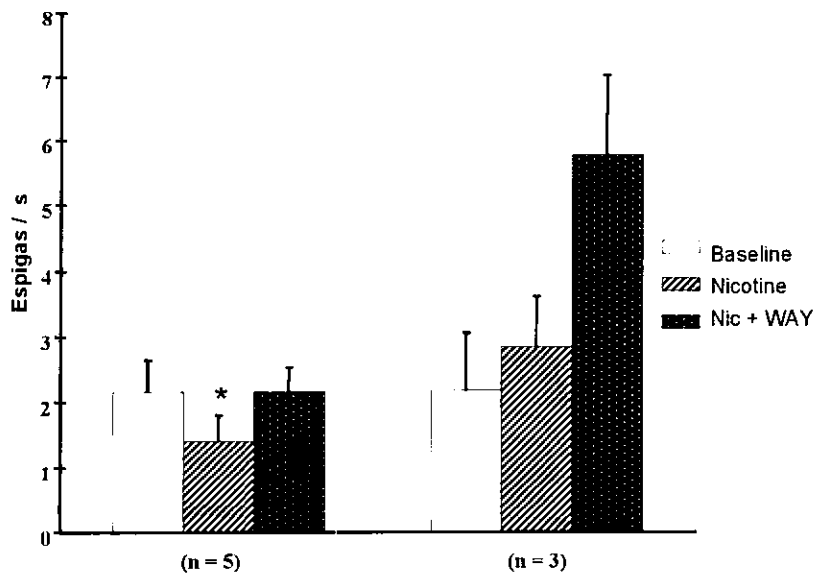
Efecto estimulador WAY 100635  
n = 6 (75%)



Efecto inhibitor WAY 100635  
n = 2 (25%)



**B.** Nic (2.15 uM) / Nic (2.15 uM) + WAY (140 nM)



Nic (21.5 uM) / Nic (21.5 uM) + WAY (140 nM)

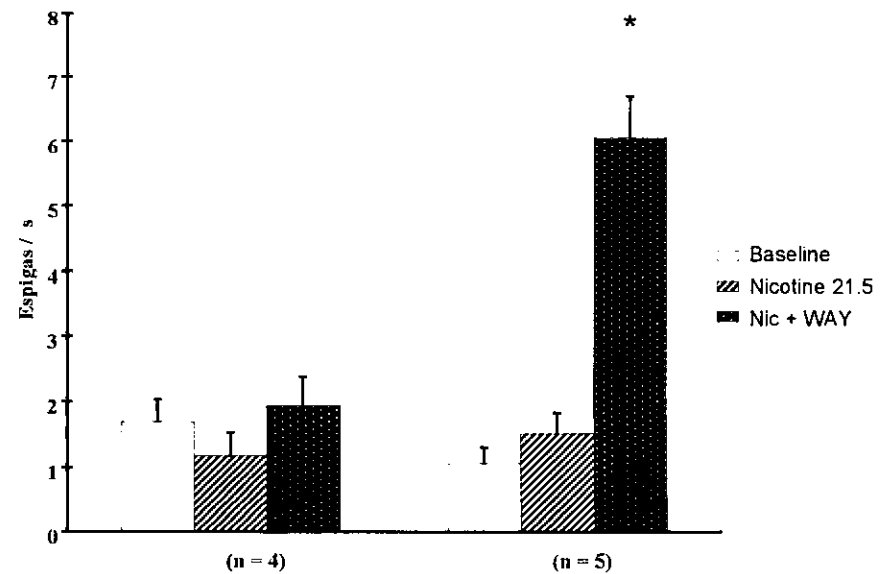


Figura 4



## Discusión

Los resultados obtenidos en el primer experimento indican que las células identificadas como putativamente serotoninérgicas (PSNs) exhiben características similares a las descritas previamente en gatos en libre movimiento (McGinty y Harper 1976; Trulson y Jacobs 1979; Lydic y col., 1983; 1985). Previamente solo un reporte (Kocsis y Vertes, 1992) señaló la existencia de células serotoninérgicas ( $n = 8$ ) exhibiendo el patrón de disparo REM-off sin embargo no hay mayores datos proporcionados en ese reporte.

Los criterios utilizados para clasificar a estas PSNs exhibiendo el patrón de disparo REM off incluyen: 1) patrón de disparo de baja frecuencia; 2) potenciales de acción de larga duración ( $> 2$  milisegundos); 3) un patrón de disparo que disminuye progresivamente a lo largo del ciclo sueño-vigilia esto es, exhiben su mayor frecuencia de disparo durante vigilia, disminuyen durante la fase de sueño NMOR y prácticamente cesan de disparar durante la fase de sueño MOR; 4) marcada supresión en la actividad de estas células tras la estimulación del agonista de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> 8-OH-DPAT y 5) localización histológica de los sitios de registro dentro del NDR. Asimismo algunas de nuestras células exhibieron un patrón de disparo más regular que otras, en concordancia con reportes previos llevados a cabo en gatos en libre movimiento (Shima y col. 1986). Con objeto de evaluar si el patrón de disparo era dependiente de estado se llevó a cabo un análisis de la transición sueño NMOR-sueño MOR, este análisis demostró que la frecuencia de disparo disminuye de manera progresiva a lo largo de esta transición alcanzando el nivel más bajo 25 segundos antes de la aparición de sueño MOR. Un análisis similar en cuanto a los

cambios en este periodo fué reportado previamente (Lydic y col. 1983; 1985) con hallazgos similares. Asimismo en ese reporte se demostró que existe una correlación inversa entre la actividad del NDR y la presencia de espigas PGO, lo cual apoya la hipótesis de que las células serotoninérgicas del NDR ejercen un efecto inhibitorio en la generación de las PGOs.

Es importante mencionar que de acuerdo al patrón de disparo exhibido por las células del NDR, solo una tercera parte (24/75) exhibió el patrón REM-off. Estudios previos han indicado que la población del NDR no es homogénea, y que solo una tercera parte es considerada serotoninérgica (Descarries 1982; Johnson 1994), así el hecho de que solo una parte de las células registradas sean clasificadas como PSNs tiene correspondencia con estos hallazgos inmunohistoquímicos de que solo un tercio de las células sean serotoninérgicas, por lo que es posible que el resto de las células registradas pertenezca a algún otro tipo de célula.

Estos datos en conjunto indican que en ratas en libre movimiento es posible registrar el patrón de disparo REM-off, tal y como el exhibido en gatos en libre movimiento. La existencia de este patrón de disparo REM-off en ratas ha sido demostrado en otros núcleos, que también participan en la regulación del SMOR como las células noradrenérgicas del locus coeruleus exhiben el patrón de disparo REM-off (Aston-Jones y Bloom 1981). Asimismo estudios in vivo han indicado que en ratas los niveles de serotonina colectados por microdialisis en la corteza (Portas y col., 1996) se reducen de manera paralela a la actividad exhibida por las células REM-off del NDR. Recientemente fué reportado este patrón de disparo en el NDR de perros narcolépticos (Wu y col., 1999). Estudios

adicionales serán necesarios para corroborar si las mismas propiedades de estas células del NDR encontradas en gatos (Jacobs y Fornal 1999) son similares a las encontradas en ratas. Estos datos nos sugieren que en diferentes especies los mismos mecanismos reguladores de la generación de sueño MOR están presentes.

