

00377
12



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**RECEPTORES NICOTINICOS EN EL NUCLEO DORSAL
DEL RAPE: CARACTERIZACION FARMACOLOGICA E
IMPLICACIONES CLINICAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

MARIA DEL CARMEN FRIAS DOMINGUEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. STEFAN MIHAILESCU LUCIAN

MEXICO, D. F.



NOVIEMBRE, 2003

COORDINACIÓN

A



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 2 de junio de 2003, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) Frias Domínguez María del Carmen, con número de cuenta 85347735, con la tesis titulada: "Receptores nicotínicos en el núcleo dorsal del rafe: caracterización farmacológica e implicaciones clínicas.", bajo la dirección del(a) Dr. Stefan Mihailescu Lucian.

Presidente:	Dr. David Erasmo García Díaz
Vocal:	Dr. José de Jesús García Colunga
Secretario:	Dr. Stefan Mihailescu Lucian
Suplente:	Dra. María Elvira Galarraga Palacio
Suplente:	Dra. Silvia Leticia Verdugo Díaz

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 30 de octubre de 2003.

Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

B

RECONOCIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en particular a la Facultad de Ciencias, Facultad de Medicina y al Instituto de Fisiología Celular, por los conocimientos adquiridos y el apoyo recibido.

Al CONACYT por los apoyos recibidos a través del financiamiento al proyecto No. 30 840-M y de la beca No. 167155, mismos que representaron un apoyo fundamental en la consecución de la investigación y sus resultados.

A los Doctores David Erasmo García Díaz, María Elvira Galarraga Palacio y Stefan Mihalescu Lucian, miembros del Comité Tutoral, por su permanente apoyo y orientación; sus conocimientos y experiencia significaron un aporte invaluable en el diseño y conclusión de esta Tesis.

CONTENIDO

I. Resumen	3
1. Antecedentes	5
1.1 El núcleo dorsal del rafe	5
Aferencias del NDR	5
Proyecciones neuronales del NDR	8
Características morfológicas de las neuronas del NDR	9
Características electrofisiológicas de las neuronas del NDR – registros extracelulares	9
Características electrofisiológicas de las neuronas del NDR – registros intracelulares	10
Farmacología de las neuronas del NDR	10
Receptores serotoninérgicos	11
1.2 La nicotina y los receptores nicotínicos neuronales	11
1.3 Efectos de la nicotina sobre las neuronas serotoninérgicas del NDR y sobre la liberación de serotonina	16
1.4 Funciones del NDR e influencia de la nicotina sobre éstas	18
Ciclo sueño vigilia	18
Sueño MOR	19
Espigas ponto-genículo-occipitales	20
Actividad motora fásica	21
Comportamiento alimenticio	21
Depresión	23
Funciones cognitivas	25
Ansiedad	26
2. Planteamiento del problema	27

3. Hipótesis	28
4. Objetivos	28
5. Metodología	28
5.1 Obtención de rebanadas de encéfalo	28
5.2 Solución de perfusión	29
5.3 Registros	29
5.4 Administración de fármacos	29
5.5 Medida de la liberación de serotonina y GABA	30
5.6 Análisis estadístico	31
6. Resultados	31
6.1 Efectos de la nicotina sobre la frecuencia de disparo de las neuronas del NDR y sobre la liberación de serotonina y GABA	31
6.2 Efectos de la bicuculina y del WAY 100635 sobre la frecuencia de disparo de las neuronas del NDR y sobre la liberación de serotonina y GABA	35
6.3 Efectos de la bicuculina y del WAY 100635, administrados después de la nicotina, sobre la frecuencia de disparo de las neuronas del NDR	42
6.4 Efectos de la nicotina sobre la liberación de serotonina, en presencia de tetrodotoxina	42
6.5 Efectos de la administración de la nicotina en el NDR sobre la actividad de las neuronas del NDR, PPT y LDT	42
7. Discusión	50
7.1 Efectos de la nicotina sobre la frecuencia de disparo neuronal	50
7.2 Efectos de la nicotina sobre la liberación de serotonina	51
7.3 Actividad recíproca de las neuronas serotoninérgicas del NDR y colinérgicas de los núcleos LDT y PPT inducida por la nicotina	53
8. Conclusiones	54
9. Bibliografía	54

I. RESUMEN

El núcleo dorsal del rafe (NDR) se localiza en la línea media del tallo cerebral por debajo del acueducto, entre el puente y el mesencéfalo y posee el mayor grupo de neuronas serotoninérgicas del cerebro, siendo el principal origen de la inervación serotoninérgica del encéfalo. Este núcleo controla una amplia variedad de eventos fisiológicos y patológicos, tales como: el ciclo sueño-vigilia, el sueño de movimientos oculares rápidos (MOR), la generación de las espigas ponto-genículo-occipitales (PGO), la actividad motora fásica, el comportamiento alimenticio, las funciones cognitivas, la depresión y la ansiedad. Se considera que el NDR ejerce un control inhibitorio sobre el sueño MOR y las espigas PGO, a través de sus proyecciones con las neuronas colinérgicas MOR-on y PGO-on de los núcleos laterodorsal tegmental (LDT) y pedunculopontino tegmental (PPT), que generan el sueño MOR y las espigas PGO.

La nicotina, alcaloide del tabaco, ejerce diversas acciones en el organismo, muchas de las cuales están mediadas, por la serotonina liberada desde las neuronas serotoninérgicas del NDR. En este sentido se ha encontrado que tanto la serotonina como la nicotina reducen los episodios de sueño MOR e inhiben la generación de las espigas PGO.

La presencia de receptores nicotínicos en las neuronas del NDR, tanto a nivel somatodendrítico como presináptico, permite suponer que la nicotina actúa de manera directa sobre estas neuronas, estimulando la liberación de serotonina.

Este trabajo se enfocó al estudio de los efectos de la nicotina sobre el NDR, habiéndose encontrado que la nicotina ejerce efectos estimuladores sobre la frecuencia de disparo de dos terceras partes de las neuronas serotoninérgicas del NDR y sobre la liberación de serotonina, muy probablemente debidos a la acción directa de la nicotina sobre dichas neuronas. Por otra parte la nicotina provocó efectos inhibitorios en el resto de las neuronas estudiadas, los cuales fueron mediados por la serotonina misma. Adicionalmente la nicotina provocó incremento de la liberación de serotonina en presencia de tetrodotoxina, acción que fue bloqueada tanto por la mecamilamina (bloqueador inespecífico de los receptores nicotínicos) como por la metilcaconitina (bloqueador de los receptores nicotínicos $\alpha 7$). Esto pone de manifiesto un efecto estimulador somatodendrítico y/o presináptico de la nicotina sobre la liberación de serotonina que, sin embargo, fue significativo solo a dosis altas de nicotina (215 μm). Por último, el incremento de la frecuencia de disparo de las neuronas del NDR generado por la administración de nicotina en este núcleo, se acompañó de una inhibición simultánea de la frecuencia de disparo de las neuronas colinérgicas del LDT y del PPT, la que fue bloqueada por antagonistas de los receptores 5-HT_{1A} (espiperona, propranolol y WAY 100635), hallazgo que puede explicar la supresión de las espigas PGO, que se ha observado en otros estudios tras la administración sistémica de la nicotina.

Los resultados obtenidos apoyan la idea de que diversos efectos, generados por la administración de nicotina, en los cuales se encuentra implicado el NDR, tienen su

explicación, al menos en parte, en las acciones que la nicotina ejerce directamente sobre las neuronas serotoninérgicas del NDR.

1. ANTECEDENTES

1.1 EL núcleo dorsal del rafe (NDR)

El núcleo dorsal del rafe se localiza en la línea media cerebral, en el límite entre el mesencéfalo y el puente; por debajo del acueducto cerebral y dorsal al fascículo longitudinal medial (Paxinos y Watson, 1982). Este núcleo contiene el mayor grupo de neuronas serotoninérgicas del cerebro (Dahlstrom y Fuxe, 1965) y representa la principal fuente de inervación serotoninérgica del encéfalo. Pertenece al grupo de núcleos serotoninérgicos superiores, junto con el núcleo caudal lineal, el núcleo mediano del rafe y un grupo de neuronas localizadas en el núcleo pontis oralis (Jacobs y Azmitia, 1992). Ha sido dividido en los subnúcleos dorsal, medial, ventral, ventrolateral, lateral y caudal (Charara y Parent, 1998) (Figura 1).

Este núcleo se encuentra involucrado en múltiples funciones del organismo, así como en diversas alteraciones del mismo.

Aferencias del NDR.

Grupos de neuronas aferentes, liberadoras de diversos neurotransmisores, ejercen acciones inhibitorias o excitadoras sobre las neuronas del NDR.

El grupo de aferencias más importante proviene de los otros núcleos del rafe; así, se ha reportado la presencia de fibras comisurales entre pares de neuronas bilaterales del NDR, en embriones de rata (Wallace y Lauder, 1983). En animales adultos se han descrito conexiones entre las neuronas serotoninérgicas del NDR, del núcleo del rafe magno y el núcleo paragigantocelular lateral (Kalen y col., 1985). Las neuronas serotoninérgicas del NDR son inhibidas por la serotonina, debido a la existencia de autorreceptores somáticos de tipo 5-HT_{1A} (Sprouse y Aghajanian, 1987), cuya estimulación produce hiperpolarización por aumento de la conductancia para potasio (Aghajanian y col., 1987; Innis y col., 1988; Williams y col., 1988).

Las aferencias colinérgicas del NDR provienen del núcleo vestibular superior (Kalen y col., 1985), del núcleo pedunculopontino tegmental (PPT) y del núcleo lateodorsal tegmental (LDT) (Woolf y Butcher, 1989); mientras que las aferencias dopaminérgicas provienen de la sustancia nigra y del área ventrotegmental (Aghajanian y Wang, 1978; Kalen y col., 1985).

El hipotálamo envía fibras al NDR a partir del área preóptica y de los núcleos hipotalámicos laterales (Sakai y col., 1977); las fibras hipotalámicas son tanto histaminérgicas como peptidérgicas (Panula, 1986; Krieger, 1983). El NDR recibe aferencias noradrenérgicas del locus coeruleus y subcoeruleus (Aghajanian y Wang, 1978). Tanto las aferencias noradrenérgicas como las histaminérgicas mantienen la actividad de disparo de las neuronas serotoninérgicas del NDR durante la vigilia y el sueño de ondas lentas, actuando sobre receptores de tipo α_1 y H₁, respectivamente (Vandermaelen y Aghajanian, 1983; Sakai y Crochet, 2001).

El cerebro anterior y la habénula lateral envían fibras glutamatérgicas al NDR (Aghajanian y Wang 1977); estas fibras terminan tanto en las neuronas serotoninérgicas como en las neuronas GABAérgicas (Nishikawa y Scatton, 1984).

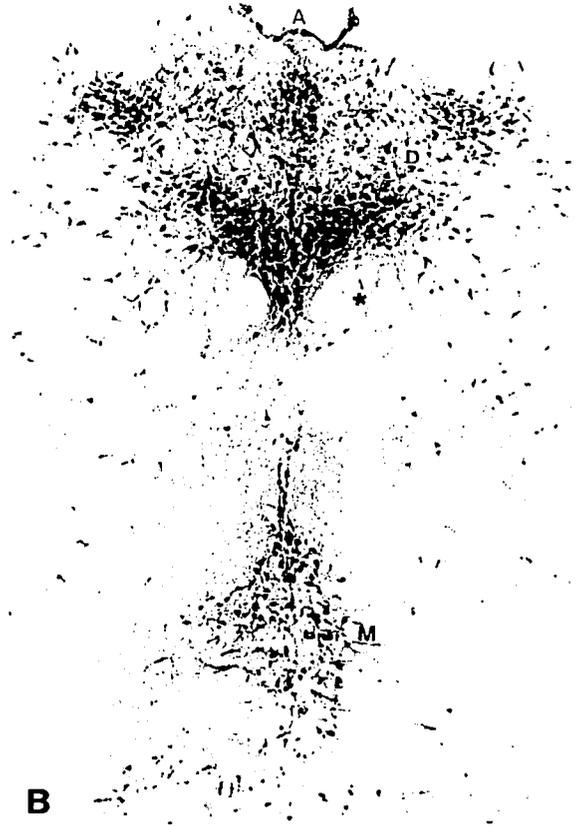
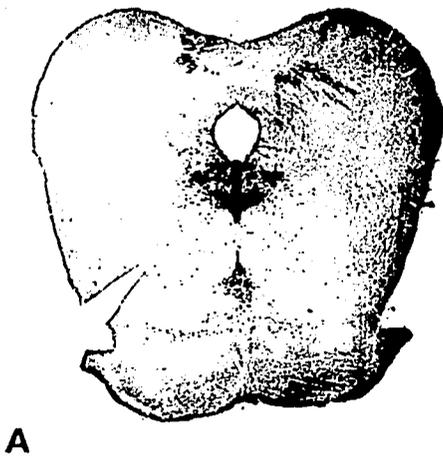


Figura 1. Cuerpos de neuronas serotoninérgicas en los núcleos del rafe del cerebro medio demostrados con inmunohistoquímica para serotonina. **A:** Imagen de bajo aumento de una sección coronal a través del cerebro medio. El grupo de neuronas serotoninérgicas mostradas, da la inervación serotoninérgica de varias regiones del encéfalo. **B:** Imagen de mayor aumento mostrando neuronas serotoninérgicas del núcleo dorsal del rafe y del núcleo mediano del rafe. El núcleo dorsal del rafe se encuentra por debajo del acueducto. En plano transversal este núcleo se puede dividir en un grupo ventromedial, que se encuentra entre los fascículos longitudinales mediales y por arriba de éstos, y un grupo dorsomedial, ubicado por debajo del acueducto y dos grandes grupos laterales; (Las letras en la figura corresponden a: A, acueducto cerebral; D, núcleo dorsal del rafe; M, núcleo magno del rafe).

Las aferencias GABAérgicas del NDR tienen su origen en el hipotálamo lateral y posterior, el área preóptica lateral, la sustancia nigra pars reticulata, el área ventral tegmental, el área ventral tegmental pontina, la sustancia gris periacueductal pontina, el núcleo pálido ventral, el núcleo preóptico medial, el núcleo parabraquial lateral y el núcleo paragigantocelular dorsal (Gervasoni, y col., 2000). El GABA liberado tanto de las interneuronas como de las fibras aferentes, ejerce un efecto inhibitorio tónico sobre la frecuencia de disparo de las neuronas del rafe (receptores de tipo GABA_A, somáticos) y sobre la liberación de serotonina (receptores de tipo GABA_B, presinápticos).

Se han descrito un gran número de aferencias peptidérgicas al NDR, habiéndose encontrado en este núcleo cuerpos neuronales y terminales nerviosas que presentan una inmunorreactividad moderada para la sustancia P y receptores para ésta (Ljungdahl y col., 1978; Mantyh y col., 1984). Los bloqueadores de los receptores para la sustancia P, de tipo NK1, aumentan la frecuencia de disparo de las neuronas serotoninérgicas del rafe y tienen acciones antidepressivas tanto en animales como en humanos (Kramer y col., 1998; Santarelli y col., 2001).

Se ha comprobado la existencia de receptores para la angiotensina II tipo AT₁ dentro del NDR (Moulik y col., 2002) y de conexiones bidireccionales entre el NDR y el órgano subfornical (Lind, 1986).

Fibras β-endorfinicas y encefalínicas pueden ser también encontradas en el NDR de ratas (Bloom y col., 1978; Khachaturian y col., 1983).

Pocas fibras con inmunorreactividad para la colecistocinina (CCK) están presentes en el interior del rafe (Van Dijk y col., 1984; Vanderhaeghen y col., 1980). La CCK produce la despolarización de las neuronas serotoninérgicas actuando sobre receptores de tipo CCK-A (Boden y col., 1991).

Dentro del NDR se encuentran fibras con inmunorreactividad para el neuropéptido Y (Chronwell y col., 1985). El neuropéptido Y inhibe tanto los potenciales inhibidores lentos, inducidos por la estimulación de los receptores 5-HT_{1A} en neuronas serotoninérgicas del rafe, como los potenciales postsinápticos excitadores lentos, inducidos por la estimulación de los receptores α₁ adrenérgicos, en las mismas neuronas (Kombian y Colmers, 1992).

Se ha comprobado la existencia de fibras neurotensinérgicas que hacen sinapsis con neuronas serotoninérgicas y GABAérgicas del NDR, cuyo origen es el núcleo parabraquial (Petrov y col., 1992). La neurotensina incrementa la frecuencia de disparo de las neuronas serotoninérgicas localizadas en la parte ventral del NDR (Jolas y Aghajanian, 1996).

Las neuronas serotoninérgicas del NDR poseen receptores para el factor liberador de corticotropina (CRF) (De Souza y col., 1985; Romagnano y Joseph, 1983; Kirby y col., 2000). La administración de dosis bajas del CRF en el NDR produce efectos inhibitorios sobre la frecuencia de disparo de las neuronas serotoninérgicas (Kirby y col., 2000).

Proyecciones neuronales del NDR

Las eferencias o proyecciones neuronales que emite el NDR son la base morfológica de las relaciones funcionales existentes entre este núcleo y otras estructuras, así como de los efectos que diversas sustancias exógenas, que interfieren con la actividad del NDR, pueden generar en el organismo.

Algunas fibras serotoninérgicas de las regiones mediales y laterales del NDR proyectan en las neuronas de la médula espinal en monos (Mantyh y Pesschansky, 1982).