Por lo que toca al segundo experimento el hallazgo más importante fue que la administración de nicotina incrementó la frecuencia de disparo de células identificadas como PSNs durante la fase de sueño MOR, sin cambios significativos durante vigilia o sueño NMOR. Este hallazgo contrasta parcialmente con un reporte reciente (Engberg y col. 2000) donde se demostró que la administración de nicotina por vía i.v. suprime de manera transitoria la frecuencia de disparo de neuronas del NDR, y que este efecto es bloqueado en presencia de antagonistas del receptor 5-HT<sub>1A</sub>. Es importante señalar que en ese reporte el estudio fué llevado a cabo en ratas anestesiadas lo cual podría explicar el efecto observado en dicho experimento. Sin embargo el hecho de que el efecto fue bloqueado por antagonistas del receptor 5-HT<sub>1A</sub> sugeriría que el efecto se debe a un incremento en la liberación de 5-HT el cual inhibiría la frecuencia de disparo de estas células. Lo anterior ha sido sugerido por Aghajanian (Wang y Aghajanian 1977) quien ha propuesto que existe un mecanismo de retroalimentación negativa en cuanto a la frecuencia de disparo y liberación de 5-HT, así un incremento en la frecuencia de disparo y/o liberación de 5-HT estimularía a autorreceptores somatodendríticos (5-HT<sub>1A</sub>) inhibiendo la frecuencia de disparo y liberación de 5-HT. Por otro lado dos reportes previos *in vitro* han demostrado que la administración de nicotina incrementa la frecuencia de disparo y la liberación de 5-HT en rebanadas de cerebro medio (Mihailescu y col., 1998) de una manera dosis-dependiente y que este efecto es mediado presinápticamente (Li y col., 1998). En apoyo a esto se ha

demostrado que la administración sistémica de nicotina (Ribeiro y col., 1993; Summers y col., 1995) y agonistas nicotínicos (Summers y Giacobini, 1995) incrementan la liberación de 5-HT medido a nivel cortical. Así, el hallazgo del segundo experimento está en concordancia con estos trabajos y el efecto parece ser mediado por la estimulación de receptores nicotínicos presentes en el NDR.

Los receptores nicotínicos participan en la liberación de varios neurotransmisores, y al parecer este efecto es mediado presinápticamente (Wonnacot 1997), dentro de los neurotransmisores que son liberados por la estimulación de los receptores nicotínicos están el GABA, Noradrenalina, Acetilcolina y Serotonina. En ratas ha sido documentada la presencia de receptores nicotínicos, a nivel del NDR (Segal y col. 1978), de hecho recientemente se ha demostrado que existen homopentámeros ( $\alpha 7$ ) a nivel de este núcleo los cuales son conocidos por exhibir una gran permeabilidad al  $Ca^{2+}$ . Así, es posible que la administración de nicotina afecte a los receptores nicotínicos presentes en el NDR estimulando la liberación de 5-HT. Este hallazgo tiene algunas implicaciones dos de las cuales mencionaré a continuación.

Se ha sugerido que las células serotoninérgicas del NDR juegan un papel permisivo en la generación de espigas PGO. Es posible que la administración de nicotina estimule la liberación de 5-HT desde el NDR y vía proyecciones (Datta y col. 1999) a los núcleos que participan en la génesis de espigas PGO inhiba la actividad de estos núcleos.

Por otro lado, es posible que el efecto observado tras la administración de nicotina en pacientes con depresión mayor se deba a esta liberación de 5-HT del NDR. Es conocida

la relación entre depresión y fumar (Benowitz 1996), de hecho algunos grupos sugieren que la gente fuma como una forma de automedicación (Koob 1999), asumiendo la capacidad que tiene la nicotina de liberar diferentes neurotransmisores a nivel central. Así, aquellos pacientes fumadores crónicos cuando cesan de fumar súbitamente experimentando depresión, respondiendo a antidepresivos como el bupropión (Shiffman y col. 2000).

El incremento en la frecuencia de disparo de estas PSNs fué significativo solo durante la fase de SMOR sin afectar de manera importante la actividad de estas células durante vigilia o durante el sueño NMOR, y que este efecto fue mayor durante la transición SMOR-SNMOR cuando aparecen las espigas PGO. Este hallazgo es consistente con reportes previos en los cuales tras la administración de fluoxetina (Ross et al., 1992) un inhibidor de la recaptura de 5-HT y eltoprazine (Quattrochi y col., 1992) un agonista 5-HT1 disminuyeron la presencia de espigas PGO en esta transición.

En nuestro segundo experimento encontramos también que el incremento en la actividad de las PSNs durante la fase de sueño MOR se correspondía con incremento en la duración de esta fase de sueño. Este hallazgo podría parecer paradójico de acuerdo al modelo de interacción recíproca de Hobson y McCarley (1975), sin embargo es posible que a la dosis utilizada, la nicotina estimule simultáneamente a las células del NDR y a las células del LDT y/o PPT, lo cual explicaría este incremento en la duración de sueño MOR y al mismo tiempo la supresión de las espigas PGO. Asimismo Callaway y col., (1987) han sugerido que los mecanismos que participan en la generación de sueño MOR y la de espigas PGO podrían correr de manera paralela.

Hasta este punto estos experimentos sugieren que el incremento en la frecuencia de disparo y liberación de 5-HT tras la administración de nicotina inhibiría la actividad de las células generadoras de PGOs, sin embargo para demostrar que una interacción del NDR con el PPT/LDT existe, se llevó a cabo el tercer experimento en el cual encontramos que al administrar nicotina en el NRD, registrando simultáneamente la actividad del LDT o PPT y del NRD, los incrementos en la frecuencia de disparo del NDR se corresponden con una disminución de la actividad del LDT o PPT y recíprocamente la disminución en la actividad del NDR es simultánea con un incremento en la actividad de estos núcleos colinérgicos. Estos efectos al parecer son mediados a través del receptor 5-HT<sub>1A</sub> ya que la administración de WAY 100635 (antagonista de estos receptores) en el LDT bloquea el efecto inhibitorio tras la administración de nicotina en el NDR.

Desde los años 60s es bien conocido que el tegmento pontino participa en la generación de sueño MOR, así como sus componentes tónicos y fásicos, particularmente las espigas PGO. Estudios electrofisiológicos han indicado que una subpoblación del PPT/LDT dispara preferencialmente antes y durante la fase de SMOR (el Mansari y col., 1989; Steriade y col., 1990; 1990A; Kayama y col. 1992). A las células que exhiben este patrón de disparo se les denomina como REM-on, mientras que aquellas que participan en la generación de PGOs se denominan como PGO-on. Por otra lado se ha reportado que una subpoblación de células en estos núcleos es activo tanto en vigilia como en SMOR denominándose a estas células como Wake/REM-on.

Con respecto al control de la actividad de estas células colinérgicas, las neuronas monoaminérgicas tanto del NRD (McGinty y Harper, 1976; Trulson y Jacobs 1979; Lydic

y col. 1983) y del locus coeruleus (LC) (Aston-Jones y Bloom 1981) exhiben un patrón de disparo que es opuesto al de las células del PPT/LDT. Esta correlación inversa entre la actividad de estos núcleos monoaminérgicos con la generación de SMOR y PGOs condujo a postular el modelo de interacción recíproca. Asimismo se han descrito proyecciones del NRD a las células colinérgicas del LDT y del PPT (Semba y Fibiger, 1992; Honda y Semba, 1994; Steininger y col. 1997), mientras que estudios *in vitro* han indicado que una subpoblación de células de LDT y el PPT es hiperpolarizada tras la administración de 5-HT (Luebcke y col. 1992; Leonard y Llinás 1994). Estudios realizados *in vivo* apoyan la presencia de modulación serotoninérgica en las células del LDT y del PPT. Así Thakkar y col. (1998) recientemente demostraron que la aplicación del agonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub> 8-OHDPAT inhibe la actividad de células con patrón de disparo REM-on del LDT/PPT. De igual forma Horner y col. (1997) y Sanford y col. (1994) demostraron que la microinyección de 5-HT en el LDT o PPT reducen la cantidad de sueño MOR.