Las fibras ascendentes con origen en el rafe pertenecen a dos fascículos importantes, un fascículo dorsal que contiene fibras con origen en las alas laterales y en las regiones ventromediales del NDR y un fascículo ventral que incluye fibras de las neuronas serotoninérgicas de la línea media del rafe (Schofield y Everitt, 1981). En ratas adultas la mayoría de las proyecciones ascendentes del rafe son ipsilaterales (Jacobs y col., 1978; Levitt y Moore, 1978).

Las neuronas serotoninérgicas del NDR envían proyecciones al cuerpo estriado y a la sustancia nigra (Imai y col., 1986), con efectos inhibidores sobre la liberación de dopamina en estas áreas (Gervais y Rouillard, 2000; De Deurwaerdere y col. 1998). Se han descrito proyecciones serotoninérgicas al área ventrotegmental y al núcleo acumbens (Van Bockstaele y col., 1994). La serotonina aumenta la liberación de dopamina en el núcleo acumbens actuando sobre receptores de tipo 5-HT₃ localizados en las neuronas dopaminérgicas del área ventrotegmental (De Deurwaerdere y col., 1998).

Las neuronas serotoninérgicas de la región interfascicular del NDR proyectan en el hipocampo y en el septum, ejerciendo efectos inhibidores sobre las neuronas de estas regiones (Azmitia, 1981; Penington y Reiffenstein, 1986).

La amígdala recibe proyecciones inhibitorias de las neuronas serotoninérgicas localizadas en la región ventromedial del NDR (Ma y col, 1991; Wang y Aghajanian, 1977).

Neuronas serotoninérgicas del NDR proyectan en las neuronas colinérgicas de los núcleos laterodorsal tegmental y pedunculopontino tegmental, conexiones que constituyen el substrato morfológico del control inhibitorio de las neuronas serotoninérgicas del rafe sobre el sueño MOR y las espigas ponto-geniculo-occipitales (Honda y Semba, 1994; Steininger y col., 1997; Mihailescu y col., 2001).

La corteza frontal recibe fibras serotoninérgicas de la región rostral y lateral del NDR (O'Hearn y Molliver, 1984). Las proyecciones corticales de las neuronas del rafe son finas y muy ramificadas (Kohler y col, 1980).

Neuronas de las alas laterales del NDR proyectan al núcleo caudado y al putamen, donde ejercen acciones excitadoras (Steinbusch y col., 1981; Steinbusch y col., 1980; Park y col., 1982).

Un número substancial de neuronas dopaminérgicas del NDR proyectan en el núcleo acumbens, mientras que pocas proyecciones de este tipo han sido encontradas en el septo lateral, la corteza prefrontal medial y el estriado dorsal (Stratford y Wirsthafer, 1990).

Características morfológicas de las neuronas del NDR

Las neuronas serotoninérgicas representan aproximadamente un tercio de la población neuronal total del NDR, mientras que las neuronas GABAérgicas representan del 25 al 30%. El número total de neuronas serotoninérgicas del NDR en ratas es de 11,000, mientras que las neuronas no serotoninérgicas, correspondientes a varias subpoblaciones, representan 24,000 células. Las neuronas serotoninérgicas están en oposición con oligodendrocitos (Azmitia, 1978) y sus dendritas se extienden a través de la capa ependimal en el fluido cerebroespinal (Jacobs y Azmitia, 1992). Las neuronas serotoninérgicas están frecuentemente asociadas con vasos sanguíneos grandes, con su cuerpo celular o prolongaciones en la vecindad de las células endoteliales (Azmitia, 1978; Descarries y col., 1982).

En ausencia de un marcador específico, las neuronas secretoras de serotonina son difíciles de distinguir de las no serotoninérgicas. El cuerpo celular de las neuronas serotoninérgicas del rafe es triangular o fusiforme, con su diámetro mayor de 15 a 35 μm , el cual es mayor que el de las neuronas no serotoninérgicas (10-15 μm), con 4-7 dendritas primarias (Li y col., 2001). Las neuronas serotoninérgicas de rata poseen dendritas con espinas, característica ausente en las neuronas no serotoninérgicas del mismo núcleo (Li y col., 2001).

Las neuronas serotoninérgicas pueden ser destruidas selectivamente por la 5,7-dihidroxitriptamina inyectada dentro del ventrículo lateral (Baumgarten y col., 1972; Bjorklund y col., 1975).

Características electrofisiológicas de las neuronas del NDR - registros extracelulares

En estudios *in vivo* Aghajanian y col. (1978) mostraron que de acuerdo con su patrón de descarga, hay tres tipos de neuronas en el NDR: las neuronas tipo I que descargan lentamente (0.25-2.0 Hz) y de manera regular y espontánea; las neuronas tipo II que son células con disparo muy lento o silentes y las neuronas tipo III que son células rápidas (>2.0 Hz) y con un patrón de descarga frecuentemente irregular. Estudios histoquímicos y electrofisiológicos prueban que las neuronas tipo I son serotoninérgicas (Aghajanian y col., 1974; Wang y col., 1978).

En rebanadas de cerebro las neuronas serotoninérgicas del NDR exhiben propiedades electrofisiológicas similares a las observadas *in vivo*. Así, Mosko y Jacobs (1976) mostraron que la mayoría de las neuronas en el NDR descargan con frecuencias de 0.8-2.5 Hz, muy similares a las de las células tipo I de los experimentos *in vivo*. Los mismos autores también describen una población de neuronas rápidas (3.0-11.6 Hz) correspondientes a las neuronas tipo III de los estudios *in vivo*; estas neuronas disparan de manera irregular y frecuentemente en ráfagas. Mosko y Jacobs también describieron un patrón oscilatorio (on-off) de descarga, de las neuronas del NDR, con periodos de alta frecuencia alternados con periodos de frecuencia mucho menor. La duración de estos periodos fue de un rango de 10 a 50 segundos. Un patrón similar fue descrito para neuronas del NDR *in vivo* (Mosko y Jacobs, 1974).

Características electrofisiológicas de las neuronas del NDR - registros intracelulares

En ratas, las neuronas serotoninérgicas del NDR tienen un potencial de membrana de alrededor de -60 mV y, comparados con las neuronas no serotoninérgicas, valores medios de amplitud de las espigas mayores, (126 vs. 104 mV), potenciales más anchos (3.6 vs. 0.9 ms) y una constante de tiempo de la membrana de 7.4 vs. 5.5 ms (Li y col., 2001). La respuesta de las neuronas serotoninérgicas del NDR a corrientes despolarizantes largas y débiles consiste en una actividad de disparo regular y baja (1-6 Hz), mientras que en las neuronas no serotoninérgicas la frecuencia de disparo alcanza, en condiciones similares, valores aproximados de 20 Hz (Li y col., 2001). Las neuronas serotoninérgicas presentan posthiperpolarizaciones amplias y duraderas (10 mV, 150 ms), así como despolarizaciones lentas entre los potenciales de acción, inducidos por estímulos despolarizantes (Crunelli y col., 1983; Li y col., 2001). Los estímulos hiperpolarizantes inducen una corriente catiónica despolarizante (corriente h) en neuronas no serotoninérgicas, pero no en células serotoninérgicas (Li y col., 2001).

Farmacología de las neuronas del NDR

In vivo e *in vitro* la actividad espontánea de las neuronas del NDR es altamente dependiente de la estimulación noradrenérgica tónica. En animales intactos la reserpina (Baraban et al., 1978) y los bloqueadores de receptores α adrenérgicos (Baraban y Aghajanian, 1980a y 1980b; Marwaha y Aghajanian, 1982; Menkes y col., 1981) inducen la desaparición de la actividad espontánea de disparo en muchas neuronas. En rebanadas de cerebro (Vandermaelen y Aghajanian, 1983), la estimulación con norepinefrina, generó una frecuencia máxima de disparo de 6 Hz, en neuronas presuntamente serotoninérgicas.

Las neuronas serotoninérgicas del NDR son inhibidas por el GABA, el cual se libera de terminales nerviosas que se originan tanto fuera (sustancia nigra y habénula) como dentro de este núcleo; en el último caso el GABA es producido por neuronas serotoninérgicas y no serotoninérgicas (Harandi y col., 1987). Los receptores para GABA expresados por las neuronas serotoninérgicas del NDR son de 2 tipos: "A", estimulados por muscimol y bloqueados por bicuculina y picrotoxina y "B", mismos que son estimulados por baclofen e inhibidos por flaclofen.

Las neuronas serotoninérgicas del NDR emiten colaterales axónicas que hacen sinapsis a nivel somatodendrítico con ellas mismas o con neuronas vecinas (Wang y Aghajanian, 1977). La actividad de estas neuronas es inhibida por la serotonina y el LSD, aplicados en este núcleo (Aghajanian y col., 1972; Aghajanian y col., 1982), por inhibidores de la monoaminoxidasa (MAO) administrados en la circulación sistémica (Aghajanian y col., 1970) y por inhibidores de la recaptura de serotonina (Sheard y col., 1972).

Las acciones inhibitorias de la serotonina sobre la frecuencia de disparo de las neuronas serotoninérgicas del NDR se deben principalmente a la estimulación de los autorreceptores somatodendríticos, del tipo 5-HT_{1A} (Sprouse y Aghajanian, 1987), la cual produce hiperpolarización por incremento de la conductancia de la membrana al potasio (Aghajanian y col., 1987; Innis y col., 1988; Williams y col., 1988). Tal estimulación produce además disminución de la síntesis (Hjorth y Magnusson, 1988)

y liberación de serotonina (Davidson y Stamford, 1995). Las neuronas del NDR también poseen, en el área somatodendrítica y en sus terminales axónicas, receptores 5-HT_{1B} y 5HT_{1D}, cuya estimulación disminuye la liberación de serotonina (Davidson y Stamford, 1995; Sprouse y Aghajanian, 1987).

La sensibilidad de las neuronas a la serotonina endógena se ve reducida por acciones antidepresivas, que incrementan la neurotransmisión serotoninérgica, tales como la acción de fármacos inhibidores de la recaptura de serotonina (citalopram) y antidepresivos tricíclicos o la privación del sueño de movimientos oculares rápidos (Chaput y col., 1986; Jolas y col., 1994; Maudhuit y col., 1995 y 1996). El mecanismo involucrado en esta acción es una desensibilización de los autorreceptores somatodendríticos 5-HT_{1A} en el NDR (de Montigny y col., 1981; Blier y de Montigny, 1987; Blier y col., 1984, 1986, 1987; Chaput y col., 1986; le Poul y col., 1995). Otra explicación podría ser la regulación a la baja del transportador de serotonina, observada después del tratamiento crónico con paroxetina (Piñeiro y col., 1994).

Estudios electrofisiológicos e inmunohistoquímicos recientes, han puesto de manifiesto que las neuronas no serotoninérgicas del NDR, pueden ser también hiperpolarizadas por la estimulación de los receptores 5-HT_{1A} y que un número significativo de estas neuronas expresa dichos receptores, si bien, se encontraron neuronas que no los expresan (Kirby y col., 2003). Adicionalmente, se observó que la estimulación de los receptores α_1 adrenérgicos con fenilefrina, provocó la descarga de neuronas silentes, tanto serotoninérgicas como no serotoninérgicas, con un patrón de disparo similar entre ellas y una frecuencia ligeramente por debajo del rango previamente reportado para las neuronas serotoninérgicas (Kirby y col., 2003).

Receptores serotoninérgicos

Actualmente se conocen catorce tipos de receptores serotoninérgicos, mismos que han sido clonados. Estos receptores se agrupan, de acuerdo con su origen genético, la homología de su secuencia de aminoácidos y las cascadas intracelulares que afectan, en siete familias (Hoyer y col., 1994); cinco de éstas (5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₄, 5HT₆ y 5HT₇) están acopladas a proteínas G, las cuales regulan la actividad de la adenilciclase y de la fosfolipasa C. Los miembros de la familia 5-HT₁ producen inhibición de la adenilciclase, mientras que la estimulación de los receptores 5-HT₄, 5HT₆ y 5HT₇, genera efectos opuestos. Los receptores 5-HT₂ estimulan a la fosfolipasa C. El acoplamiento intracelular de los receptores 5-HT₅ es desconocido (Saudou y Hen, 1994; Buhot y col., 1995). El receptor 5-HT₃ difiere de todos los otros subtipos de receptores serotoninérgicos ya que es un canal iónico dependiente de ligando, que conduce selectivamente cationes monovalentes (Maricq y col., 1991).

1. 2 La Nicotina y los receptores nicotínicos neuronales

La nicotina es un alcaloide presente en el tabaco; es una base volátil con un pK_a de 8.5, que se torna marrón y adquiere el olor del tabaco al exponerse al aire, es uno de los pocos alcaloides naturales líquidos. Fue aislada de las hojas del tabaco, *Nicotiana tabacum*, por Posselt y Reiman en 1828 y Orfila inició los primeros

estudios farmacológicos del alcaloide en 1843. Langley y Dickinson en 1889 pintaron el ganglio cervical superior de conejos con nicotina y demostraron que su sitio de acción era el ganglio, y no las fibras nerviosas preganglionares o postganglionares (Taylor P, 1990).

La nicotina es una sustancia de considerable importancia médica por su toxicidad, la dependencia a su uso y la amplia variedad de propiedades farmacológicas que posee.

Los receptores colinérgicos han sido divididos en muscarínicos y nicotínicos, con base en la actividad agonista de los alcaloides naturales muscarina y nicotina, respectivamente (Watson y col., 1987). Los receptores nicotínicos pertenecen a la familia de canales iónicos dependientes de ligando, junto con los receptores GABA_A, 5-HT₃ y glicinérgicos.

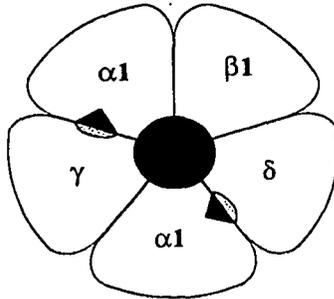
El receptor nicotínico neuronal (Figura 2) es un pentámero heterólogo, con un peso molecular de aproximadamente 300 kDa, compuesto de dos subunidades α y tres no- α (comúnmente llamadas β). Los genes para las subunidades de los receptores nicotínicos neuronales codifican para péptidos formados de una porción amino terminal hidrofílica extracelular, seguida de tres dominios transmembranales hidrofóbicos (M1-M3), un lazo intracelular grande y un cuarto dominio transmembranal (M4) (Changeux y col., 1992).

En vertebrados, se han identificado 12 genes que codifican para subunidades de los receptores nicotínicos neuronales, lo que implica la posibilidad un gran número de distintos receptores nicotínicos. Nueve de estos genes codifican para subunidades α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$), mientras que los tres restantes codifican para subunidades β ($\beta 2$ - $\beta 4$) (Sargent, 1993). Las subunidades $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta 4$ han sido clonadas en humanos (Anand y Lindstrom, 1990; Chini y col., 1992; Elliott y col., 1996).

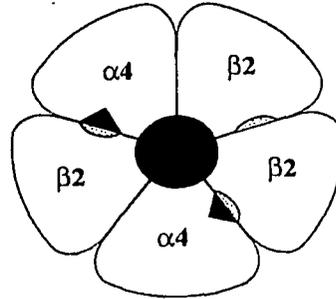
Según estudios llevados a cabo con Nicotina-[H³] aproximadamente el 90% de los receptores nicotínicos, presentes en el cerebro, contienen las subunidades $\alpha 4$ y $\beta 2$ (Whiting y Lindstrom, 1986). En los ganglios autonómicos la mayoría de los receptores nicotínicos contienen las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 4$ y $\alpha 3$, $\alpha 5$ y $\beta 4$ (Conroy y Berg, 1995). Los receptores nicotínicos que poseen la subunidad $\alpha 7$ representan la mayoría de sitios de unión de alta afinidad para la α -bungarotoxina (α -Bgtx), presentes tanto en el sistema nervioso central como en el periférico (Seguela y col., 1993).

La distribución de las diferentes subunidades de los receptores nicotínicos en el cerebro es altamente variable. La subunidad $\alpha 2$ se encuentra en el núcleo espiriformis lateral del pollo (Daubas y col., 1990; Morris y col., 1990); las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 4$ se encuentran en neuronas de los ganglios autonómicos, de la retina, de los núcleos habenuares, de la glándula pineal y del núcleo del tracto solitario (Wada y col., 1989); las subunidades $\alpha 6$ y $\beta 3$ han sido identificadas en neuronas de los ganglios somatosensoriales y de los núcleos centrales catecolaminérgicos (Deneris y col., 1989; Le Novère y col., 1995); la subunidad $\alpha 4$ se encuentra en las neuronas cocleares del oído interno, en neuronas de los ganglios vestibulares y en todo el cerebro, exceptuando el estriado, el hipocampo y el cerebelo, encontrándose especialmente densos en el tálamo (Wada y col., 1989); la

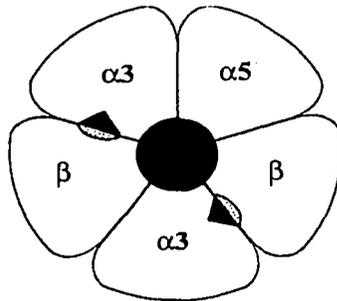
Receptor colinérgico muscular
 Dos sitios de unión para la Ach en la
 interfase específica entre las subunidades
 $\alpha 1$ y γ o δ



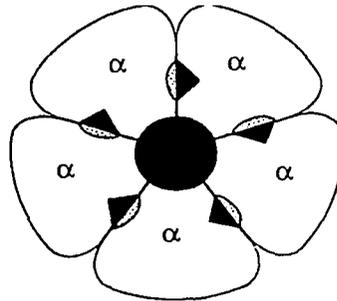
Receptor colinérgico neuronal $\alpha 4 \beta 2$
 Estequiometría conocida
 disposición presumible
 2 presuntos sitios de unión para Ach



Receptores colinérgicos tipos $\alpha 3 \beta 2 \beta 4 \alpha 5$
 Algunas evidencias de su composición
 Estequiometría presumible
 disposición presumible
 2 presuntos sitios de unión para Ach



Receptores colinérgicos $\alpha 7, \alpha 8, \alpha 9$
 Homómeros funcionales
 ¿ $\alpha 7, \alpha 8$ heterómeros conocidos
 otras subunidades?
 5 presuntos sitios de unión para Ach



**TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN**

Figura 2. Principales tipos de receptores nicotínicos y su estequiometría.

subunidad $\beta 2$ se encuentra en todo el sistema nervioso (Wada y col., 1989).