Esta evidencia en conjunto sugiere una modulación serotoninérgica del PPT/LDT. Sin embargo, todos estos datos son indirectos y una prueba directa de modulación serotoninérgica del LDT/PPT no existe. Así, nuestro tercer experimento demostró que registrando simultáneamente a células del NDR y del LDT o PPT (identificadas como presuntamente serotoninérgicas y colinérgicas, respectivamente) existe una correlación inversa tras la aplicación de nicotina en el NDR. Estos experimentos demostraron que este efecto es mediado a través de receptores 5-HT<sub>1A</sub> ya que la administración del antagonista específico de estos receptores WAY 100635 en el LDT bloqueó el efecto inhibitorio en la actividad de estas células tras un incremento en la frecuencia de disparo de las células del NDR. Así estos efectos demuestran de manera directa la presencia de modulación

serotoninérgica de las células colinérgicas del LDT y el PPT. Interacciones con células colinérgicas del LDT han sido demostradas con otras monoaminas. Koyama y Kayama (1993) han demostrado que la administración de norepinefrina inhibió la actividad de células presuntamente colinérgicas del LDT.

Estos resultados apoyan nuestra hipótesis de que el efecto inhibitorio sobre la generación de espigas PGO tras la administración de nicotina es un efecto mediado por la estimulación de las células serotoninérgicas del NDR. Sin embargo Sanford y col. (1996) reportaron que la aplicación de 8-OHDPAT en el PPT no suprimía la presencia de espigas PGO inducidas (PGO elicited) en ratas. A este respecto es difícil establecer si estas PGOs inducidas en ratas son equivalentes a las PGOs que ocurren normalmente durante el SMOR en gatos o en ratas y por tanto si son moduladas por los mismos mecanismos que regulan a las primeras.

Este tercer experimentos podría tener implicaciones clínicas. Se ha sugerido que una disminución en los niveles de 5-HT es un componente importante en la patogenia de la depresión (de Blier y Monigny, 1994). Estos pacientes muestran alteraciones en el ciclo sueño-vigilia, dentro de estas alteraciones es importante mencionar fragmentación de sueño, latencia acortada a sueño MOR, incremento en la duración de esta fase de sueño y los antidepresivos tricíclicos tienden a normalizar estos parámetros (Vogel y col., 1990A). La actividad de los núcleos LDT y PPT ha generado dos hipótesis para poder explicar estas alteraciones vistas en los pacientes con depresión mayor: el modelo de interacción recíproca de Hobson y McCarley (1975, 1992) y el incremento en la actividad colinérgica de estas células (Gillin y col., 1991). Debido a que los circuitos colinérgicos de estos dos



núcleos están implicados en estas dos hipótesis es posible que nos sean mutuamente excluyentes. En cuanto al modelo de interacción recíproca este indica que un tono monoaminérgico deficiente, particularmente en la forma de una disminución en el disparo de las células serotoninérgicas del NDR juega un papel permisivo en desinhibir al PPT / LDT y por tanto a los circuitos sinápticos que generan el SMOR (Steriade, 1990). Por lo que toca a la segunda hipótesis esta sugiere que el patrón anormal de sueño MOR característico de la depresión refleja una hipersensibilidad de los receptores muscarínicos a la acetilcolina. Este concepto es apoyado por los experimentos en los cuales la administración de agonistas muscarínicos a pacientes con depresión reduce la latencia a SMOR (Gillin y col. 1991; 1993).

Así es posible que el incremento en la actividad de las células del NDR durante la fase de sueño MOR (experimento 2) y la relación inversa entre la actividad del NDR y la de los núcleos PPT y LDT que encontramos en el tercer experimento expliquen el efecto que tiene en mejorar el estado de ánimo observado en pacientes con depresión mayor tras la administración de nicotina por vía transdérmica (Salín-Pascual y Drucker-Colín, 1998). Así proponemos que la administración de nicotina ejerce sus efectos terapéuticos a través de la liberación de 5-HT la cual a su vez estimula a las células del PPT/LDT lo que explica la supresión de espigas PGO.

Los resultados obtenidos en los experimentos 2 y 3 indican que los efectos de la nicotina sobre las células identificadas como PSNs en el rafé pueden ser directos o indirectos. En ambos experimentos aproximadamente en un 70% de los casos la administración de nicotina produjo un incremento en la actividad de estas células, mientras

que en el restante 30% el efecto fue inhibitorio. Es posible que la administración de nicotina tenga efectos directos y/o indirectos en el NDR.

En cuanto a la primera posibilidad (efectos directos) se ha reportado la presencia de receptores nicotínicos a nivel del NDR en ratas (Segal 1978) y otras especies que incluyen ratones (Deutch y col., 1987), gatos (Pin y col. 1968) y humanos (Benwell y col., 1988). Asimismo recientemente fue posible distinguir que el subtipo de receptores que está presente a nivel de este núcleo es el  $\alpha 7$ . Este subtipo de receptor nicotínico posee gran permeabilidad al  $Ca^{2+}$ . Así el efecto estimulador de la nicotina podría ser mediado directamente a través de la estimulación de estos receptores nicotínicos.

Por lo que toca a los efectos indirectos estos pueden ser tanto estimuladores o inhibitorios. Así, se ha demostrado que la administración de nicotina incrementa la liberación de varios neurotransmisores dentro de estos tenemos al: glutamato, noradrenalina, acetilcolina, dopamina, GABA y 5-HT (Summers y col. 1995; Summers y col. 1996) por lo que es posible que la liberación de alguno de estos neurotransmisores juegue un papel en mediar estos efectos indirectos. Dos de estos candidatos en mediar estos efectos a nivel del NDR podría ser GABA y 5-HT ya que estos dos tipos celulares son los mas abundantes en el NDR (Johnson 1994), y se han sugerido interacciones serotoninérgicas-GABAérgicas a nivel de hipocampo (Shen y Andrade, 1998) e incluso en el rafe (Liu y col., 2000; Bagdy y col., 2000; Abellán y col., 2000).

Los resultados obtenidos tras la administración del antagonista de receptores de GABA<sub>A</sub> bicuculina sugieren la existencia de dos poblaciones neuronales dentro del DRN:

una tónicamente inhibida por GABA y con sensibilidad reducida para 5-HT y la otra con baja sensibilidad a GABA y con alta sensibilidad por la serotonina. En apoyo a esto se ha sugerido una sensibilidad diferente a GABA en células serotoninérgicas en animales en libre movimiento (Levin y col., 1996; Gervasoni y col., 2000) y se ha demostrado que la administración de bicuculina dentro del rafé incrementó la liberación de 5-HT (Tao y col., 1996). Así, es posible que diferentes efectos sean mediados por poblaciones neuronales serotoninérgicas diferentes.

Por lo que toca a los efectos de la administración del antagonista de receptores de GABA<sub>B</sub> flaclofen en presencia de nicotina, este al parecer potenció los efectos estimulatorios de la nicotina. Tao y col. (1996) reportaron que la administración de flaclofen disminuía la liberación de 5-HT en el rafé. Sin embargo, en apoyo a nuestros resultados recientemente (Bagdy y col., 2000) reportaron que la administración de flaclofen incrementó la liberación de serotonina en células del NDR. En este último trabajo (a diferencia del de Tao y col., 1996) las concentraciones de flaclofen fueron similares a las utilizadas en nuestro trabajo. Asimismo, Abellán y col. (2000) demostraron que la administración del agonista de receptores GABA<sub>B</sub> baclofen en bajas concentraciones como las utilizadas en este experimento actúa predominantemente a nivel presináptico en neuronas GABAérgicas del NDR inhibiendo la liberación de GABA lo cual conduce a desinhibición de las células serotoninérgicas.

Los resultados obtenidos tras la administración de WAY 100635 en presencia de nicotina demostraron que los efectos de este último son mediados indirectamente por la liberación de 5-HT. Este hecho fue demostrado en aquellas células en las cuales la

administración de nicotina produjo una inhibición en la frecuencia de disparo, este efecto fué revertido tras la administración del agonista de receptores 5-HT<sub>1A</sub> WAY 100635. Engberg y col. (2000) reportaron recientemente que la administración de nicotina por vía i.v. inhibía de manera transitoria la frecuencia de disparo de células del NDR en ratas anestesiadas. Este efecto fué bloqueado tras la administración del WAY 100635. Asimismo Rasmussen y col., (1997) demostraron que el tratamiento crónico con nicotina modificaba la sensibilidad del receptor 5-HT<sub>1A</sub>. Estos trabajos apoyan el hecho de que los efectos de la nicotina sobre la actividad de las células serotoninérgicas del NDR es mediado indirectamente a través de la liberación de 5-HT de estas células.

Estos resultados confirman el hecho de que el incremento en la actividad de las células serotoninérgicas del NDR tras la estimulación con nicotina participe en la supresión de espigas PGO durante la fase de sueño MOR, y que este incremento en la actividad de las células serotoninérgicas explique la mejoría en el estado de ánimo observado en pacientes con depresión mayor y la supresión de las espigas PGO.

### **Conclusiones.**

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la administración de nicotina tanto *in vivo* como *in vitro*, incrementa la actividad de las células serotoninérgicas del núcleo dorsal del rafé. Estos resultados sugieren que el efecto observado tras la mejoría del estado de ánimo en pacientes con depresión mayor y la supresión de las espigas pontogeniculo-occipitales de la fase de sueño MOR son efectos mediados por la estimulación de estas células del rafé.

## Referencias.

Abellán M.T., Jolas T., Aghajanian G.K., Artigas F. Dual Control of Dorsal raphe serotonergic neurons by GABA<sub>B</sub> receptors. Electrophysiological and microdialysis studies. *Synapse*, 2000, 36:21-34.

Aghajanian G.K., Foote W.E., Sheard M.H. Lysergic acid diethylamide: sensitive neuronal units in the midbrain raphe. *Science*, 1968 161(842):706-8.

Alkondon M., Albuquerque E.X. Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. I. Pharmacological and functional evidence for distinct structural subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1993, 265(3): 1455-73.

Aserinski E., Kleitman N. Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science* 1953, 118:273-274.

Asikainen M., Toppila J., Alanko L., Ward D.J., Stenberg D., Porkka-Heiskanen T. Sleep deprivation increases brain serotonin turnover in the rat. *NeuroReport*, 1997, 8:1577-1582.

Aston-Jones G., Bloom F.E. Activity of norepinephrine-containing locus coeruleus neurons in behaving rats anticipates fluctuations in the sleep-waking cycle. *J Neurosci*. 1981 1(8): 876-86.

Bagdy E., Kiraly I., Harsing L.G. Reciprocal innervation between serotonergic and GABAergic neurons in raphe nuclei of the rat. *Neurochem. Res.*, 2000: 1465-73.

Baghdoyan H.A., Rodrigo-Angulo M.L., McCarley R.W., Hobson A.J. Site-specific enhancement and suppression of desynchronized sleep signs following cholinergic stimulation of three brainstem regions. *Brain Res.*, 1984, 306:39-52.

Baghdoyan H.A., Lydic R., Callaway C.W., Hobson J.A. Increased ponto-geniculo-occipital (PGO) wave frequency following central administration of neostigmine. *Neurosci Lett.* 1987, 82(3):278-84.

Baghdoyan H.A., Rodrigo-Angulo M.L., McCarley R.W., Hobson J.A. A neuroanatomical gradient in the pontine tegmentum for the cholinceptive induction of desynchronized sleep signs. *Brain Res.*, 1987, 414(2): 245-61.

Benowitz N.L. Pharmacology of nicotine: addiction and therapeutics. *Ann. Revs. in Pharmacol. Toxicol.*, 1996, 36:597-613.

Benwell M.E., Balfour D.J., Anderson M. Evidence that tobacco smoking increases the density of (-) [<sup>3</sup>H] nicotine binding sites in human brain. *J. Neurochem.*, 1988, 50:1243-1247.

Birnstiel, S., Gerber U., Stevens D.R., Greene R.W., McCarley R.W. Intracellular investigation of nicotinic actions in the rat medial pontine reticular formation in vivo. *Sleep Res.*, 1991, 20:15.

Bitner A.L., Nikkel A.L., Decker M.W. Immunohistochemical detection of alpha-7 nicotinic receptor expression by two distinct cell types in the dorsal raphe and locus coeruleus of rat. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 2000 41.7.

Bizzi E., Brooks D.C. Functional connections between pontine reticular formation and lateral geniculate nucleus during deep sleep. *Arch. Ital. Biol.*, 1963, 101:660-680.

Blier P., de Montigny C. Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacol. Sci.* 1994, 15(7): 220-6.

Boyd J.H., Weissman M.M. Epidemiology of affective disorders: A reexamination and future directions. *Arch. Gen. Psychiatry* 1981, 58:1039-1046.

Bremer F. Historical development on ideas about sleep. En: Petre-Quadens O. y Schlag (Eds). Basic sleep mechanisms. Academic Press, New York. 1974 Pp: 3 - 12.

Brooks D.C., Bizzi E. Brain stem electrical activity during deep sleep. *Arch. Ital. Biol.*, 1963, 101: 648-665.

Brooks D.C., Gershon M.D. An analysis of the effect of reserpine upon ponto-geniculo-occipital wave activity in the cat. *Neuropharmacology* 1972, 11(4): 499-510.

Brooks D.C., Gershon M.D. Eye movement potentials in the oculomotor and visual systems of the cat: a comparison of reserpine induced waves with those present during wakefulness and rapid eye movement sleep. *Brain Res.*, 1971, 27:223-239.

Callaway C.W., Lydic R., Baghdoyan H.A., Hobson A.J. Pontogeniculooccipital waves: spontaneous visual system activity during rapid eye movement sleep. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 1987, 7(2): 105-149.

Clarke P.B. Nicotine dependence--mechanisms and therapeutic strategies. *Biochem. Soc. Symp.*, 1993, 59:83-95.

Cohen B., Feldman M. Relationship of electrical activity in pontine reticular formation and lateral geniculate body to rapid eye movements. *J. Neurophysiol.*, 1968, 31(6):806-17.

Colmers W.F., Williams J.T. Pertussi toxin pretreatment discriminates between pre- and postsynaptic actions of baclofen in rat dorsal raphe nucleus in vitro. *Neurosci. Lett.*, 1988, 93:300-306.

Cooper J.R., Bloom F.E., Roth R.H. The biochemical basis of Neuropharmacology. Seventh Edition. Oxford University Press, Oxford Mass. E.U. 1996.