Los homooligómeros formados por las subunidades $\alpha 7$ o $\alpha 8$ tienen una alta permeabilidad para el calcio ($pCa^{2+}/pNa^{+} > 15$), mientras que las subunidades $\alpha 2$ a $\alpha 6$, en combinación con las subunidades $\beta 2 - \beta 4$ forman heterooligómeros con una permeabilidad para calcio mucho más baja ($pCa^{2+}/pNa^{+} = 0.5-2.5$) (McGehee y Role, 1995).

Los agonistas clásicos de los receptores nicotínicos son: acetilcolina, nicotina, dimetilfenilpiperazinio, citisina, (+)anatoxina-a, anabaseina; a los que, en la última década, se han añadido nuevos compuestos, como epibatidina, ABT-418, RJR-2403, SIB-1765F, GTS-21 (Gotti y col., 1997).

Son antagonistas de los receptores nicotínicos: d-tubocurarina, dihidro- β -eritroidina, metilcaconitina (MLA), mecamilamina, clorisondamina, hexametonio, decametonio, α -Bgtx. La α -Bgtx y la MLA se unen con mucho mayor afinidad a los homooligómeros $\alpha 7$ que a los heterooligómeros $\alpha 2$ - $\alpha 6/\beta 2$ - $\beta 4$ (Mc Gehee y Role, 1995).

Con base en su localización neuronal, los receptores nicotínicos cerebrales pueden ser clasificados en somatodendríticos, pre-terminales y terminales. La estimulación de los receptores somatodendríticos puede producir tanto corrientes entrantes rápidas como lentas y el efecto de su estimulación es abolido por el bloqueador de canales rápidos para Na^{+} , tetrodotoxina (TTX) (Mc Gehee y Role, 1995). Los receptores pre-terminales se localizan en el axón y el efecto de su estimulación también es bloqueado por la TTX; receptores de este tipo han sido descritos en neuronas GABAérgicas interpedunculares (Lena y col., 1993). Los receptores nicotínicos terminales (presinápticos) están localizados en las terminales axónicas presinápticas y son insensibles a la TTX. Se cree que la mayoría de los receptores nicotínicos en el cerebro están localizados presinápticamente y que su función más importante es modular la liberación de varios neurotransmisores (McGehee y Role, 1995; Wonnacott, 1997). Esta idea es fuertemente soportada por pruebas experimentales que muestran que la nicotina, actuando en receptores presinápticos, modula o induce directamente la liberación de noradrenalina, dopamina, acetilcolina, glutamato y serotonina (Vizi y Lendvai, 1999).

La estimulación de receptores nicotínicos presentes en sinaptosomas (Soliakov y Wonnacott, 1996) o expresados en las células HEK293 (Staudermaman et al., 1998) y en las IMR32 (Gotti y col., 1995) produce un incremento del influjo de sodio y calcio, el cual despolariza la membrana y activa canales para calcio dependientes de voltaje. Esto conduce a un incremento transitorio de la concentración intracelular de calcio, el cual es responsable de la mayoría de los efectos de la estimulación de estos receptores, tales como la modulación de la liberación de neurotransmisores (Sacaan y col., 1995; McGehee y col., 1995), el crecimiento de neuritas (Pugh y Berg, 1994), la regulación temprana de los niveles de transcripción genética (Greenberg y col., 1986) y la activación de segundos mensajeros (McNicol y Schulman, 1992).

La exposición crónica a la nicotina induce una disminución de la sensibilidad de los receptores nicotínicos del cerebro, misma que se caracteriza por ser rápida y de larga duración. Este proceso es distinto de la desensibilización clásica observada con

otros agonistas, principalmente en cuanto a su lenta reversibilidad. Además, la velocidad de desensibilización de dichos receptores es dependiente de los tipos de subunidades que los componen, así, los receptores que contienen las subunidades $\alpha 3\beta 2$ se desensibilizan 10 veces más rápido que los que contienen las subunidades $\alpha 3\beta 4$ o $\alpha 4\beta 4$, pero más lento que los homooligómeros $\alpha 7$ (McGehee y Role, 1995).

La exposición crónica a la nicotina incrementa la densidad de receptores nicotínicos en el cerebro de ratas (Schwartz y Kellar, 1983) y humanos (Benwell y col., 1988) así como en células transfectadas (Peng y col., 1994). La regulación a la alta de los receptores nicotínicos con subunidades $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$, inducida por la nicotina, (Marks y col., 1983; Sanderson y col., 1993) ocurre con diferente intensidad en distintas áreas del cerebro y requiere concentraciones de nicotina más bajas que las necesarias para la activación de los receptores (Collins y Marks, 1996). Estudios recientes de Molinari y col. (1998) y Whiteaker y col. (1998) realizados en células aisladas, sugieren que la regulación a la alta de los receptores con subunidades $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ no requiere de la activación de los receptores o su desensibilización, ni de la existencia de flujo iónico a través del canal. Adicionalmente, el estudio de Whiteaker y col. (1998) sugiere que la mayoría de los receptores nicotínicos (aproximadamente 85%) están localizados intracelularmente y que su regulación a la alta es disparada por la activación de un receptor localizado en la membrana celular diferente de los que abren los canales asociados a receptores nicotínicos. Los mecanismos de la regulación a la alta no están relacionados con un incremento en la velocidad de síntesis de receptores (Marks y col., 1992) más bien, están relacionados con la disminución del reciclaje de los receptores (Peng y col., 1994) o con un desplazamiento de receptores, desde sitios subcelulares a la membrana plasmática (Bencherif y col., 1995).

Las consecuencias funcionales de la regulación a la alta de los receptores nicotínicos no son claras aún. Marks y col. (1983) han encontrado que la administración prolongada de nicotina, induce aumento de los sitios de fijación de la nicotina, asociado con tolerancia para algunos efectos centrales de la misma, tales como los cambios de frecuencia cardiaca y de la temperatura corporal. En contraste con estos datos, Ksir y col. (1985) han reportado que la exposición crónica a la nicotina incrementa en una manera dosis dependiente la actividad locomotora en ratas y que este fenómeno esta asociado con aumento de la densidad de receptores para nicotina. Estos hallazgos experimentales sugieren que la regulación a la alta de los receptores nicotínicos esta asociada con sensibilización a los efectos de la nicotina. Una conclusión similar resultó de los estudios de Abdulla y col. (1995), quién mostró que el tratamiento crónico con nicotina aumenta el número de células responsivas a la nicotina en la corteza frontal. Estudios más recientes indican que la regulación a la alta de los receptores nicotínicos de tipo $\alpha 7$, en neuronas corticales embrionales de rata (Kawai y Berg, 2001) y de los receptores $\alpha 4\beta 2$ en células K-177 (Buisson y Bertrand, 2001) está asociada con un incremento de la respuesta de estos receptores a agonistas.

1. 3. Efectos de la nicotina sobre las neuronas serotoninérgicas del NDR y sobre la liberación de serotonina

La presencia de los receptores nicotínicos en neuronas del núcleo dorsal de rafe ha sido confirmada en ratas (Segal y col., 1978; Bitner y col., 2000; Bitner y Nikkel, 2002), ratones (Deutch y col., 1987; Marks y col., 1992) y humanos (Benwell y col., 1988).

Estudios inmunohistoquímicos llevados a cabo recientemente por Bitner y col. (2000) y por Bitner y Nikkel (2002) indican que tanto las subunidades $\alpha 4$ como las $\alpha 7$, de los receptores nicotínicos, están presentes en neuronas serotoninérgicas del NDR.

En el estudio de Li y col. (1998), los agonistas de receptores nicotínicos 1,1-dimetil-4-fenilpiperazinio (DMMP, 15 μM), nicotina (20 μM) y acetilcolina (30 μM en presencia de atropina 5 μM) produjeron la despolarización del 60% de las neuronas del rafe dorsal y la hiperpolarización del 40% restante. Los efectos despolarizantes fueron bloqueados por el antagonista de los receptores $\alpha 1$ adrenérgicos, prazosin (1 μM), por la tetrodotoxina (TTX), por la solución de perfusión baja en calcio y alta en magnesio, por la mecamilamina (50 μM) y por el antagonista de los receptores nicotínicos de tipo $\alpha 7$, metilcaconitina (MLA; 100 nM). Los antagonistas de los receptores NMDA y AMPA, 2-amino-5-fosfonovalerato (APV; 100 μM) y 6,7-dinitroquinoxalina (DNQX; 10 μM) no afectaron la respuesta despolarizante, lo que excluye la participación del glutamato en este tipo de respuesta. Por otro lado, la respuesta hiperpolarizante fue reproducida por la serotonina y bloqueada por el antagonista de los receptores 5-HT_{1A}, pindobind (1 μM) y por la mecamilamina (50 μM), pero no fue afectada por ninguno de los otros factores que bloquearon la respuesta despolarizante, incluyendo a la MLA. La conclusión de este estudio fue que los efectos despolarizantes de los agonistas de los receptores nicotínicos sobre las neuronas del NDR dependen de la liberación de noradrenalina inducida por la estimulación de receptores nicotínicos presinápticos de tipo $\alpha 7$, mientras que los efectos hiperpolarizantes se deben a la acción de la serotonina. De manera interesante, la liberación de serotonina inducida por el DMPP no fue sensible a la administración de TTX, a la disminución del calcio en la solución de perfusión y al bloqueo de los receptores $\alpha 7$ nicotínicos. Esta liberación estuvo, sin embargo, mediada por receptores nicotínicos debido a que fue bloqueada por la mecamilamina. El sitio de liberación de la serotonina pudo ser la región somatodendrítica o las terminales serotoninérgicas en el núcleo. Usando experimentos de microdiálisis, Adell y col. (1993) han demostrado la existencia de una liberación basal somatodendrítica de serotonina, que es independiente de calcio y de TTX. Es posible que el DMPP haya estimulado este tipo de liberación actuando sobre receptores nicotínicos con subunidades $\alpha 7$. Esto supone, sin embargo, la existencia de una corriente de calcio inducida por el DMPP en presencia de TTX, fenómeno que no fue observado en los experimentos de Li y col., posiblemente debido a su baja magnitud.

La estimulación de los receptores nicotínicos con DMPP indujo liberación de serotonina en rebanadas de estriado de rata (Westfall y col., 1983). Este efecto fue bloqueado por opiodes, TTX y por la remoción del calcio en la solución de perfusión. En sinaptosomas del estriado de rata, concentraciones bajas de nicotina (dosis efectiva media = 0.5 μ M) indujeron la liberación de serotonina y este efecto fue bloqueado por la mecamilamina, la dihidro- β -eritroidina y la MLA, pero no por la TTX (Reuben y Clarke, 2000). La liberación de serotonina inducida por la nicotina en rebanadas del estriado, aumentó por la administración crónica del fármaco (Yu y Wecker, 1994).

El DMMP y la lobelina pero no la nicotina, la citisina o la epibatidina indujeron la liberación de serotonina en rebanadas del hipocampo (Lendvai, y col., 1996). Esta liberación, que fue independiente del calcio y de la TTX y parcialmente bloqueada por la mecamilamina, puede ser producida por el funcionamiento inverso del transportador de serotonina, inducido por los agonistas de receptores nicotínicos (Vizi y Lendvai, 1999). En contraste, Kenny y col. (2000) encontraron que la nicotina (50-500 μ M) induce la liberación de serotonina en rebanadas del hipocampo, de una manera dependiente de la concentración. Este efecto fue reducido por la liberación simultánea de acetilcolina, la cual inhibe la liberación de serotonina en el hipocampo, actuando sobre receptores muscarínicos de tipo M_1 . La mecamilamina, en concentraciones mayores de 0.5 μ M, produjo la liberación de serotonina, al provocar el bloqueo de la liberación de acetilcolina al interior del NDR.

En el estudio de Engberg y col. (2000), la nicotina (50-400 μ g/Kg, iv) indujo una inhibición transitoria (1-3 min) y de corta latencia (30 s), del 84.4% de las neuronas serotoninérgicas en ratas anestesiadas. Este efecto fue antagonizado por la mecamilamina (4mg/Kg, iv) y por el antagonista específico de los receptores 5-HT_{1A}, WAY 100635 (0.1 mg/Kg, iv). En el mismo estudio, la aplicación iontoforética de nicotina dentro de NDR, no produjo inhibición de las neuronas serotoninérgicas.

En el estudio de Guzmán-Marin y col. (2001) llevado a cabo en ratas en libre movimiento, la nicotina (0.1 mg/Kg, sc.) no cambió de manera significativa la frecuencia de disparo de las neuronas del rafe durante la vigilia o el sueño de ondas lentas, pero la incrementó de manera significativa durante el sueño MOR y la transición del sueño de ondas lentas al sueño MOR. Es posible que los efectos estimuladores de la nicotina sobre las neuronas del rafe se vuelvan evidentes durante el sueño MOR, cuando el efecto estimulador de las aferencias noradrenérgicas e histaminérgicas está reducido (Sakai y Crochet, 2001).

Usando microdiálisis en ratas en libre movimiento, Summers y Giacobini (1995) demostraron que la nicotina (0.2 mg/Kg, sc.) incrementa en un 36%, los niveles de serotonina en la corteza fronto parietal de rata, efecto que se observó 2.5 horas después de la inyección. Este efecto fue atribuido a la estimulación de las neuronas serotoninérgicas del NDR, debido a que no se han observado sitios de fijación de la nicotina en axones serotoninérgicos de la corteza (Schwartz y col., 1984) y no se han observado cambios en los niveles de la serotonina después de la aplicación directa de la nicotina en la corteza. En contraste con estos datos, Toth y col. (1992) han observado un aumento de la liberación de serotonina en la corteza frontal tras la administración de concentraciones altas de nicotina (100 mM) por

microdiálisis. Ribeiro y col. (1993) han reportado un incremento en la liberación de serotonina en la corteza frontal tras la administración sistémica de nicotina (2-8 mg/Kg), tanto en ratas anestesiadas como en ratas en vigilia.

La administración aguda y subaguda de nicotina incrementó los niveles de serotonina y de su metabolito, el ácido 5-hidroxiindol acético (5-HIAA), en el hipotálamo (Dominiak y col., 1984). La administración crónica de nicotina en ratas en libre movimiento incrementó los niveles de serotonina en el hipotálamo, en el hipocampo y en el cerebelo, efecto reproducido por la exposición al estrés (inmersión en agua) (Takada y col., 1995). En este estudio, la nicotina redujo el aumento de la liberación de serotonina inducido por el estrés en el hipocampo pero lo incrementó en la corteza.

Las diferentes evidencias experimentales ponen de manifiesto efectos tanto excitadores como inhibidores de la nicotina sobre la frecuencia de disparo de las neuronas serotoninérgicas del NDR y sobre la liberación de serotonina. Considerando la presencia de receptores nicotínicos en las neuronas serotoninérgicas del NDR, estos efectos pueden ser directos. La insensibilidad de algunas respuestas a la TTX, permite pensar en la participación de receptores nicotínicos presinápticos en el incremento de la liberación de serotonina.

1. 4. Funciones del NDR e influencia de la nicotina sobre éstas

Diversos estudios sustentan la idea de que la nicotina altera directa o indirectamente la actividad de las neuronas serotoninérgicas del NDR, que controlan múltiples actividades nerviosas.

Ciclo sueño vigilia

En animales en libre movimiento la actividad de la mayoría de las neuronas serotoninérgicas del NDR se encuentra correlacionada con el ciclo sueño vigilia; durante la vigilia tranquila estas neuronas tienen un patrón de disparo regular y lento (1-3 Hz), similar al descrito en ratas anestesiadas o en rebanadas de cerebro. Durante el sueño de ondas lentas disparan a una frecuencia baja y de manera irregular, mientras que durante el sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) los episodios de actividad espontánea prácticamente desaparecen (MaGinty y Harper, 1976). La frecuencia de disparo de estas neuronas aumenta durante la vigilia activa (20%), durante el despertar (40%) o tras la aplicación de estímulos que producen el despertar (100%) (Trulson y Jacobs, 1979); estos incrementos en la actividad se deben, por lo menos en parte, a un aumento del tono glutamatérgico (Levine y Jacobs, 1992).