Cordero-Erausquin M., Marubio L.M., Kink R., Changeux J.P. Nicotinic receptor function: new perspectives from knockout mice. *Trend. Pharmacol. Sci.*, 2000, 21:211-217.

Changeux J.P., Bertrand D., Corringer P.J., Dehaene S., Edelstein S., Léna C., Le Novère N., Marubio L., Picciotto M., Zoli M. Brain nicotinic receptors: structure and regulation, role in learning and reinforcement. *Brain Res. Rev.*, 1998, 26:196-218.

Dahlstrom A., Fuxe K. Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 1964 20(7): 398-9.

Datta S. Cellular basis of pontine Ponto-geniculo-occipital wave generation and modulation. *Cell. Mol. Neurobiol.* 1997, 17(3) 341-365.

Datta S., Siwek D.F., Patterson E.H., Cipolloni P.B. Localization of pontine PGO wave generation sites and their anatomical projections in the rat. *Synapse*, 1998, 30:409-423.

Datta S., Patterson E.H., Siwek D. Brainstem afferents of the cholinergic pontine wave generation sites in the rat. *Sleep Res. Online* 1999, 2:79-82.

Dement W., Kleitman N. Cyclic variations in EEG during sleep and their relation to eye movements, body motility and dreaming. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 1957, 9:673-690.

Deneris ES, Boulter J, Swanson LW, Patrick J, Heinemann S. Beta 3: a new member of nicotinic acetylcholine receptor gene family is expressed in brain. *J. Biol. Chem.*, 1989, 264(11):6268-72.

Descarries L., Gisiger V., Steriade M. Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. *Prog. Neurobiol.*, 1997, 53(5): 603-25.

Descarries L., Watkins K.C., García S., Beaudet A. The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study. *J. Comp. Neurol.*, 1982, 207: 239-254.



Deutch A.Y., Holliday J., Roth R.H., Chun L.L., Hawrot E. Immunohistochemical localization of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor in mammalian brain. *Proc Natl Acad. Sci. U.S.A.*, 1987, 84(23):8697-701.

Domino E.F., Yamamoto K. Nicotine: effect on the sleep cycle of the cat. *Science*, 1965, 150:637-638.

Drucker-Colin R., Bernal-Pedraza J., Fernandez-Cancino F., Morrison A.R. Increasing PGO spike density by auditory stimulation increases the duration and decreases the latency of rapid eye movement (REM) sleep. *Brain Res.*, 1983, 278(1-2): 308-12.

Drucker-Colin R., Bernal-Pedraza J., Fernandez-Cancino F., Oksenberg A. Is vasoactive intestinal polypeptide (VIP) a sleep factor. *Peptides*, 1984, 5(4):837-40.

el Mansari M., Sakai K, Jouvét M. Unitary characteristics of presumptive cholinergic tegmental neurons during the sleep-waking cycle in freely moving cats. *Exp. Brain Res.* 1989, 76(3): 519-29.

Engberg G., Erhardt S., Sharp T., Hajos M. Nicotine inhibits firing activity of dorsal raphe 5-HT neurons in vivo. *Arch. Pharmacol.*, 2000, 362: 41-45.

Farber J., Marks G.A., Roffwarg H.P. Rapid eye movement sleep PGO-type waves are present in the dorsal pons of the albino rat. *Science* 1980 209(4456): 615-7.

Feldman M., Cohen B. Electrical activity in the lateral geniculate body of the alert monkey associated with eye movements. *J. Neurophysiol.* 1968, 31(3): 455-66.

Forchetti C.M., Meek J.L. Evidence for a tonic GABAergic control of serotonin neurons in the median raphe nucleus. *Brain Res.*, 1981, 206:208-12.

Fornal C.A., Jacobs B.L. Physiological and behavioral correlates of serotonergic single-unit activity, in Neuronal Serotonin, Osborne N.N. y Hamon M., Eds., John Wiley, New York, E.U 1988, pp 305-345.

García-García F., Drucker-Colin R. Endogenous and exogenous factors on sleep-wake cycle regulation. *Prog. Neurobiol.* 1999, 58(4): 297-314.

Gardner J.P., Fornal C.A., Jacobs B.L. Effects of sleep deprivation on serotonergic neuronal activity in the dorsal raphe nucleus of the freely moving cat. *Neuropsychopharmacology*, 1997, 17(2): 72-81.

Gervasoni D., Peyron C., Rampon C., Barbagli B., Chouvet G., Urbain N., Fort P., Luppi P.H. Role and origin of the GABAergic innervation of dorsal raphe serotonergic neurons. *J. Neurosci.*, 2000, 20(11): 4217-25.

Gillin C. J., Sutton L., Ruiz C., Kelsoe J., Dupont R.M., Darko D., Risch S.C., Golshan S, Janowsky D. The cholinergic rapid eye movement induction test with arecoline in depression. *Arch. Gen. Psychiatry.*, 1991, 48(3):264-70.

Gillin C.J., Salin-Pascual R., Velazquez-Moctezuma J., Shiromani P., Zoltoski R. Cholinergic receptor subtypes and REM sleep in animals and normal controls. *Progress in Brain Res.*, 1993, 98:379-387.

Harandi M., Aguera M., Gamrani H., Didier M., Maitre M., Calas A., Belin M.  $\gamma$ -Aminobutyric acid, 5-hydroxytryptamine interrelationships in the rat nucleus raphe dorsalis: combination of radioautographic and immunocytochemical techniques at light and electron microscopy levels. *Neuroscience*, 1987, 21:237-251.

Henriksen S.J., Jacobs B.L. Dement W.C. Dependence of REM sleep PGO waves on cholinergic mechanisms. *Brain Res.*, 1972, 48:412-416.

Hernández-Peón R., Chavez-Ibarra G., Morgane P.J., Timo-Iara C. Cholinergic pathways for sleep, alertness and rage in the limbic midbrain circuit. *Acta Neurol. Latinoam.*, 1962, 8:93-96.

Heym J., Steinfels G.F., Jacobs B.L. Activity of serotonin-containing neurons in the nucleus raphe pallidus of freely moving cats. *Brain Res.* 1982, 251:259-276.

Hobson J.A., McCarley R.W., Wyzinski P.W. Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science* 1975, 189(4196): 55-8.

Hobson A.J., Steriade M. Neuronal basis of behavioral state control. En *Handbook of Physiology-The Nervous System IV* (Mountcastle V. y Bloom F.E. eds.), Am. Physiol. Soc., Bethesda MA E.U. 1986, pp 701-823.

Hobson A.J., Datta S., Calvo J.M., Quattrochi J. Acetylcholine as a brain state modulator triggering and long-term regulation of REM sleep. *Progress in Brain Res.*, 1993, 98:389-404.

Hobson A. *Dreaming as delirium*. MIT press. Cambridge Mass. E.U. 1999.

Honda T., Semba K. Serotonergic synaptic input to cholinergic neurons in the rat mesopontine tegmentum. *Brain Res.*, 1994, 647:299-306.

Horner R.L., Sanford L.D., Annis D., Pack A.I., Morrison A.R. Serotonin at the laterodorsal tegmental nucleus suppresses rapid-eye-movement sleep in freely behaving rats. *J. Neurosci.*, 1997, 17(19): 7541-52.

Hu B., Bouhassira D., Steriade M., Deschenes M. The blockage of ponto-geniculo-occipital waves in the cat lateral geniculate nucleus by nicotinic antagonists. *Brain Res.*, 1988, 473:394-397.

Innis R.B., Nestler E.J., Aghajanian G.K. Evidence for G protein mediation of serotonin- and GABA<sub>B</sub>- induced hyperpolarization of rat dorsal raphe neurons. *Brain Res.*, 1988, 459:27-36.