El incremento del tono GABAérgico es parcialmente responsable de la disminución de la actividad espontánea de las neuronas serotoninérgicas del NDR durante el sueño de ondas lentas y durante el sueño MOR (Gervasoni y col., 2000; Jacobs y Fornal, 1999). Al respecto se sabe que el NDR contiene un gran número de interneuronas GABAérgicas (Johnson, 1994) y que recibe proyecciones de este tipo provenientes de varias regiones del cerebro (Gervasoni y col., 2000). Las neuronas serotoninérgicas del NDR poseen receptores de tipo GABA_A (Gao y col., 1993) y son inhibidas por el GABA, efecto antagonizado por los bloqueadores de los receptores

GABA_A, bicuculina y picrotoxina (Gallager y Aghajanian, 1976; Gallager, 1978). Experimentos de microdiálisis llevados a cabo en gatos en libre movimiento por Nitz y Siegel (1997) indican un incremento en la liberación de GABA al interior del NDR durante el sueño MOR. En el estudio de Gervasoni y col. (2000), llevado a cabo en ratas no anestesiadas, la bicuculina incrementó la frecuencia de disparo de las neuronas serotoninérgicas del rafe durante la vigilia, el sueño de ondas lentas y el sueño MOR. Según Gervasoni y col. (1998, 2000) las neuronas GABAérgicas que inhiben directamente a las neuronas serotoninérgicas del NDR durante el sueño de ondas lentas, están localizadas especialmente en el área preóptica lateral, mientras que las neuronas GABAérgicas que inhiben la actividad de las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus y las neuronas histaminérgicas hipotalámicas las cuales mantienen la actividad de disparo de las neuronas del NDR, están localizadas especialmente en el área preóptica ventrolateral. Además, la inhibición de las neuronas serotoninérgicas del NDR durante el sueño MOR parece dependiente de las neuronas GABAérgicas de la sustancia gris periacueductal ventral pontina. En contraste con estos datos, los estudios de Sakai y Crochet (2001) llevados a cabo en gatos en libre movimiento indican que el decremento de la actividad de las neuronas del rafe durante el sueño MOR se debe a la disminución del tono de la inervación excitadora noradrenérgica, con origen en el locus coeruleus, e histaminérgica, con origen en el hipotálamo posterior. Además, en los experimentos de Levine y Jacobs (1992) y Sakai y Crochet (2001) la disminución de la frecuencia de disparo de las neuronas serotoninérgicas del rafe durante el sueño MOR no pudo ser revertido por la bicuculina, lo que indica que dicha inhibición no fue debida a la participación del GABA.

La actividad reducida de las neuronas del NDR durante el sueño MOR está correlacionada con la atonía muscular que ocurre simultáneamente. La destrucción de una pequeña región de la formación reticular pontina dorso medial produce sueño MOR sin atonía (Henley y Morisson, 1974), situación en la cual la frecuencia de disparo de las neuronas del rafe es mayor que en animales normales (Trulson y col., 1981). La administración del agente colinomimético, carbacol, en la formación reticular pontina dorso medial produce un estado de atonía muscular en gatos en vigilia y suprime la actividad espontánea de las neuronas serotoninérgicas del NDR (Steinfels y col., 1983). Empero, es posible que tanto la atonía muscular como la depresión de la actividad de las neuronas serotoninérgicas durante el sueño MOR sean controlados por un grupo neuronal común, todavía no identificado.

Sueño MOR

El sueño MOR es generado por las neuronas colinérgicas de la formación reticular mediopontina (McCarley y col, 1995), las cuales reciben fibras excitadoras colinérgicas, denominadas MOR-on, de los núcleos LDT y PPT (Lydic y Baghdoyan, 1993; Leonard y Lydic, 1995; Mitani y col, 1988). A su vez, dichas neuronas MOR-on, reciben aferencias serotoninérgicas del NDR con acciones inhibitorias. La participación inhibitoria del NDR sobre la generación del sueño MOR es soportada por el hecho de que la inhibición de la actividad de las neuronas serotoninérgicas de este núcleo, como la generada por la microinyección dentro del mismo del agonista

de receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT, produjo un aumento de tres veces del sueño MOR (Portas y col., 1996). Además, la microinyección de 8-OH-DPAT en el núcleo PPT inhibió el sueño MOR (Sanford y col., 1994), acción similar a la observada con la administración, dentro del NDR, de los antagonistas de receptores 5HT_{1A}, pindolol y WAY 100635 (Monti y Monti, 2000). Estos resultados sugieren que la disminución de la actividad de las neuronas serotoninérgicas del rafe produce la desinhibición de las neuronas colinérgicas mesopontinas que inician el sueño MOR.

Por otra parte se ha observado que la microinyección de nicotina en la formación reticular del tallo cerebral produjo un aumento del sueño MOR en gatos (Velazquez-Moctezuma y col., 1990); mientras que en el estudio de Vazquez y col. (1996) la nicotina, aplicada en parches en animales en libre movimiento, redujo ligeramente la duración total del sueño. Salin-Pascual y col. (1999) reportaron que la administración aguda de nicotina (0.1-1 mg/Kg, sc) en ratas, disminuyó el sueño MOR en una manera dosis dependiente, disminuyó el porcentaje de sueño de ondas lentas y aumentó la vigilia; en este estudio la mecamilamina no tuvo influencia por sí misma sobre el sueño, pero bloqueó los efectos de la dosis más alta de nicotina (1 mg/Kg). La administración crónica de nicotina en dosis bajas (0.1 mg/Kg) incrementó el sueño MOR tras la tercera administración, mientras que una dosis más alta (0.5 mg/Kg) produjo una disminución del sueño MOR y del sueño total (Salin-Pascual y col., 1999). De acuerdo con los autores el aumento de la vigilia producido por la nicotina puede ser explicado por un incremento en la liberación de dopamina, noradrenalina y acetilcolina; mientras que la disminución del sueño MOR puede ser una consecuencia de la estimulación de las neuronas serotoninérgicas del NDR.

Epigas ponto-genículo-occipitales

Las espigas ponto-genículo-occipitales (PGO) son ondas amplias (300 μ V) y de breve duración (60-100ms) que se pueden registrar simultáneamente en el tegmento pontino, en los cuerpos geniculados laterales del tálamo y en la corteza occipital; aparecen como eventos únicos durante el sueño de ondas lentas y en ráfagas antes de la instalación y durante el sueño MOR (Callaway y col., 1987). La generación de las espigas PGO ha sido atribuida a las neuronas colinérgicas de los núcleos laterodorsal (LDT) y pedúnculopontino tegmentales (PPT), llamadas PGO-on, que proyectan a los cuerpos geniculados laterales y empiezan a disparar 15-20 ms antes de la aparición de una espiga PGO (McCarley y col., 1978; Nelson y col., 1983; Sakai y Jouvet, 1980). Estudios más recientes sugieren que el generador de las espigas PGO está ubicado en el núcleo subcoeruleus en ratas (Datta y col., 1998) y en el área peribraquial caudo-lateral, en gatos (Datta y Hobson, 1995).

Se cree que las neuronas serotoninérgicas del NDR ejercen un control inhibitorio sobre la generación de las espigas PGO. Uno de los primeros hallazgos, a favor de esta opinión fue que la estimulación eléctrica del NDR suprimía las espigas PGO del sueño MOR (Jacobs y col., 1973). Más tarde se mostró que estas espigas aparecen cuando las neuronas del NDR dejan de disparar, al inicio de los episodios de sueño MOR (Lydic y col., 1983; McGinty y Harper, 1976; Trulson y Jacobs, 1979) y que la serotonina hiperpolariza a las neuronas colinérgicas del LDT y PPT (Leonard y Llinas, 1994; Luebke y col., 1992). Adicionalmente, estudios morfológicos han

indicado que las neuronas serotoninérgicas del NDR proyectan a las neuronas colinérgicas del LDT y PPT (Honda y Semba, 1994; Steininger y col., 1997).

Por otra parte, se ha reportado que la administración transdérmica de nicotina, en gatos en libre movimiento, suprime las espigas PGO del sueño MOR, mismas que reaparecen al interrumpirse la administración de nicotina (Vazquez y col., 1996) (Figura 3). Estos autores sugieren que la supresión de estas espigas puede deberse a la acción estimuladora de la nicotina sobre las neuronas serotoninérgicas del NDR, las que a su vez inhiben la actividad de las neuronas PGO-on de los núcleos LDT y PPT.

Actividad motora fásica

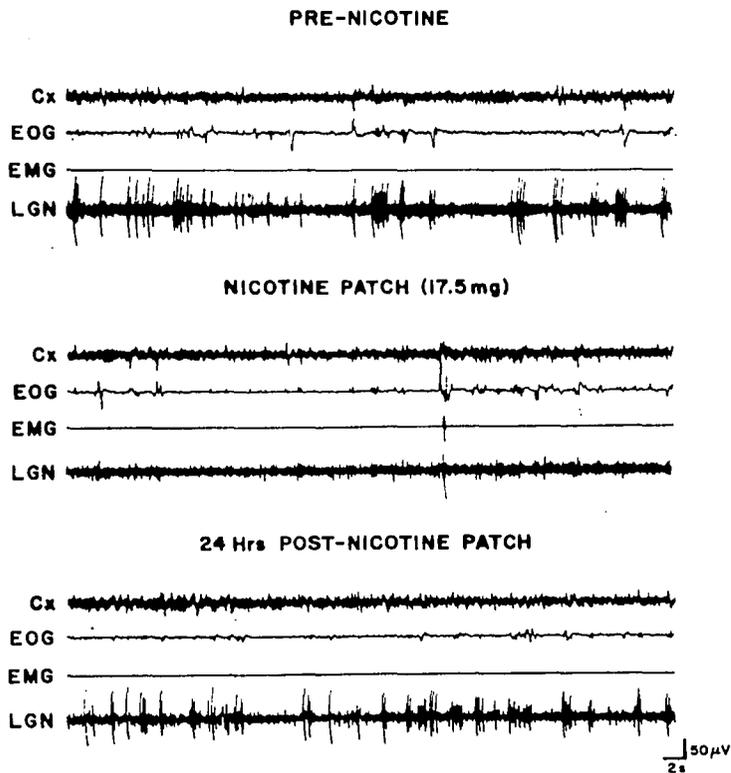
Experimentos llevados a cabo en gatos en libre movimiento, indicaron que, aproximadamente 25% de las neuronas del NDR, presentan un incremento de dos a cinco veces en su actividad, cuando estos animales realizan actividades orales, como morder, masticar o lamer (Fornal y col., 1996). La mayoría de estas neuronas del rafe también son activadas por estímulos somatosensoriales aplicados en la región de la cabeza y del cuello, mientras que los mismos estímulos, aplicados en otras partes del cuerpo, no generan ninguna respuesta. De manera contraria, cuando estímulos inducen reflejos de orientación, la actividad de un subgrupo de neuronas serotoninérgicas del rafe, es suprimida por varios segundos (Jacobs y Fornal, 1999).

Estos estudios sugieren que las neuronas serotoninérgicas del NDR facilitan la actividad motora y suprimen la actividad en la mayoría de los canales de procesamiento de la información que pueden interferir con la actividad motora; lo que a su vez permite especular que el ejercicio representa una herramienta alternativa, no farmacológica, para el tratamiento de la depresión, debido a la activación del sistema serotoninérgico.

Por otra parte, diversas evidencias experimentales sugieren que el incremento de la actividad locomotora observado tras la administración de nicotina puede deberse en parte a la alteración de la liberación de serotonina. En este sentido se ha encontrado que la depleción de serotonina con paraclorfenilalanina revierte el incremento de la actividad locomotora inducida por la nicotina (Fitzgerald, 1985; Olausson y col., 1999). Este efecto fue también producido por el citalopram (un inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina) y por el agonista de receptores 5-HT_{2A}, DOI (Olausson, 1999). En los experimentos de Grottick y col. (2001) el agonista de los receptores 5-HT_{2C}, Ro60-0175, disminuyó la actividad locomotora previamente estimulada por la administración crónica de nicotina en ratas. Adicionalmente, se ha encontrado que la nicotina aumenta la actividad locomotora a través del incremento de la liberación de dopamina en el núcleo acumbens, efecto que es susceptible a sensibilización (Benwell y Balfour, 1992; Clarke y col., 1988).

Comportamiento alimenticio

Estudios experimentales indican que la serotonina tiene efectos supresivos sobre la ingestión de alimento y sobre el peso corporal (Leibowitz y col., 1988; Simansky, 1996). Varios núcleos del hipotálamo medial están involucrados en la acción de la serotonina sobre el comportamiento alimenticio. Los más importantes son el núcleo paraventricular, el ventromedial, el supraquiasmático y los núcleos



TESIS CON
. . . A DE ORIGEN

Figura 3. Influencia de la nicotina sobre las espigas ponto-geniculo-occipitales (PGO) del sueño MOR en gatos en libre movimiento. En ausencia de la nicotina y durante el sueño MOR (panel superior, "PRE-NICOTINE"), el electrocorticograma (Cx) presenta ondas de baja amplitud y alta frecuencia (desincronización), el electrooculograma (EOG) registra movimientos oculares rápidos, el electromiograma (EMG) presenta bajo voltaje (atonía muscular) y en el registro de la actividad del núcleo geniculado lateral (LGN) se presentan espigas PGO. Tras la aplicación de la nicotina en parches de 17.5 mg (panel medio NICOTINE PATCHES 17.5 mg) se observa la desaparición de las espigas PGO. 24 horas después de remover el parche con nicotina, las espigas PGO reaparecen (panel inferior) (Tomado de Vazquez y col., 1996).

dorso mediales (Leibowitz y col., 1988). El efecto supresivo de la serotonina sobre la ingestión de alimento ha sido observado después de la administración de serotonina o de fármacos que aumentan la disponibilidad sináptica de la misma (d-norfenfluramina y fluoxetina) (Leibowitz y col., 1988; Weiss y col., 1991). Además de disminuir el consumo de alimentos, la estimulación del núcleo paraventricular induce un aumento del metabolismo energético, específicamente la oxidación de lípidos e induce el metabolismo de los hidratos de carbono (Boschman y col., 1996). Efectos similares se han observado tras la administración de fluoxetina en humanos (Boschmann y Hoffer, 1995). Los efectos anorexigénicos de la serotonina son bloqueados por la administración de antagonistas serotoninérgicos en el hipotálamo (Leibowitz y col., 1988). En la rata los receptores de tipo 5-HT_{1B} y 5-HT_{1C} están involucrados específicamente en la hipofagia inducida por la serotonina, en contraste con los receptores de tipo 5-HT_{1A} que pueden mediar el efecto opuesto, esto es, la hiperfagia (Curzon, 1990). De acuerdo con estos datos farmacológicos, se han identificado muchos receptores de tipo 5-HT_{1B} y 5-HT_{1C} en el hipotálamo y una baja concentración de receptores de tipo 5-HT_{1A} (Leibowitz y Alexander, 1998). Un estudio reciente mostró que los ratones mutantes que no tienen receptores funcionales de tipo 5-HT_{2C} presentan hiperfagia y se vuelven obesos a edad adulta. Estos ratones son menos sensibles a los efectos anorexigénicos de la fenfluramina que los ratones normales (Vickers y col., 1999). El comportamiento anorexigénico de otro ratón mutante, "anx", se atribuyó a una inervación serotoninérgica hiperactiva en el núcleo hipotalámico medial (Son y col., 1994). Las dietas con un contenido alto en hidratos de carbono producen el aumento de los niveles circulantes del triptofano (Wurtman y Wurtman, 1995) y altos niveles de serotonina en el hipotálamo (Thibault, 1994) y en los núcleos del rafe (Leibowitz y Alexander, 1998). El aumento del contenido de serotonina en el hipotálamo, consecutivo a un aporte alimenticio alto en hidratos de carbono, genera la sensación de saciedad y constituye un mecanismo de retroalimentación negativa para el aporte alimenticio.

La nicotina tiene efectos anorexigénicos bien documentados (Munster y Battig, 1975). El hábito de fumar reduce el apetito y el peso corporal, mientras que la interrupción de este hábito, genera hiperfagia y aumento del peso corporal. En el estudio de Miyata y col. (1999) la administración sistémica de nicotina durante 7 días indujo un incremento de los niveles de serotonina y dopamina en el hipotálamo lateral asociados con hipofagia y reducción del peso corporal. El peso corporal y los niveles de dopamina y serotonina regresaron a sus valores normales después de la supresión de la administración de la nicotina. En un estudio posterior (Yang y col., 1999) la administración de nicotina por microdiálisis en el hipotálamo lateral produjo incremento de los niveles de serotonina y dopamina en la misma área. Esto apoya la idea de la mediación serotoninérgica de los efectos anorexigénicos de la nicotina.

Depresión

De acuerdo con la teoría monoaminérgica, la depresión se debe a un déficit de liberación de dopamina y/o serotonina que produce trastornos característicos afectivos, cognitivos y de comportamiento; la lesión de las neuronas dopaminérgicas produce anhedonia (incapacidad de sentir placer) o la falta de interés por buscar

eventos placenteros o capaces de producir placer. Los desordenes del sistema serotoninérgico contribuyen a la producción de la mayor parte de los síntomas de la depresión, como alteraciones del apetito y del estado de ánimo, suicidio, disfunciones cognitivas. Las anomalías del sistema serotoninérgico asociadas con la depresión son, la disminución de la disponibilidad del triptofano, la mal función de los receptores serotoninérgicos postsinápticos, la alteración de la síntesis, liberación o recaptura de la serotonina (Maes y Meltzer, 1995). Un aumento de la actividad de los receptores 5-HT_{2A}, una disminución de la actividad de los receptores 5-HT_{1A} o alteraciones de las relaciones entre el sistema serotoninérgico y el eje hipotálamo-hipofisario-corticosuprarrenal, son considerados factores precipitantes de la depresión (Lucki, 1998).

Los inhibidores de la recaptura de serotonina son los fármacos usados de manera más común para el tratamiento de la depresión, mientras que la depleción de la serotonina inducida con el inhibidor de la triptofano hidroxilasa, paraclorofenilalanina, conduce a la recaída clínica de pacientes deprimidos, tratados exitosamente con fluoxetina (Heninger y col., 1996).

Usando el modelo experimental de nado forzado, combinado con microdiálisis (Lucki, 1997), se ha demostrado que el comportamiento de nado activo considerado normal, se asocia con un decremento transitorio de la liberación de serotonina a nivel del septo lateral. Los animales deprimidos que reaccionan con inmovilidad en tal prueba no presentan el decremento transitorio de la serotonina en el septo lateral. La administración de fluoxetina en los animales deprimidos ha restaurado tanto las anomalías bioquímicas como las comportamentales (Kirby y col., 1995). Un factor posiblemente involucrado en la modulación de la liberación de serotonina en el septo lateral es el factor liberador de corticotropina (CRF). Dosis bajas del CRF administrado dentro del NDR inhiben las neuronas serotoninérgicas y disminuyen la liberación de serotonina en el septo lateral (Price y col., 1998; Kirby y col., 2000).

Recientemente se ha mostrado que la sustancia P modula la actividad del sistema serotoninérgico del cerebro y que puede estar involucrada en la patogenia de la depresión. Las neuronas serotoninérgicas del rafe expresan receptores de tipo NK1 para la sustancia P, los bloqueadores de estos receptores (MK-869; L-760,735; L-733,060) producen efectos antidepressivos y ansiolíticos en humanos deprimidos y en modelos animales de depresión (Kramer y col., 1998; Cheeta y col., 2001). Las ratas que no expresan receptores de tipo NK-1 tienen mayores frecuencias de disparo de las neuronas serotoninérgicas, disminución de los comportamientos relacionados con la ansiedad y presentan desensibilización de receptores 5-HT_{1A}.

Existe un número importante de evidencias que sugieren que el acto de fumar representa una forma de automedicación en pacientes deprimidos, así el hábito de fumar es más frecuente en las personas deprimidas (46%) que en la población general (26%); los adolescentes con trastornos depresivos son 4 veces más predispuestos a fumar que los adolescentes normales, así mismo las personas con depresión mayor tiene mayores problemas para dejar de fumar debido a síntomas severos de abstinencia o a la aparición de episodios depresivos.

Los mecanismos a través de los cuales la nicotina mejora el estado de ánimo son múltiples, se ha comprobado que estimula los receptores $\alpha 4\beta 2$ de las neuronas dopaminérgicas del área ventrotegmental para inducir la liberación de dopamina en el núcleo accumbens, estas acciones explican los efectos estimuladores de la nicotina sobre la actividad locomotora y la autoadministración de fármacos.

El hábito crónico de fumar inhibe la actividad de las monoaminooxidasas A y B, acciones que pueden explicar, por lo menos en parte, las acciones antidepresivas de la nicotina. La nicotina puede inducir la liberación de dopamina en el núcleo accumbens aumentando la liberación de serotonina en el área ventro tegmental. Se ha demostrado que la serotonina estimula las neuronas dopaminérgicas de esta zona actuando sobre los receptores 5-HT₃. En los experimentos de Carboni y col. (1989), los efectos estimuladores de la nicotina sobre la liberación de dopamina fueron parcialmente bloqueados por la administración sistémica del bloqueador de receptores 5-HT₃, ondansetrón.

En un estudio reciente, Salin-Pascual y Drucker-Colín (1998) han demostrado que los parches de nicotina aplicados a pacientes con depresión mayor, inducen un mejoramiento significativo del estado de ánimo.

Funciones cognitivas

La estimulación de receptores 5-HT_{1A} que inhiben la adenilciclasa y tienen una ubicación somatodendrítica, produce efectos detrimentales sobre la memoria de trabajo. La administración sistémica e hipocampal de 8-OH-DPAT, un agonista específico de los receptores 5-HT_{1A}, impide la adquisición de la memoria espacial pero no de la memoria visual en ratas (Carli y col., 1995). La estimulación de receptores 5-HT_{1A}, tiene efectos duales sobre la actividad de las células piramidales CA1, las inhibe por acción directa y las estimula indirectamente a través de la inhibición de interneuronas hipocampales.

Usando el modelo experimental "arm maze" fue posible demostrar que la estimulación de receptores 5-HT_{1B} con el compuesto CP 93129, altera la memoria de referencia pero no afecta la memoria de trabajo (Buhot y col., 1995).

La estimulación de los receptores 5-HT₄, con el agonista selectivo RS6733, antagoniza el déficit de memoria inducido por la atropina en ratas, en el modelo experimental, "laberinto acuático de Morris" (Eglen y col., 1995). Los receptores 5-HT₄ están presentes en el sistema límbico y particularmente en la formación septo-hipocampal y su estimulación produce el incremento de la actividad de la adenilciclasa; el número de estos receptores se encuentra disminuido en la enfermedad de Alzheimer (Wong y col., 1996). Los agonistas de receptores 5-HT₄ aumentan la liberación de acetilcolina en la corteza frontal pero no en el estriado (Eglen y col., 1995) y estimulan la liberación de serotonina en el hipocampo (Ge y Barnes, 1996).

Los receptores 5-HT₃ se encuentran en alta densidad en la corteza cerebral y en el hipocampo, localizados en la región somatodendrítica; los antagonistas de estos receptores, como el ondansetrón, mejoran el aprendizaje y la memoria y antagonizan la pérdida de memoria inducida por fármacos anticolinérgicos o por la edad (Barnes y col., 1990). Los mecanismos que fundamentan estas acciones están representados por

un incremento del ritmo theta hipocampal y por la potenciación a largo plazo en neuronas CA1 (Staubli y Xu, 1995). Por otro lado, en la corteza entorrinal, la estimulación de los receptores 5-HT₃ indujo una disminución en la liberación de acetilcolina debido a la estimulación de interneuronas GABAérgicas, un efecto que puede también explicar los efectos positivos de los antagonistas de receptores 5-HT₃ sobre la memoria (Ramirez y col., 1996).

Se ha demostrado que la estimulación de los receptores 5-HT_{2A/2C} estimula el aprendizaje asociativo mediante la activación de la fosfolipasa C en las neuronas corticales y que los agonistas de receptores 5-HT_{2A/2C} aumentan la liberación de acetilcolina en la corteza frontal (Hirano y col., 1995).

Los axones de las células ganglionares de la retina poseen receptores de tipo 5-HT_{1B} en sus terminales ubicadas en los colículos superiores. La administración de un agonista de receptores 5-HT_{1A/1C} en los colículos superiores disminuye la distracción visual (Boulenguez y col., 1995); lo cual comprueba que la serotonina es capaz de aumentar el umbral para la distracción visual actuando directamente sobre la vía de transmisión de las señales visuales. En otro estudio, Jäkälä y col. (1992), mostraron que el tratamiento con paraclorofenilalanina (PCPA) reduce la atención solamente en condiciones de alta demanda.

Así mismo, varios estudios demuestran que la nicotina mejora la atención (Warburton y col., 1986; Heishman, 1998). La mecamilamina (10 mg/Kg, ip.) altera el proceso de adquisición de la información dependiente de la atención, efecto agravado por la depleción de serotonina con PCPA (Riekkinen y col., 1992; Riekkinen, 1994a). Lesiones del núcleo septal medial produjeron un déficit de adquisición de la información, el cual se redujo con la administración de nicotina (0.3 mg/kg, ip); sin embargo, este efecto benéfico de la nicotina no fue observado cuando las lesiones septales se encontraron asociadas con depleción de la serotonina inducida por la paraclorofenilalanina (Riekkinen y col., 1992 y 1994b). La administración combinada de mecamilamina y PCPA alteró la adquisición en la prueba de evasión pasiva (Riekkinen y col., 1992), mientras que lesiones del septo medio produjeron alteraciones comportamentales en el mismo tipo de prueba (Riekkinen y col., 1994 b). Ratas con lesiones del núcleo basalis presentaron alteraciones de la memoria de evasión pasiva que fueron acentuadas por el tratamiento con PCPA. Por otra parte, la nicotina mejoró los déficit de memoria asociados con lesiones del núcleo basalis pero no tuvo ningún efecto cuando las lesiones estuvieron asociadas con la administración de PCPA. Estos estudios indican que la nicotina mejora la atención y que este efecto involucra la participación del sistema serotoninérgico.

Ansiedad

Dosis bajas de nicotina (2.5-10 ng) administradas dentro del NDR producen efectos ansiolíticos, mientras que dosis altas producen un efecto ansiogénico, resultados obtenidos de experimentos realizados con el modelo de la interacción social (Cheeta y col., 2001a). Los efectos ansiolíticos de la nicotina fueron bloqueados con el antagonista de los receptores 5-HT_{1A}, WAY 100635 (200 ng) y revertidos con el antagonista de los receptores α 4 β 2, dihidro-beta-eritroidina (Cheeta y col., 2001 b),

ambos administrados dentro del NDR. La administración del agonista de los receptores 5-HT_{1A}, 8 OH-DPAT, dentro del rafe como sistémicamente también produjo efectos ansiolíticos (Picazo y col., 1995). Estos resultados sugieren que la administración de nicotina, dentro del rafe, induce un aumento local de la liberación de serotonina mediante la estimulación de receptores $\alpha 4\beta 2$, lo que a su vez inhibe el disparo de las neuronas del rafe y la liberación de serotonina mediante de la estimulación de receptores 5-HT_{1A}. Por lo tanto, al parecer, los efectos ansiolíticos de la nicotina dependen de la disminución de la liberación de serotonina en algunas áreas de proyección de las neuronas del rafe.

Por otra parte, el hipocampo y el septo lateral son dos regiones del sistema límbico que han sido implicadas en el control de la ansiedad; al respecto se ha encontrado, que la administración de dosis altas de nicotina en el septo lateral (1-4 μ g) estimula el comportamiento ansiogénico; efecto que ha sido reproducido por la administración del agonista de los receptores 5-HT_{1A}, 8-OH-DPAT en la misma región y antagonizado por el bloqueador de los mismos receptores, WAY 100635 (Cheeta y col., 2000). Es posible que en estos experimentos la nicotina administrada en el septo lateral haya estimulado la liberación local de serotonina, misma que, actuando a nivel de receptores postsinápticos 5-HT_{1A}, dio origen a la aparición de las acciones ansiogénicas. Así mismo, la nicotina produjo efectos ansiogénicos cuando fue inyectada en dosis altas (0.1-8 μ g) en el hipocampo dorsal (File y col., 1998), al respecto se ha encontrado que tanto la mecamilamina como la nicotina incrementan la liberación de serotonina en rebanadas del hipocampo dorsal (Kenny y col., 2000); elementos que reafirman la idea de la interacción entre la nicotina y el sistema serotoninérgico en este estado.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Estudios inmunohistoquímicos han confirmado la presencia de receptores nicotínicos en neuronas serotoninérgicas del NDR de ratas, tanto a nivel somatodendrítico como presináptico. Los receptores nicotínicos son canales catiónicos que permiten la difusión de Ca^{2+} y Na^{+} , por lo que la estimulación de los receptores somatodendríticos puede generar corrientes catiónicas entrantes capaces de despolarizar la membrana y afectar la frecuencia de disparo neuronal. Adicionalmente, el influjo de cationes resultante de la estimulación de los receptores ubicados a nivel presináptico puede modular la liberación, iniciada por el disparo neuronal, de diversos neurotransmisores o generar una despolarización suficiente para que se lleve a cabo la activación de los canales para calcio dependientes de voltaje y de esta manera provocar la liberación de los neurotransmisores.

Así mismo, diversos estudios han demostrado la presencia de receptores nicotínicos en neuronas GABAérgicas del NDR; la estimulación de dichos receptores puede provocar incremento de la liberación de GABA, neurotransmisor que a su vez puede ejercer efectos inhibidores sobre la frecuencia de disparo de las neuronas serotoninérgicas del NDR, mismas que presentan receptores para este neurotransmisor.

Por otra parte se sabe que las neuronas serotoninérgicas del NDR poseen autorreceptores del tipo $5HT_{1A}$, cuya estimulación provoca efectos inhibitorios sobre su frecuencia de disparo y sobre la liberación de serotonina. Estas neuronas emiten colaterales axónicas que pueden hacer sinapsis a nivel somatodendrítico con ellas mismas o con neuronas vecinas.

Con base en estos antecedentes se planteó el siguiente problema: ¿Cuáles son los efectos de la nicotina sobre la frecuencia de disparo de las neuronas serotoninérgicas del NDR y sobre la liberación de serotonina por las mismas y mediante qué mecanismo se llevan a cabo éstos?

3. HIPÓTESIS

Dado que las neuronas serotoninérgicas del NDR expresan receptores nicotínicos y que la estimulación de estos receptores genera corrientes catiónicas entrantes, entonces, la administración de nicotina en el NDR puede generar efectos estimuladores directos tanto sobre la frecuencia de disparo de dichas neuronas como sobre la liberación de serotonina.

Adicionalmente, si la nicotina incrementa la liberación de serotonina dentro del NDR, entonces, la actividad de estas neuronas se puede ver inhibida por la estimulación de los autorreceptores $5HT_{1A}$. Así mismo, si la nicotina incrementa la liberación de GABA a nivel del NDR, entonces, la actividad de las neuronas serotoninérgicas se puede ver inhibida por la acción directa de este neurotransmisor.

4. OBJETIVOS

- Determinar los efectos de la administración de nicotina dentro del NDR sobre la frecuencia de disparo de las neuronas de este núcleo.
- Determinar los efectos de la administración de nicotina dentro del NDR sobre la liberación de serotonina.
- Identificar la participación de la serotonina y del GABA, en los efectos de la nicotina sobre la frecuencia de disparo de las neuronas serotoninérgicas del núcleo dorsal del rafe.
- Determinar si la nicotina puede aumentar la liberación de serotonina en presencia de tetrodotoxina.
- Determinar si la estimulación de las neuronas serotoninérgicas del NDR con nicotina resulta en la inhibición de la actividad de las neuronas colinérgicas de los núcleos laterodorsal tegmental y pedúnculo pontino tegmental.

5. METODOLOGÍA

5.1 Obtención de las rebanadas de encéfalo

Los experimentos fueron llevados a cabo en rebanadas de cerebro medio de ratas macho, jóvenes, de 140 a 160 gramos de peso, cepa Wistar. Las ratas fueron anestesiadas con hidrato de cloral por vía intraperitoneal, a una dosis de 400 mg/kg.

Después de la decapitación, se extrajo el encéfalo y se procedió a la obtención de las rebanadas con un grosor de 350 μm , usando un rebanador McIlwain. Las rebanadas conteniendo el NDR (4/experimento) fueron colocadas en una cámara de perfusión (Fine Science Tools), donde se mantuvieron perfundidas con solución fluido cerebro-espinal artificial a 35°C y burbujeada con carbógeno (95% O_2 y 5% CO_2). La perfusión se realizó con un flujo de 1 ml/min.

5.2 Solución de perfusión

La solución de perfusión fue fluido cerebro-espinal artificial (composición en mM: NaCl 126; KCl 3.5; NaH_2PO_4 1.2; MgCl_2 1.3; CaCl_2 2.0; Glucosa 11 y NaHCO_3 26), mantenido a un pH de 7.3 y oxigenado, por burbujeo con carbógeno. La solución fue adicionada con fenilefrina (12 μM) para inducir el disparo rítmico de las neuronas serotoninérgicas, de otra manera silentes.

5.3 Registros

La actividad eléctrica de las neuronas de los distintos núcleos (NDR, PPT y LDT) fue registrada extracelularmente, 1-2 horas después de la obtención de las rebanadas. Se utilizaron microelectrodos de vidrio múltiples (World Precision Instruments), estirados con un aparato David Kopf Instr. 700C. Uno de los compartimientos fue llenado con NaCl 3M (impedancias entre 4 y 8 $\text{M}\Omega$) y el otro compartimiento con el fármaco a estudiar. El desplazamiento de los electrodos se realizó usando micromanipuladores mecánicos (Fine Science Tools, modelo MM33).

Las señales fueron amplificadas (500-1000 veces) y filtradas (100-3000 Hz), con un amplificador Grass P5, visualizadas con un osciloscopio Tektronix 2213A y registradas con una grabadora digital (BioLogic, frecuencia de muestreo de 24 kHz por canal). Fuera de línea se obtuvieron histogramas de frecuencia, usando un sistema BrainWave o el sistema pClamp8. La frecuencia de disparo control de las neuronas del NDR, PPT y LDT fue determinada durante los últimos 5 minutos antes de la aplicación de los fármacos; los cambios en la frecuencia de disparo producidos por la aplicación de las drogas fueron determinados usando intervalos de tiempo, de por lo menos, 30 segundos.