Jacobs B.L., Henriksen S.J., Dement W.C. Neurochemical bases of the PGO wave. *Brain Res.*, 1972, 48:406-11.

Jacobs B.L., Asher R., Dement W.C. Electrophysiological and behavioral effects of electrical stimulation on the raphe nuclei in cats. *Physiol. Behav.*, 1973, 11:489-495.

Jacobs B.L., Fornal C.A. 5-HT and motor control: a hypothesis. *Trends Neurol. Sci.*, 1993, 16(9): 346-352.

Jacobs B.L., Fornal C.A. An integrative role for serotonin in the central nervous system. En: R. Lydic, H. Baghdoyan (Eds.), *Handbook of Behavioral State Control*, CRC Press, Boca Raton, FL E.U. 1999, pp 181-193.

Jacobs B.L., Trulson M.E., Morrison A.R. Raphe unit activity in cats displaying REM sleep without atonia. *Advances in Physiological Sciences*, 1983, 1:315-319.

Jeannerod M., Mouret J. Jouvét M. Effets secondaires de la deafferentation visuelle sur l'activité électrique phasique ponto geniculo occipitale du sommeil paradoxal. *J. Physiol. Paris*, 1965, 57: 255-256.

Jewett R. E., Norton S. Effects of some stimulant and depressant drugs on sleep cycles of cats. *Exp. Neurol.*, 1966, 15:463-474.

Johnson M.D. Electrophysiological and histochemical properties of postnatal rat serotonergic neurons in dissociated cell culture. *Neuroscience*, 1994, 63:775-787.

Jones B.E. Paradoxical sleep and its chemical/structural substrates in the brain. *Neuroscience*, 1992, 40(3): 637-656.

Jones R.T. Tobacco dependence. En *Psychopharmacology: The third generation of progress*. Editado por Herbert Y. Meltzer. Raven Press, New York, 1987: 1589-1595.

Jouvet M., Michel F. Recherches sur l'activité électrique cérébrale au cours du sommeil. *C.R. Soc. Biol.* 1958, 152:1167-1170.

Jouvet M., Michel F. Correlations electromyographiques du sommeil chez le chat decortique et mesencephalique chronique. *C.R. Soc. Biol.*, 1959, 153:422-425.

Jouvet M. Recherches sur les structures nerveuses et mecanismes responsables des differentes phases du sommeil physiologique. *Arch. Ital. Biol.* 1962, 100:125-206.

Jouvet M. Paradoxical sleep mechanisms. *Sleep*, 1994, 17:S77-S83.

Jouvet M. The paradox of sleep: The story of dreaming. MIT prees, Oxford Mass. E.U. 1999.

Kalen P., Strecker R.E., Rosengren E., Bjorklund A. Regulation of striatal serotonin release by the lateral habenula-dorsal raphe pathway in the rat as demonstrated by in vivo microdialysis: role of excitatory amino acids and GABA. *Brain Res.*, 1989, 492(1-2):187-202.

Kayama Y, Ohta M, Jodo E. Firing of 'possibly' cholinergic neurons in the rat laterodorsal tegmental nucleus during sleep and wakefulness. *Brain Res.*, 1992, 569(2):210-20.

Kinney G.G., Vogel G.W., Feng P. Decreased dorsal raphe nucleus neuronal activity in adult chloral hydrate anesthetized rats following neonatal clomipramine treatment: implications for endogenous depression. *Brain Res.*, 1997, 756:68-75.

Kocsis B., Vertes R. P. Dorsal raphe neurons: synchronous discharge with the theta rhythm of the hippocampus in the freely behaving rat. *J. Neurophysiol.* 1992 68 (4): 1463-1467.

Koob G. F. Neuronal mediation of addictive behavior. En: R. Lydic, H. Baghdoyan (Eds.), *Handbook of Behavioral State Control*, CRC Press, Boca Raton, FL E.U. 1999, pp 181-193.

Koyama Y., Kayama Y. Mutual interactions among cholinergic, noradrenergic and serotonergic neurons studied by iontophoresis of these transmitters in rat brainstem nuclei. *Neuroscience*, 1993, 55(4): 1117-1126.

Koyama Y., Sakai K. Modulation of presumed cholinergic mesopontine tegmental neurons by acetylcholine and monoamines applied iontophoretically in unanesthetized cats. *Neuroscience*, 2000, 96 (4): 723-33.

Laurent J.P., Ayala-Guerrero F. Reversible suppression of ponto-geniculo-occipital waves by localized cooling during paradoxical sleep in cats. *Exp. Neurol.*, 1975, 49:356-369.

Le Novere N., Zoli M., Changeux J.P. Neuronal nicotinic receptor alpha 6 subunit mRNA is selectively concentrated in catecholaminergic nuclei of the rat brain. *Eur. J. Neurosci.*, 1996, 8(11): 2428-39.

Lena C., Changeux J.P., Mulle C. Evidence for "preterminal" nicotinic receptors on GABAergic axons in the rat interpeduncular nucleus. *J. Neurosci.*, 1993, 13(6):2680-8.

Leonard C.S., Llinás R. Serotonergic and cholinergic inhibition of mesopontine cholinergic neurons controlling REM sleep: an in vitro electrophysiological study. *Neuroscience*, 1994, 59(2): 309-330.

Levine E.S., Jacobs B.L. Neurochemical afferents controlling the activity of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus: microiontophoretic studies in the awake cat. *J. Neurosci.*, 1992, 12(10): 4037-4044.

Li X., Rainnie D.G., McCarley R.W., Greene R.W. Presynaptic nicotinic receptors facilitate monoaminergic transmission. *J. Neurosci.*, 1998, 18:1904-12.

Liu R., Jolas T., Aghajanian G. Serotonin 5-HT<sub>2</sub> receptors activate local GABA inhibitory inputs to serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus. *Brain Res.*, 2000, 873: 34-45.

Luebcke J.I., Greene R.W., Semba K., Kamondi A., McCarley R.W., Reiner P.B. Serotonin hyperpolarizes cholinergic low-threshold burst neurons in the rat laterodorsal tegmental nucleus in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89:743-747.

Lydic R., McCarley R.W., Hobson A.J. The time-course of dorsal raphe discharge, PGO waves, and muscle tone averaged across multiple sleep cycles. *Brain Res.*, 1983, 274:365-370.

Lydic R., McCarley R.W., Hobson A.J. Timing function of the dorsal raphe nucleus and the temporal organization of the ultradian sleep cycle. *Exp. Brain Res.*, 1985, Suppl. 12:125-144.

Marks G.A., Farber J., Rubinstein M., Roffwarg H.P. Demonstration of ponto-geniculo-occipital waves in the albino rat. *Exp Neurol*. 1980, 69(3): 648-66.

Marks M.J., Pauly J.R., Gross S.D., Deneris E.S., Hermans-Borgmeyer I., Heinemann S.F., Collins A.C. Nicotine binding and nicotinic receptor subunit RNA after chronic nicotine treatment. *J. Neurosci.*, 1992, 12(7): 2765-84.

Maudhuit C., Hamon M., Adrien J. Electrophysiological activity of raphe dorsalis serotonergic neurones in a possible model of endogenous depression. *NeuroReport*, 1995, 6:681-684.

McCarley R.W., Hobson J.A. Neuronal excitability modulation over the sleep cycle: a structural and mathematical model. *Science* 1975, 189(4196):58-60.