5.4 Administración de fármacos

Administración de fármacos para el estudio de los efectos de la nicotina, bicuculina y WAY 100635 sobre la frecuencia de disparo de las neuronas del NDR y sobre la liberación de serotonina y GABA

La nicotina (sal bitartrato, Sigma), disuelta previamente en solución de perfusión, fue administrada dentro del NDR. Los electrodos fueron llenados en uno de los compartimientos con NaCl 3M, en otro con la nicotina y en un tercero con la bicuculina o con el WAY-1000635 y fueron colocados dentro del NDR con el uso de un micromanipulador (Fine Science Tools, modelo MM33). Después del registro basal de la actividad neuronal, la nicotina fue administrada usando un sistema de inyección

a presión (Picospritzer II, General Valve Corporation). La duración estándar para la administración local fue de 5 ms, con una presión de 20 PSI.

La bicuculina (Sigma), antagonista de receptores GABA_A, fue administrada en una concentración de 20 μ M a 11 neuronas del NDR, mediante inyección a presión (5ms, 20 PSI).

El WAY-100635 (RBI/Sigma, 140 nM), antagonista de receptores 5HT_{1A}, fue administrado en el NDR mediante inyección a presión (5-10 ms, 20 PSI).

La administración de los fármacos en perfusión, se realizó con el uso de recipientes adicionales conectados, a través de un sistema electrónico de válvulas (ValveBank8, World Precision Instruments), a la línea principal de perfusión. La duración de la administración fue de 6 a 8 minutos.

Administración de drogas para el estudio de los efectos de la nicotina sobre la liberación de serotonina en presencia de tetrodotoxina

En el primer grupo de experimentos las rebanadas fueron pretratadas con tetrodotoxina (TTX) (RBI-Sigma, 1 μ M) por 20 minutos y después se administró nicotina (0.21, 2.15, 21.5 y 215 μ M) en combinación con TTX, 1 μ M. El tiempo de exposición a cada concentración de nicotina fue de 8 min.

En el segundo grupo experimental, las rebanadas fueron pretratadas con una mezcla de TTX 1 μ M y metilcaconitina (bloqueador específico de los receptores nicotínicos de tipo α 7, 0.1 μ M) por 20 minutos. Tras este intervalo se administró la nicotina (0.21, 2.15, 21.5 y 215 μ M) en combinación con TTX, 1 μ M y metilcaconitina, 0.1 μ M.

En el tercer grupo experimental, las rebanadas fueron pretratadas con TTX, 1 μ M y con mecamilamina (bloqueador inespecífico de los receptores nicotínicos, 0.5 μ M) por 20 minutos y después se administró la nicotina (0.21, 2.15, 21.5 y 215 μ M) en combinación con TTX, 1 μ M y mecamilamina, 0.5 μ M.

Administración de fármacos para el estudio de los efectos de la administración de la nicotina en el NDR, sobre la actividad de las neuronas del NDR, del PPT y del LDT

La nicotina, a una concentración de 2 μ M, fue administrada dentro del NDR, con una duración estándar de 5 ms y una presión de inyección de 20 PSI.

Los bloqueadores de los receptores 5-HT_{1A}, espiperona y (-) propranolol, se administraron a presión dentro del LDT. Estos fármacos fueron disueltos en alcohol etílico (espiperona) y agua destilada (propranolol) para obtener soluciones con concentraciones de 1 mM, mismas que posteriormente fueron diluidas 10 veces en solución de perfusión.

5.5 Medida de la liberación de la serotonina y del GABA

La liberación de la serotonina y del GABA fue medida en muestras de solución, colectadas a intervalos de 4 min. de la línea de vacío de la cámara de perfusión. Las muestras fueron analizadas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección electroquímica, usando un detector electroquímico Petit Amper, modelo LC3C. El flujo fue de 80 μ l/min y el tiempo de retención de 15 min.

Se utilizó el método descrito por Donzati y Yamamoto (1998) para la medición de GABA y el método de Cheng y Kuo (1995) para la determinación de la serotonina. Ambos neurotransmisores fueron identificados usando estándares externos (fmol/5 μ l) y fueron cuantificados por medición del área bajo los picos identificados. Los valores control de la liberación de los neurotransmisores fueron obtenidos de tres muestras de solución colectadas previo a la administración de las drogas. Los efectos de las drogas fueron evaluados usando valores medios de la liberación obtenidos de 7 muestras consecutivas.

5.6 Análisis estadístico

Todos los resultados están expresados como el promedio \pm el error estándar del promedio (E.E.P.). Las respuestas a las drogas fueron consideradas significativas si la frecuencia de disparo neuronal cambio en más de un 15% con respecto a la frecuencia basal. Los periodos mínimos para establecer la frecuencia basal fueron de 60 segundos, mientras que los cambios inducidos por las drogas fueron evaluados usando periodos de por lo menos 30 s.

Las comparaciones entre grupos fueron hechas usando la prueba t de Student pareada (comparaciones simples), análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguidas de la prueba de Dunnett (comparaciones múltiples) y análisis de varianza de una vía, en rangos, seguidas de la prueba de Dunn (comparaciones múltiples de grupos de datos con distribuciones no normales). La correlación entre la liberación de GABA y serotonina fue estudiada usando "Pearson Product Moment Correlation". Las diferencias fueron consideradas significativas con una $P < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 Efectos de la nicotina sobre la frecuencia de disparo de las neuronas del NDR y sobre la liberación de serotonina y GABA

Se obtuvieron registros de 93 células del área del núcleo dorsal del rafe, estas células fueron consideradas serotoninérgicas con base en el criterio electrofisiológico previamente establecido (Vandermaelen y Aghajanian, 1993), caracterizado por: frecuencia de disparo regular y baja (0.5 –3 Hz) y potenciales de acción extracelulares de larga duración (> 2 ms) y bifásicos (Figura 4).

La nicotina administrada localmente dentro del NDR incrementó significativamente la frecuencia de disparo de un 70% de las neuronas serotoninérgicas (44 de 64 células) y la disminuyó significativamente en el 30% restante (Figura 5). El máximo incremento de la frecuencia de disparo producido por la nicotina (3.3 veces por arriba del control) fue observado con la concentración de 2.15 μ M (Tabla 1). Este incremento fue significativamente diferente de los obtenidos con las concentraciones de nicotina de 0.215 μ M y 21.5 μ M (análisis de varianza de una vía en rangos, seguidas de la prueba de Dunn, $P < 0.05$). No se encontraron

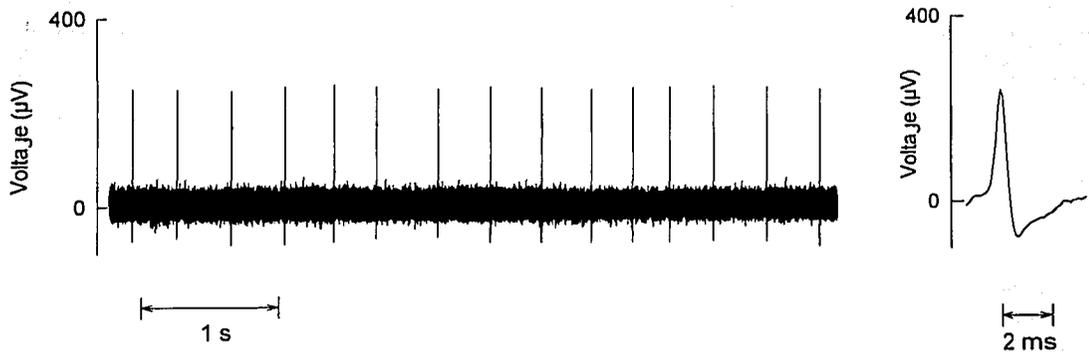
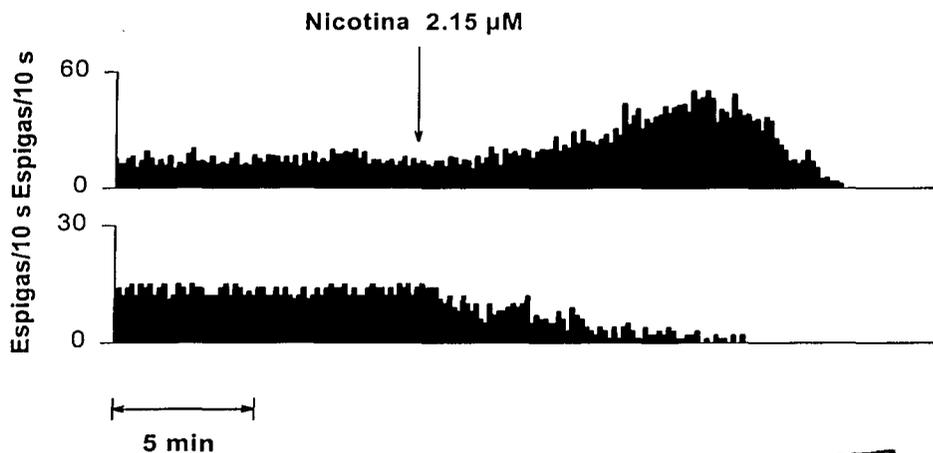


Figura 4. Registro extracelular de la actividad de una neurona del núcleo dorsal del rafe. En la parte de la derecha se presenta un potencial de acción registrado a nivel extracelular perteneciente a la misma neurona.

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 5. Efectos estimuladores e inhibidores de la nicotina sobre la frecuencia de disparo de dos neuronas del núcleo dorsal del rafe, grabadas simultáneamente, en la misma rebanada.

Fármacos	Conc. (μ M)	Efectos estimuladores				Efectos inhibidores			
		Control Hz	Después de los fármacos	Fármacos/Control	n	Control Hz	Después de los fármacos	Fármacos/Control	n
Nicotina	0.215	1.5 \pm 0.1	2.2 \pm 0.3 ^a	1.5 \pm 0.1	11	1.9 \pm 0.5	0.5 \pm 0.2 ^a	0.2 \pm 0.02	4
Nicotina	2.15	1.3 \pm 0.2	3.3 \pm 0.5 ^a	3.4 \pm 0.8 ^b	10	1.7 \pm 0.4	0.8 \pm 0.3	0.4 \pm 0.06	4
Nicotina	21.5	1.3 \pm 0.1	2.2 \pm 0.5 ^a	1.7 \pm 0.4	8	1.5 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1 ^a	0.4 \pm 0.07	6
Nicotina	215	1.6 \pm 0.3	3.3 \pm 0.6 ^a	2.3 \pm 0.3	15	1.8 \pm 0.3	0.9 \pm 0.4	0.4 \pm 0.12	6
WAY 100635	0.14	1.8 \pm 0.3	3.7 \pm 0.9 ^a	2.5 \pm 0.6	7	2.16	1.01	0.46	1
Bicuculina	20	1.2 \pm 0.5	2.2 \pm 0.7 ^a	1.4 \pm 0.2	7	1.6 \pm 0.2	0.6 \pm 0.2 ^a	0.5 \pm 0.1	4

Tabla 1. Efectos de varios fármacos sobre la frecuencia de disparo de neuronas serotoninérgicas del Núcleo Dorsal del Rafe. Los valores representan la frecuencia de disparo neuronal (Hz) y están presentados como promedios \pm E. E. M.

^a Incremento significativo comparado con el valor basal (Prueba de t pareada, $P < 0.05$).

^b Incremento significativo con la concentración de nicotina de 2.15 μ M, comparada con las dosis de nicotina de 0.12 y 21.5 μ M (ANOVA de una vía en rangos seguida de la prueba de Dunn, $P < 0.05$).

TRAZOS CON
 FALLA DE ORIGEN

diferencias significativas entre las disminuciones de la frecuencia de disparo, inducidas por las distintas concentraciones de nicotina.

Se encontró un incremento significativo de los niveles de GABA y serotonina, después de la administración de todas las concentraciones de nicotina (prueba t de Student pareada, $P < 0.05$). El incremento de la liberación de ambos neurotransmisores fue significativamente más alto con la concentración de nicotina de $2.15 \mu\text{M}$ (7.4 veces para la serotonina y 5.9 veces para el GABA) que con las otras concentraciones (análisis de varianza de una vía seguida por la prueba Student-Neuman-Keuls, $P < 0.05$).

Después de la administración de nicotina la liberación de serotonina y GABA presentó oscilaciones con periodos de 12-16 min. Las oscilaciones de la liberación de serotonina fueron recíprocas con las del GABA (Figura 6), habiéndose encontrado una correlación temporal inversa entre ellas (Pearson Product Moment Correlation, $P < 0.05$).

6.2 Efectos de la bicuculina y del WAY 100635 sobre la frecuencia de disparo de las neuronas del NDR y sobre la liberación de serotonina y GABA

La bicuculina, antagonista de receptores GABA_A , fue administrada en una concentración de $20 \mu\text{M}$ a 11 neuronas del NDR, mediante inyección a presión (5ms, 20 PSI). Después de la administración de esta droga, se presentó un incremento significativo (84%) de la frecuencia de disparo de 64% de las neuronas y se redujo en un 53% en las neuronas restantes (36%) (Figura 7, Tabla 1). El incremento en la frecuencia de disparo fue gradual y se encontró acompañado de un incremento significativo y de larga duración de la liberación de serotonina y de un incremento transitorio de la liberación de GABA (Figura 7).

El antagonista de los receptores serotoninérgicos, 5HT_{1A} , WAY-100635, en concentraciones de 140 nM , incrementó significativamente, en un 62%, la frecuencia de disparo de 7 de 8 neuronas del NDR (Tabla 1), a la vez que aumentó la liberación de GABA y serotonina (Figura 8).

La administración en perfusión de la bicuculina (2 y $20 \mu\text{M}$) produjo tanto efectos estimuladores como efectos inhibidores sobre la frecuencia de disparo de las neuronas serotoninérgicas del NDR (Fig. 9 y 10). Cuando la bicuculina produjo efectos estimuladores sobre la frecuencia de disparo, la administración subsecuente de WAY 100635 produjo efectos inhibidores (Figura 9). Cuando la administración de bicuculina produjo la inhibición de la frecuencia de disparo de las neuronas del NDR, la administración subsecuente del WAY 100635 produjo efectos estimuladores (Figura 10).

La administración en perfusión del bloqueador de receptores 5-HT_{1A} , WAY100635 produjo efectos estimuladores discretos o ningún efecto sobre la frecuencia de disparo de las neuronas serotoninérgicas del NDR. La administración subsecuente de la bicuculina produjo la disminución de la frecuencia de disparo (Figura 11).

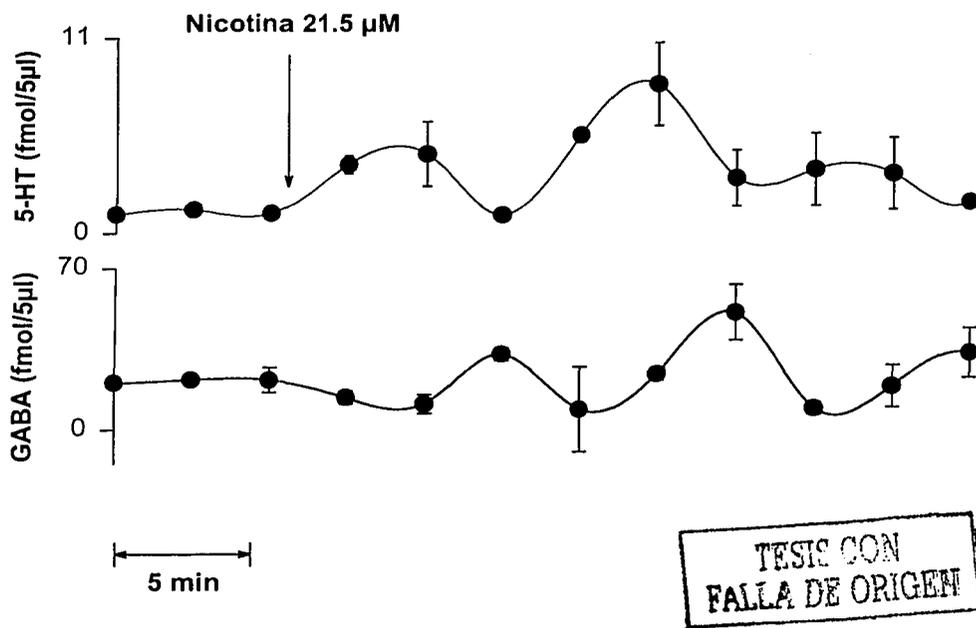


Figura 6. Liberaciones oscilatorias de la serotonina (curva superior) y del GABA (curva inferior) inducidas por la administración local de nicotina dentro del núcleo dorsal del rafe. Existe una correlación inversa significativa entre los puntos correspondientes de las dos curvas (Pearson Product Moment Correlation, $P < 0.05$). Los datos son presentados como media \pm error estándar ($n = 12$).