McCarley R.W., Nelson J.P., Hobson J.A. Ponto-geniculo-occipital (PGO) burst neurons: correlative evidence for neuronal generators of PGO waves. *Science* 1978, 201(4352): 269-72.

McCarley R.W., Winkelman J.W., Duffy F.H. Human cerebral potentials associated with REM sleep rapid eye movements: links to PGO waves and waking potentials. *Brain Res.*, 1983, 274: 359-364.

McGinty D.J., Harper R.M. Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleep in cats. *Brain Res.*, 1976, 101:569-575.

Mesulam M. M., Mufson E.J. Wainer B.H., Levey A.I. Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience* 1983, 10:1185-1201.

Mesulam M.M. Mufson E.J. Levey A.I. Wainer B.H. Atlas of cholinergic neurons in the forebrain and upper brainstem of the macaque based on monoclonal choline acetyltransferase immunohistochemistry and acetylcholinesterase histochemistry. *Neuroscience* 1984, 12: 669-86.

Mihailescu S., Drucker-Colin R. Nicotine and brain disorders. *Acta Pharmacol. Sinica* 21(2): 97-104.

Mihailescu S., Palomero-Rivero M., Meade-Huerta P., Maza-Flores A., Drucker-Colin R. Effects of nicotine and mecamylamine on rat dorsal raphe neurons. *Eur. J. of Pharmacol.*, 1998, 360:31-36.

Mikiten T., Niebyl P., Hendley C. EEG desynchronization during behavioral sleep associated with spike discharges from the thalamus of the cat. *Fed. Proc.*, 1961, 20:327.

Moruzzi G., Magoun H.W. Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electr. Clin. Neurophysiol.* 1949, 1:455-473.



**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

Mosko S., Jacobs B.L. Recording of dorsal raphe unit activity in vitro. *Neurosci. Lett.*, 1976, 2:195-200.

Mouret J., Jeannerod M., Jouvet M. L'activité électrique du système visuel au cours de la phase paradoxale du sommeil chez le Chat. *J. Physiol.*, Paris, 1963, 55: 305-306.

Nanopoulos D., Belin M.F., Maitre M., Vincendon G., Pujol J.F. Immunocytochemical evidence for the existence of GABAergic neurons in the nucleus raphe dorsalis. Possible existence of neurons containing serotonin and GABA. *Brain Res.*, 1982, 232(2):375-89.

Nauta H. Hypothalamic regulation of sleep in rats. An experimental study. *J. Neurophysiol.*, 1946, 9:285-316.

Nitz D., Siegel J. GABA release in the dorsal raphe nucleus: role in the control of REM sleep. *Am. J. Physiol.*, 1997, 42:R451-R455.

Nitz D., Siegel J. GABA release in the locus coeruleus as a function of sleep/wake state. *Neuroscience*, 1997, 78(33): 795-801.

Pan Z.Z., Williams J.T. GABA and glutamate-mediated synaptic potentials in rat dorsal raphe neurons in vitro. *J. Neurophysiol.*, 1989, 61:719-726.

Perez N., Mattei R., Benedito M. Decreased activity of striatal monoamine oxidase B after rapid eye movement (REM) sleep deprivation in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1998, 60(1): 33-37.

Peyron C., Petit J.M., Rampon C., Jouvet M., Luppi P.H. Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. *Neuroscience*, 1998, 82(2): 443-68.

Pin C., Jones B., Jouvet M. Topographie des neurons monoaminergiques du tronc cerebral du chat: etud par histofluorescence. *C.R. Soc. Biol. (Paris)* 1968, 162: 2136-2141.

Portas C.M., Thakkar M., Rainnie D., McCarley R.W. Microdialysis perfusion of 8-Hydroxy-2-(Di-n-Propylamino) Tetralin (8-OH-DPAT) in the dorsal raphe nucleus decreases serotonin release and increases rapid eye movement sleep in the freely moving cat. *J. Neurosci.*, 1996 16(8) 2820-2828.

Quattrochi J.J., Mamelak A., Binder D.K., Williams J., Rittenhouse C., Hobson A.J. Dynamic suppression of REM sleep by parenteral administration of the serotonin-1 Agonist Eltoprazine. *Sleep*, 1992 15(2): 125-132.

Rasmussen K., Czchura J.F. Nicotine withdrawal leads to increased sensitivity of serotonergic neurons to the 5-HT1A agonist 8-OH-DPAT. *Psychopharmacol.*, 1997, 133:343-346.

Ribeiro E.B., Bettiker R.L., Bogdanov M., Wurtman R.J. Effects of systemic nicotine on serotonin release in rat brain. *Brain Res.*, 1993, 621:311-318.

Ross R.J., Ball W.A., Levitt D.R., Gresch P.J., Morrison A.R. Effects of monoamine reuptake blockade on ponto-geniculo-occipital wave activity. *Neuropharmacol.*, 1990 29(10): 965-968.

Ruch-Monachon M.A., Jalfre M., Haefely W. Drugs and PGO waves in the lateral geniculate body of the curarized cat IV. The effects of acetylcholine, GABA and benzodiazepines on PGO wave activity. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 1976, 219:308-325.

Rye D., Saper C., Lee H. Wainer B. Pedunculopontine tegmental nucleus of the rat: cytoarchitecture, cytochemistry and some extrapyramidal connections of the mesopontine tegmentum. *J. Comp. Neurol.* 1987, 259:483-528.

Rye D.B. Contributions of the pedunculopontine region to normal and altered REM sleep. *Sleep*, 1997, 20(9): 757-788.

Sakai K., Petitjean F., Jouvet M. Effects of ponto-mesencephalic lesions and electrical stimulation upon PGO waves and EMPs in unanesthetized cats. *Electroencephal. Clin. Neurophysiol.*, 1976, 41:49-63.

Sakai K., Jouvet M. Brain stem PGO-on cells projecting directly to the cat dorsal lateral geniculate nucleus. *Brain Res.* 1980, 194:500-505.

Sakai K, Vanni-Mercier G, Jouvet M. Evidence for the presence of PS-OFF neurons in the ventromedial medulla oblongata of freely moving cats. *Exp. Brain Res.*, 1983, 49(2):311-4.

Salin-Pascual R.J., Drucker-Colin R. A novel effect of nicotine on mood and sleep in major depression. *NeuroReport*, 1998, 9(1): 57-60.

Salin-Pascual R.J., Moro-Lopez M.L., González-Sánchez H., Blanco-Centurion C. Changes in sleep after acute and repeated administration of nicotine in the rat. *Psychopharmacol.*, 1999, 145:133-138.

Sanford L.D., Ross R.J., Seggos A.E., Morrison A.R., Ball W.A., Mann G.L. Central administration of two 5-HT receptor agonists: effect on REM sleep initiation and PGO waves. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1994, 49(1): 93-100.

Sanford L.D., Tejani-Butt S.M., Ross R.J., Morrison A.R. Elicited PGO waves in rats: lack of 5-HT<sub>1A</sub> inhibition in putative pontine generator region. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1996, 53(2): 323-7.

Scatton B., Serrano A., Nishikawa T. GABA mimetics decrease extracellular concentrations of 5-HIAA (as measured by in vivo voltammetry) in the dorsal raphe of the rat. *Brain Res.*, 1985, 341(2): 372-6.

Segal M., Dudai Y., Amsterdam A. Distribution of bungarotoxin-binding cholinergic nicotinic receptor in rat brain. *Brain Res.* 1978, 148: 105-119.

Semba K. Aminergic and cholinergic afferents to REM sleep induction regions of the pontine reticular formation in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 1993, 330:543-556.