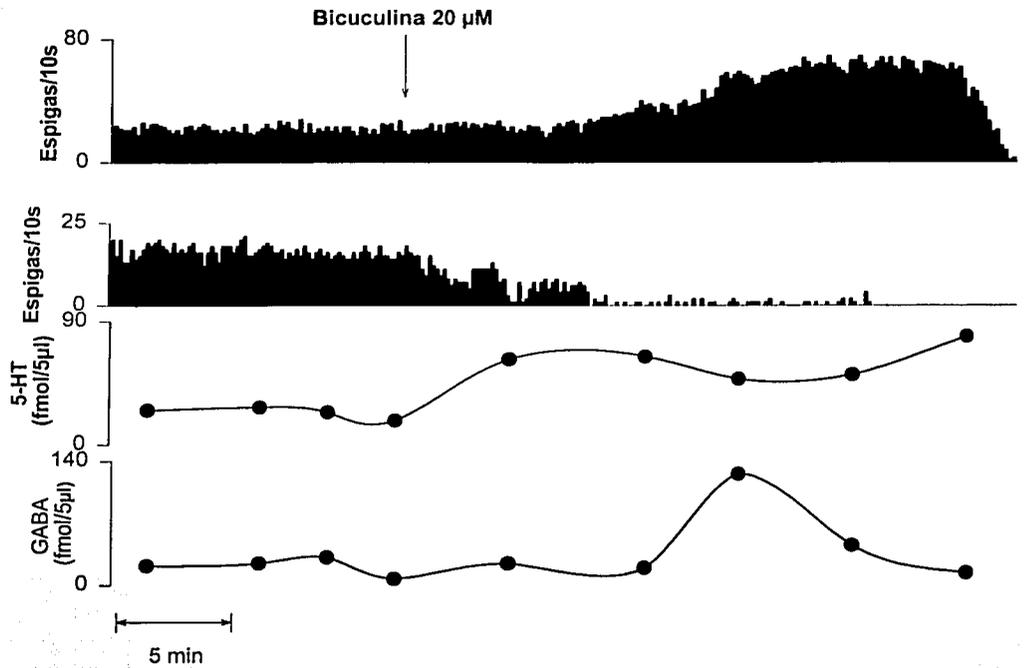


Figura 7. Efectos de la administración de la bicuculina (20 μ M) sobre la frecuencia de disparo de las neuronas del núcleo dorsal del rafe y sobre la liberación de serotonina y GABA.

TECIP CON
FALLA DE ORIGEN

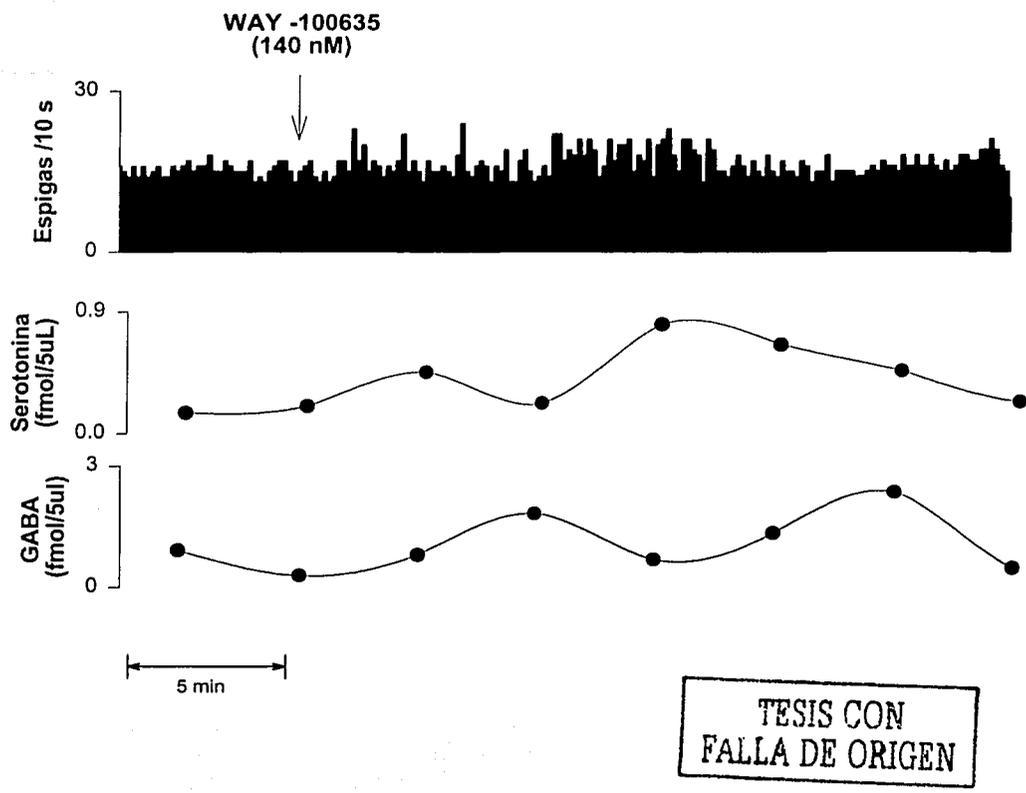
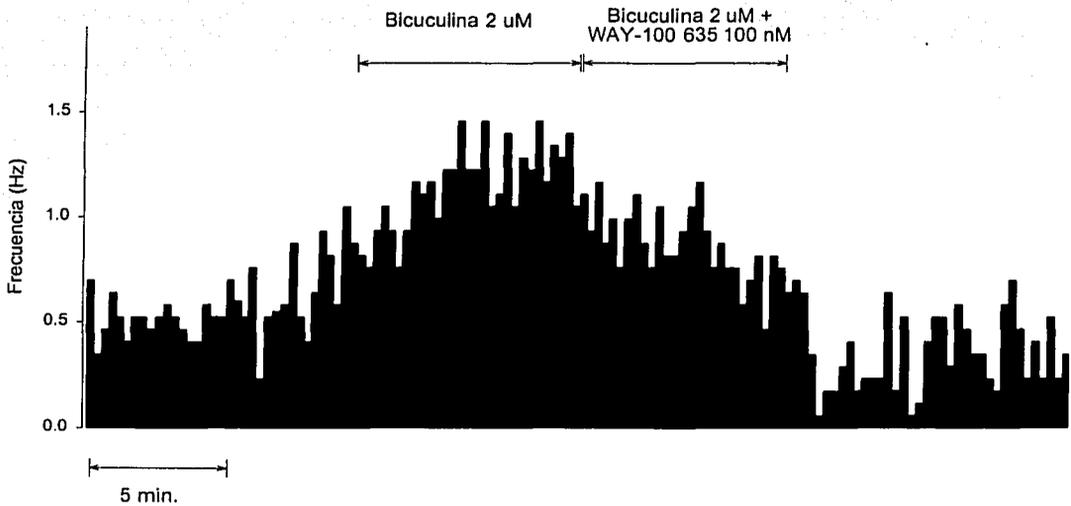
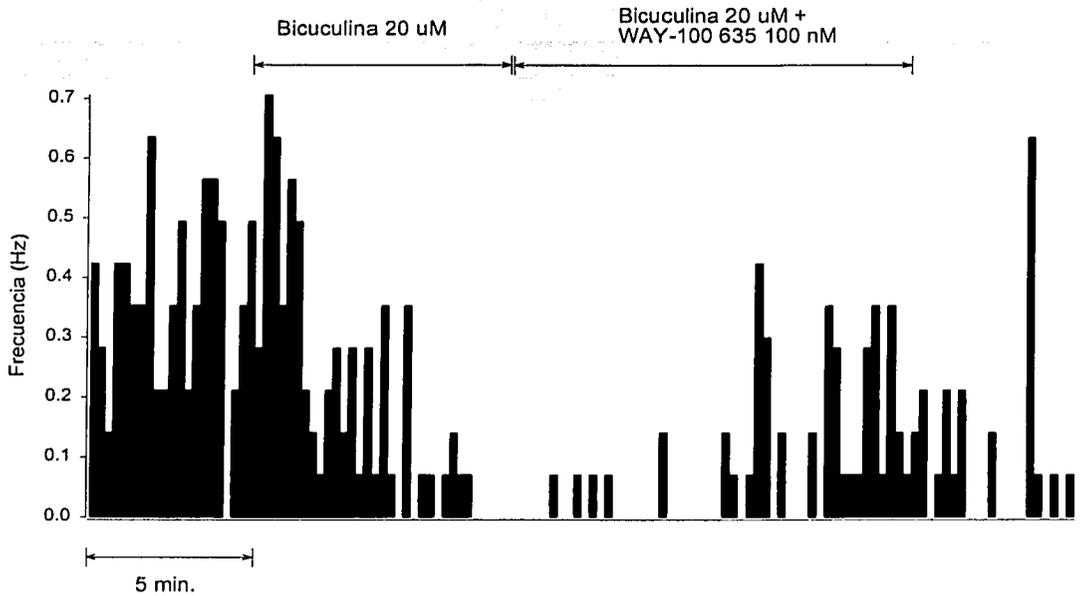


Figura 8. Efectos estimuladores del bloqueador de receptores 5-HT_{1A}, WAY-100635, sobre la frecuencia de disparo de una neurona serotoninérgica del núcleo dorsal del rafe y sobre la liberación de serotonina y GABA.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 9. Los efectos estimuladores de la bicuculina sobre la frecuencia de disparo de una neurona serotoninérgica del núcleo dorsal del rafe son revertidos por el WAY-100635.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 10. Los efectos inhibitorios de la bicuculina sobre algunas de las neuronas del NDR son revertidos por el WAY-100635.

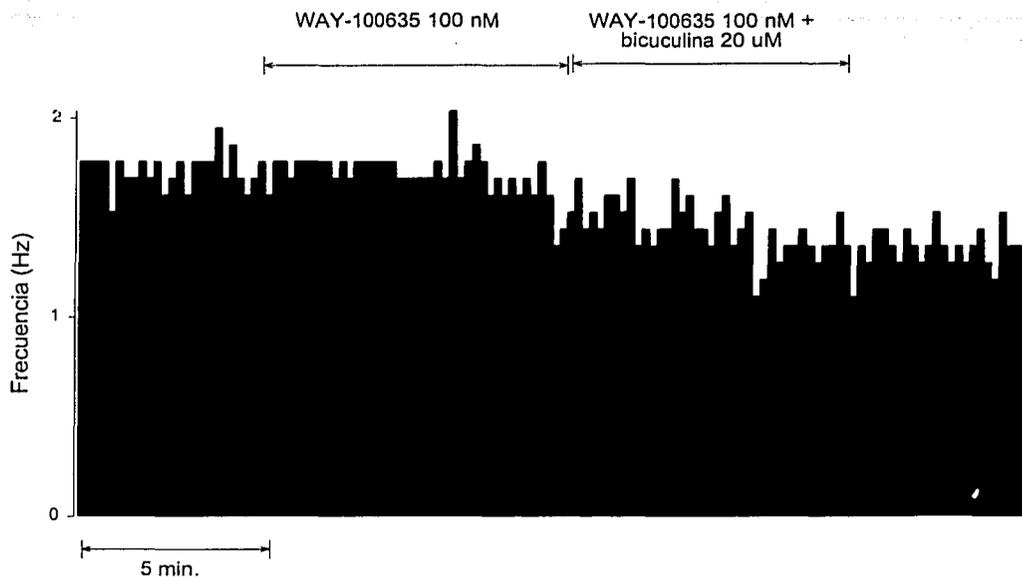


Figura 11. Inhibición de la frecuencia de disparo de una neurona serotoninérgica del NDR inducida por la administración del bloqueador de los receptores GABA_A, bicuculina, administrada después del bloqueador de receptores 5-HT_{1A}, WAY -100635.

TEXIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.3 Efectos de la bicuculina y del WAY 100635, administrados después de la nicotina, sobre la frecuencia de disparo de las neuronas del NDR

La administración de la bicuculina en perfusión ($n=10$), a una concentración de $20 \mu\text{M}$, después de la administración de la nicotina ($2.15 \mu\text{M}$), magnificó tanto los efectos estimuladores como los efectos inhibidores generados por ésta, sobre la frecuencia de disparo de las neuronas del NDR (Figura 12).

La administración en perfusión del WAY 100635 ($n=5$), a una concentración de 140 nM , después de la administración de la nicotina ($2.15 \mu\text{M}$), revirtió las respuestas inhibitoras de ésta, sobre la frecuencia de disparo de las neuronas del NDR e incrementó las respuestas estimuladoras (Figura 12).

6.4 Efectos de la nicotina sobre la liberación de serotonina, en presencia de tetrodotoxina

En presencia de TTX $1 \mu\text{M}$, la nicotina produjo un aumento, dependiente de la dosis, de la liberación de serotonina en 1.96 veces a la dosis de $0.215 \mu\text{M}$, en 6.38 veces a la dosis de $2.15 \mu\text{M}$, en 11.9 veces a la dosis de $21.5 \mu\text{M}$ y en 89.9 veces a la dosis de $215 \mu\text{M}$ (Figura 13). Sin embargo, el análisis de variancia de una vía seguida por la prueba de Dun, mostró que la única diferencia significativa fue entre los valores control y los obtenidos con la administración de nicotina, a la dosis de $215 \mu\text{M}$.

En el segundo grupo experimental, en el cual las rebanadas fueron pretratadas con TTX $1 \mu\text{M}$ y metilcaconitina $0.1 \mu\text{M}$, la nicotina no produjo cambios significativos en la liberación de serotonina a ninguna de las cuatro dosis utilizadas (Figura 13).

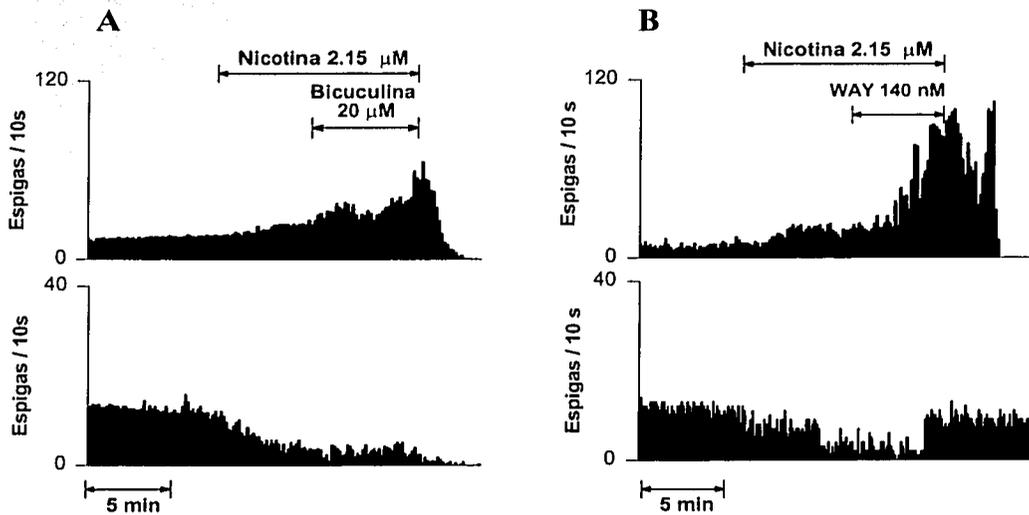
En el tercer grupo experimental, ninguna de las concentraciones de nicotina, administradas después del tratamiento de las rebanadas con TTX $1 \mu\text{M}$ y mecamilamina $0.5 \mu\text{M}$, provocó cambios significativos de la liberación de serotonina (Figura 13).

6.5 Efectos de la administración de la nicotina en el NDR sobre la actividad de las neuronas del NDR, PPT y LDT

Efectos de la nicotina sobre la frecuencia de disparo de las neuronas del NDR

Las neuronas del NDR cuya actividad fue registrada, reunían los criterios electrofisiológicos propuestos por VanderMaelen y Aghajanian (1983) para la identificación de neuronas serotoninérgicas: frecuencia de disparo regular y baja ($1.79 \pm 0.297 \text{ Hz}$, $n=37$), potenciales de acción con morfología bifásica y larga duración (2-3 ms) (Figura 14A).

La administración de nicotina dentro del NDR produjo un incremento significativo de la frecuencia de disparo de 30 neuronas (81.1%) en un $99.5 \pm 27.7\%$ ($P < 0.05$, prueba t de Student pareada) (Figura 14B). En 27 de éstas, el incremento en la frecuencia de disparo fue precedido por una disminución transitoria significativa ($46.5 \pm 5.2\%$, $P < 0.05$, prueba t de Student pareada), con una latencia de $79 \pm 19.7 \text{ s}$ y



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 12. Los efectos inhibitorios de la nicotina sobre la frecuencia de disparo de algunas de las neuronas serotoninérgicas del núcleo dorsal del rafe son mediados por la serotonina y no por el GABA. La administración del bloqueador de receptores GABA_A, bicuculina, después de la administración de la nicotina, aumenta tanto los efectos estimuladores como los inhibidores (histogramas de frecuencia del grupo A). La administración del bloqueador de los receptores 5-HT_{1A}, WAY-100635, después de la nicotina aumenta los efectos estimuladores y *revierte* los inhibidores (panel B).