Semba K., Fibiger H.C. Afferent connections of the laterodorsal and the pedunculopontine tegmental nuclei in the rat: a retro- and antero-grade transport and immunohistochemical study. *J. Comp. Neurol.*, 1992, 323:387-410.

Shen RY, Andrade R. 5-Hydroxytryptamine<sub>2</sub> receptor facilitates GABAergic neurotransmission in rat hippocampus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1998, 285(2):805-12.

Shiffman S., Johnston J.A., Khayrallah M., Elash C.A. Gwaltney C.J., Paty J.A., Gnys M., Evoniuk G., De Veugh-Geiss J. The effect of bupropion on nicotine craving and withdrawal. *Psychopharmacol.*, 2000, 148: 33-40.

Shima K., Nakahama H., Yamamoto M. Firing properties of two types of nucleus raphe dorsalis neurons during the sleep-waking cycle and their responses to sensory stimuli. *Brain Res.*, 1986, 399: 317-26.

Siegel J.M., McGinty D.J. Pontine reticular formation neurons: relationship of discharge to motor activity. *Science* 1977, 196(4290): 678-80.

Simon R.P., Gershon M.D., Brooks D.C. The role of the raphe nuclei in the regulation of ponto-geniculo-occipital wave activity. *Brain Res.* 1973, 58(2): 313-30.

Soldatos C.R., Kales J.D., Scharf M.B. Cigarette smoking associated with sleep difficulty. *Science*, 1980, 207:551-553.

Steininger T.L., Wainer B.H., Blakely R.D., Rye D.B. Serotonergic Dorsal Raphe Nucleus projections to the cholinergic and noncholinergic neurons of the pedunculo-pontine tegmental region: a light and electron microscopic anterograde tracing and immunohistochemical study. *J. Comp. Neurol.*, 1997, 382:302-322.

Steriade M., Pare D., Bouhassira D., Deschenes M., Oakson G. Phasic activation of lateral geniculate and perigeniculate thalamic neurons during sleep with ponto-geniculo-occipital waves. *J. Neurosci.* 1989, 9(7): 2215-29.

Steriade M., Datta S., Paré D., Oakson G., Curro Dossi R. Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems. *J. Neurosci.* 1990, 10(8):2541-2559.

Steriade M., Paré D., Datta S., Dossi C. Different cellular types in mesopontine cholinergic nuclei related to ponto-geniculo-occipital waves. *J. Neurosci.*, 1990A 10(8):2560-2579.

Summers K.L., Giacobini E. Effects of local and repeated systemic administration of (-) nicotine on extracellular levels of acetylcholine, norepinephrine, dopamine and serotonin in rat cortex. *Neurochem. Res.*, 1995, 20(6): 753-759.

Summers K.L., Lippiello P. Giacobini E. A microdialysis study of the effects of the nicotinic agonist RJR-2403 on cortical release of acetylcholine and biogenic amines. *Neurochem. Res.* 1996 21(10):1181-6.

Swanson L.W., Simmons D.M., Whiting P.J., Lindstrom J. Immunohistochemical localization of neuronal nicotinic receptors in the rodent central nervous system. *J. Neurosci.* 1987, 7:3334-42.

Tao R, Ma Z, Auerbach SB. Differential regulation of 5-hydroxytryptamine release by GABAA and GABAB receptors in midbrain raphe nuclei and forebrain of rats. *Br. J. Pharmacol.*, 1996, 119(7): 1375-84.

Thakkar M.M., Strecker R. E., McCarley R.W. Behavioral state control through differential serotonergic inhibition in the mesopontine cholinergic nuclei: a simultaneous unit recording and microdialysis study. *J. Neurosci.*, 1998, 18(14):5490-5497.

Trulson M.E., Jacobs B.L. Raphe unit activity in freely moving cats: correlation with level of behavioral arousal. *Brain Res.*, 1979, 163:135-150.

Trulson M.E., Jacobs B.L. Raphe unit activity in freely moving cats: lack of diurnal variation. *Neurosci. Lett.*, 1983, 36:285-290.

Vandermaelen C.P., Aghajanian G.K. Electrophysiological and pharmacological characterization of serotonergic dorsal raphe neurons recorded extracellularly and intracellularly in rat brain slices. *Brain Res.*, 1983, 289:109-119.

Vazquez J., Guzmán-Marín R., Salin-Pascual R.J., Drucker-Colín R. Transdermal nicotine on sleep and PGO spikes. *Brain Res.*, 1996, 737:317-320.

Veasey S.C., Fornal C.A., Metzler C.W., Jacobs B.L. Single-unit responses of serotonergic dorsal raphe neurons to specific motor challenges in freely moving cats. *Neuroscience* 1997. 79(1): 161-169.

Velazquez-Moctezuma J., Gillin J.C., Shiromani P.J. Effect of specific M1, M2 muscarinic receptor agonists on REM sleep generation. *Brain Res.* 1989, 503(1): 128-31.

Velazquez-Moctezuma J., Shalauta M., Gillin J.C., Shiromani P.J. Cholinergic antagonists and REM sleep generation *Brain Res.* 1991, 543(1):175-9.

Velázquez-Moctezuma J., Shalauta M.D., Gillin C.J., Shiromani P. Microinjections of nicotine in the medial pontine reticular formation elicits REM sleep. *Neurosci. Letters*, 1990, 115:265-268.

Vertes R.P. A lectin horseradish peroxidase study of the origin of ascending fibers in the medial forebrain bundle of the rat. The upper brainstem. *Neuroscience* 1984, 11(3): 669-90.

Vertes R.P. A lectin horseradish peroxidase study of the origin of ascending fibers in the medial forebrain bundle of the rat. The lower brainstem. *Neuroscience* 1984, 11(3):651-68.

Vertes R.P., Kocsis B. Projections of the dorsal raphe nucleus to the brainstem: PHA-L analysis in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 1994, 340:11-26.

Vogel G., Neill D., Hagler M., Kors D. A new animal model of endogenous depression: a summary of present findings. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1990, 14(1): 85-91.

Vogel G.W., Buffenstein A., Minter K., Hennessey A. Drug effects on REM sleep and on endogenous depression. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1990, 14: 49-63.

Von Economo C. Sleep as a problem of localization. *J. Nerv. Ment. Dis.*, 1930, 7:249-259.

Wang Q.P., Ochiai H., Nakai Y. GABAergic innervation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat studied by electron microscopy double immunostaining. *Brain Res. Bull.*, 1992, 29(6): 943-8.

Wang R.Y., Aghajanian G.K. Antidromically identified serotonergic neurons in the rat midbrain raphe: evidence for collateral inhibition. *Brain Res.* 1977, 132:186-193.

Webster H.H., Jones B.E. Neurotoxic lesions of the dorsolateral pontomesencephalic tegmentum-cholinergic cell area in the cat. II. Effects upon sleep-waking states. *Brain Res.*, 1988, 458(2):285-302.

Williams J.T., Colmers W.F., Pan Z.Z. Voltage- and ligand-activated inwardly rectifying currents in dorsal raphe neurons in vitro. *J. Neurosci.* 8: 3499-3506.

Wonnacott S. Presynaptic nicotinic Ach receptors. *Trends Neurol. Sci.*, 1997, 20(2): 92-98.

Wonnacott S. The paradox of nicotinic acetylcholine receptor upregulation by nicotine. *Trends Pharmacol Sci.* 1990, 11(6): 216-9.

Wu M.F., John J., Nguyen G.G., Siegel J.M. Activity of serotonergic cells in the dorsal raphe during cataplexy. *Soc. Neurosci. Abstr.* 2000: 250.5