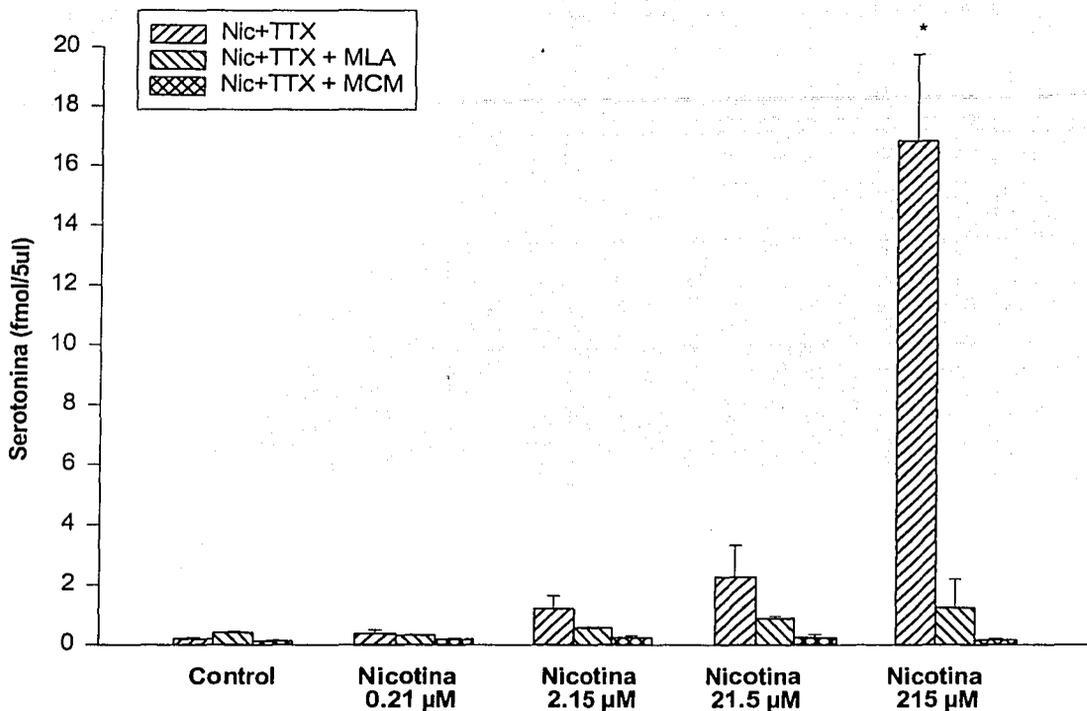


Figura 13. Efectos de la administración de nicotina sobre la liberación de serotonina, en presencia de tetrodotoxina (TTX), metilcaconitina (MLA, bloqueador específico de los receptores α -7 nicotínicos) y mecamilamina (MCM, bloqueador no específico de los receptores nicotínicos). Los resultados son presentados como promedios y errores estándar. “*” representa una diferencia significativa en comparación con el control (ANOVA de una vía seguida por la prueba de Dun).



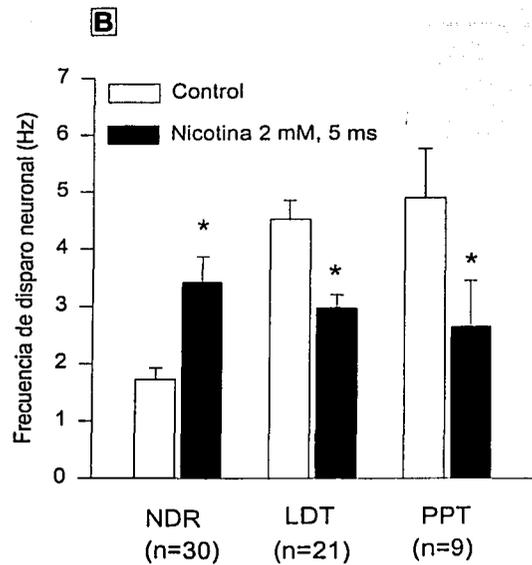
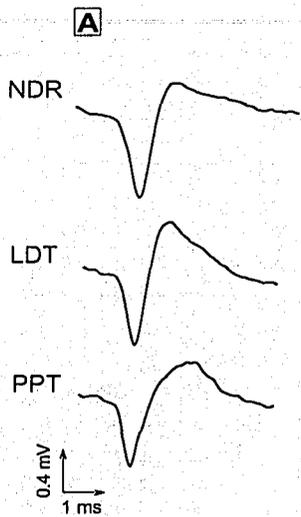


FIGURA 14. A: potenciales de acción extracelulares de las neuronas del NDR, LDT y PPT; B: efectos de la administración de la nicotina dentro del NDR sobre la frecuencia de disparo de las neuronas del NDR, LDT y PPT

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

una duración de 352 ± 33.2 s. El componente estimulador de esta respuesta bifásica tuvo una latencia de 430 ± 59 s y una magnitud de $89.7 \pm 21.6\%$ ($P < 0.05$, prueba t de Student pareada).

En tres (8.1%) neuronas del NDR, la nicotina produjo una respuesta estimuladora monofásica con una latencia corta (0-3 s) y una magnitud de $119.7 \pm 61.5\%$ ($P < 0.05$, prueba t de Student pareada).

La administración de la nicotina dentro del NDR redujo la frecuencia de disparo de 7 (18.9%) neuronas de este núcleo en un $74.8 \pm 12.1\%$ ($P < 0.05$, prueba t de Student pareada). Este efecto tuvo una latencia corta (0-2 s) y una duración de 516.8 ± 55.6 s.

Efectos de la administración de nicotina dentro del NDR sobre la frecuencia de disparo de las neuronas del LDT

Las neuronas del LDT tuvieron una frecuencia de disparo media de 4.52 ± 0.33 Hz ($n = 26$). Sus potenciales de acción extracelulares tuvieron una morfología bifásica con una deflexión positiva inicial abrupta y una deflexión final negativa con decaimiento lento (Figura 14A). La duración del potencial de acción extracelular completo fue de 3.09 ± 0.09 ms, mientras que la duración de la deflexión positiva inicial fue de 0.99 ± 0.06 ms ($n = 26$). La frecuencia de disparo relativamente baja (< 10 Hz), la alta duración de los potenciales de acción y su morfología bifásica han sido descritos como criterios de identificación de las neuronas presuntamente colinérgicas del LDT en registros extracelulares (Kayama y col., 1992; Koyama y col., 1994).

La administración de nicotina por microinyecciones a presión dentro del NDR (2 mM, 5 ms) disminuyó la frecuencia de disparo de 21 neuronas (80.8%) del LDT en un $65.9 \pm 5.5\%$ ($P < 0.05$, prueba t de Student pareada), efecto que coincidió con un incremento en la frecuencia de disparo de las neuronas del NDR en $111.4 \pm 17.3\%$ ($P < 0.05$, prueba t de Student pareada, $n = 21$) (Figura 15). En 19 de estas 21 neuronas del LDT la respuesta inhibitoria fue precedida por un incremento transitorio de la frecuencia de disparo ($23.1 \pm 5.3\%$, $P < 0.05$, prueba t de Student pareada) el cual coincidió con una disminución transitoria de la frecuencia de disparo de las neuronas del NDR (Fig. 15B).

En dos experimentos (7.7%) se presentó incremento de la frecuencia de disparo de las neuronas del LDT en un $45.5 \pm 5.5\%$, el cual coincidió con una respuesta monofásica inhibitoria de la frecuencia de disparo de las neuronas del NDR, mientras que en otras tres neuronas (11.5%) del LDT no se observaron cambios en la frecuencia de disparo cuando en el NDR se presentó dicha respuesta.

Los cambios recíprocos en la frecuencia de disparo de las neuronas del NDR y del LDT antes descritos tuvieron una correlación inversa significativa (Pearson Product Moment Correlation, $r = -0.83$, $P < 0.05$). Las administraciones repetidas de nicotina dentro del NDR usando duraciones crecientes de la microinyección (de 1-5 ms a 50-100 ms) produjeron efectos inhibitorios proporcionalmente más grandes en duración y magnitud ($n = 6$). La mayor disminución de la frecuencia de disparo de las neuronas del LDT (82%) fue observada con administraciones de nicotina de 100-150 ms de

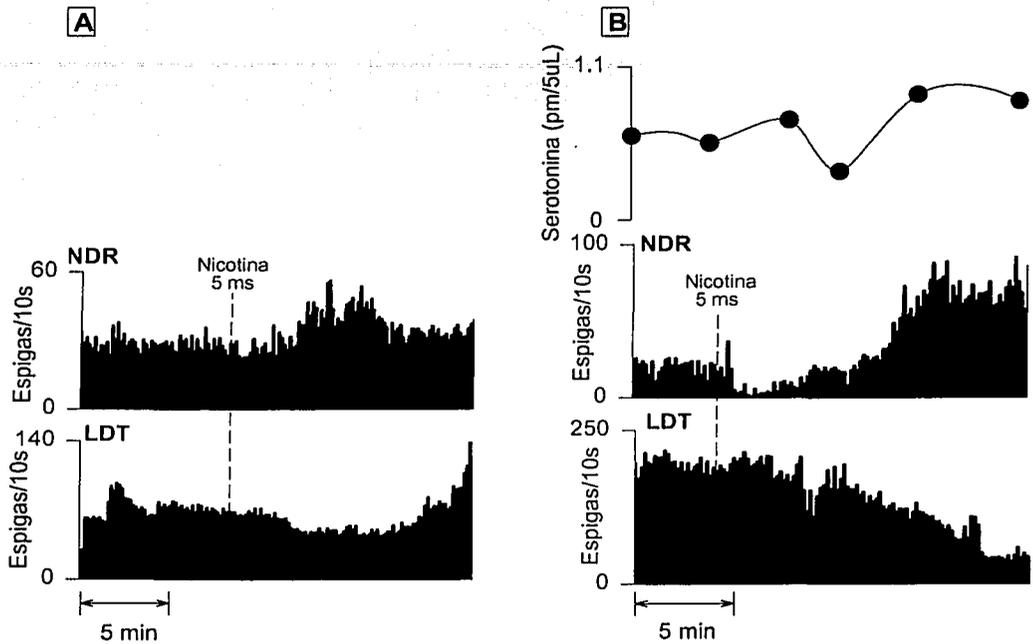


Figura 15. Efectos estimuladores de la administración de la nicotina en el NDR sobre la frecuencia de disparo de las neuronas serotoninérgicas del mismo núcleo y efectos inhibitorios simultáneos sobre la frecuencia de disparo de las neuronas del LDT.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

duración y esta disminución fue diferente de las producidas por administraciones de nicotina con duraciones mas bajas (análisis de variancia de una vía seguida por la prueba de Bonferoni, $P < 0.05$).

Influencia de la administración de la nicotina dentro del NDR sobre la frecuencia de disparo de las neuronas del PPT

Las neuronas del PPT tuvieron una frecuencia de disparo media de 4.9 ± 0.86 Hz ($n = 11$). Sus potenciales de acción extracelulares fueron similares a los de las neuronas del LDT (bifásicos, con una deflexión positiva abrupta y una deflexión negativa final con decaimiento lento, Figura 14A). La duración del potencial de acción completo fue de 3.05 ± 0.15 ms ($n = 11$) y la duración de la deflexión inicial positiva fue de 0.92 ± 0.06 ms ($n = 11$). La frecuencia de disparo relativamente baja, así como los potenciales de acción anchos, bifásicos representan criterios de identificación de las neuronas colinérgicas del PPT en registros extracelulares (Thakkar y col., 1998).

La administración de la nicotina dentro del NDR con una duración de 5 ms indujo una disminución significativa en la frecuencia de disparo de 9 (81.8%) neuronas del PPT en un $53.9 \pm 10\%$ ($P < 0.05$, prueba t de Student pareada) la cual coincidió con un incremento significativo en la frecuencia de disparo de las neuronas del NDR ($74.9 \pm 14.1\%$, $P < 0.05$, prueba t de Student pareada, $n = 9$) (Figura 14B). En estas 9 neuronas del PPT la disminución de la frecuencia de disparo fue precedida por un incremento transitorio ($28.3 \pm 10.8\%$, $P < 0.05$, prueba t de Student pareada, $n = 9$) el cual coincidió con una disminución transitoria en la frecuencia de disparo de las neuronas del NDR. La administración repetida de la nicotina dentro del NDR produjo disminuciones reproducibles en la frecuencia de descarga de las neuronas del PPT ($n = 4$).

En dos experimentos la administración de la nicotina dentro del NDR falló en producir algún cambio en la frecuencia de disparo de las neuronas del PPT, si bien, las neuronas del NDR presentaron disminución de su frecuencia de disparo. Los cambios recíprocos en la frecuencia de disparo de las neuronas del NDR y PPT tuvieron una correlación inversa significativa (Pearson Product Moment Correlation, $r = -0.963$, $P < 0.05$, $n = 20$).

Influencia de la espiperona, del (-)propranolol y del WAY-100635 sobre la inhibición de las neuronas del LDT inducida por la nicotina

La espiperona (0.1 mM) administrada dentro del LDT (Figura 16A) aumentó la frecuencia de disparo de las neuronas de este núcleo en $22 \pm 6.2\%$ ($n = 5$, prueba t de Student pareada, $P < 0.05$). El pre-tratamiento de las neuronas del LDT con espiperona bloqueo, casi por completo, la inhibición de las neuronas del LDT inducida por la nicotina administrada dentro del NDR (Fig 16A).

El pretratamiento de las neuronas del LDT con (-)propranolol (0.1 mM), no produjo efectos significativos sobre la frecuencia de disparo de estas neuronas, pero bloqueo el efecto inhibidor de la administración de la nicotina dentro del NDR sobre la frecuencia de disparo de las neuronas colinérgicas del LDT (Figura 16B).

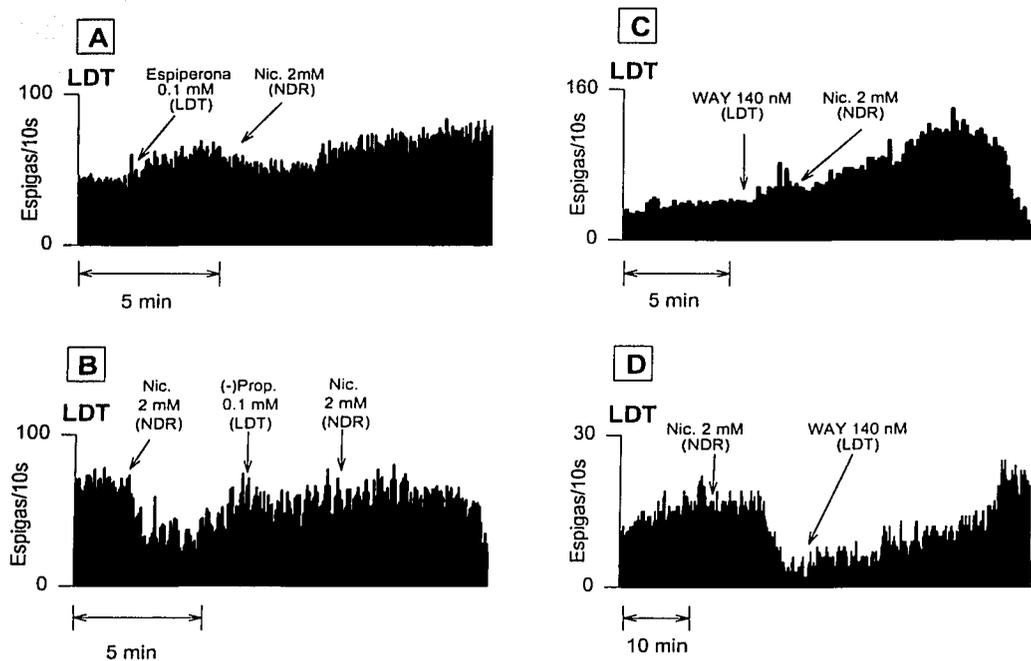


Figura 16. Los efectos inhibitorios de la nicotina, inyectada dentro del NDR, sobre las neuronas colinérgicas del núcleo laterodorsal tegmental (LDT) son mediados por la serotonina. **A:** la administración de nicotina (Nic) dentro del NDR, después de la administración del bloqueador de los receptores 5-HT_{1A}, spiperona, dentro del LDT, produce un efecto inhibitorio débil y transitorio de la frecuencia de disparo de una neurona colinérgica del LDT; **B:** la administración de la nicotina dentro del NDR después de la administración del (-)propranolol dentro del LDT no produce ningún efecto sobre las neuronas colinérgicas del LDT; **C:** el pre-tratamiento de las neuronas del LDT con WAY-100635 (bloqueador específico de los receptores 5-HT_{1A}) previene la inhibición de las neuronas colinérgicas del LDT por la administración de la nicotina dentro del NDR; **D:** el WAY-100635 revierte los efectos inhibitorios de la nicotina inyectada dentro del NDR sobre una neurona del LDT.

La administración del bloqueador específico de los receptores 5-HT_{1A}, WAY-100635 (140 nM) dentro del LDT indujo un incremento significativo en la frecuencia de disparo de las neuronas de este núcleo en 55.4±17.5% (n = 5, P < 0.05, prueba t de Student pareada) y revirtió los efectos inhibidores de la administración de la nicotina dentro del NDR (Figura 16C, D).

Influencia de la administración de la nicotina dentro del NDR sobre la liberación de serotonina

La liberación de serotonina aumentó de manera significativa después de la administración de la nicotina dentro del NDR (28.4±2.4%, P < 0.05, prueba t de Student pareada, n = 12).

7. DISCUSIÓN

7.1 Efectos de la nicotina sobre la frecuencia de disparo neuronal

Los resultados de este estudio indican que la nicotina aumenta la frecuencia de disparo de dos terceras partes de las neuronas serotoninérgicas del NDR y la disminuye en el tercio restante.

La presencia de receptores nicotínicos de tipo $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ en el soma de las neuronas serotoninérgicas del núcleo dorsal del rafe de rata (Bitner y col., 2000), apoya la hipótesis de que los efectos estimuladores de la nicotina se deben a la acción directa de ésta sobre tales neuronas. Por otra parte, Li y col. (1988) han reportado una acción estimuladora indirecta de la nicotina, sobre las neuronas serotoninérgicas del NDR, mediada por la noradrenalina a través de la estimulación de receptores α_1 adrenérgicos. Sin embargo, en nuestro estudio esta vía no estuvo probablemente implicada, ya que la solución de perfusión contuvo fenilefrina en una concentración alta, que pudo haber mantenido estimulados casi de manera máxima a los receptores α_1 de las neuronas serotoninérgicas.

El incremento de la frecuencia de disparo provocado por la nicotina estuvo limitado por la serotonina liberada dentro del NDR, ya que el WAY-100635, administrado después de la nicotina incrementó aun más la frecuencia de disparo. De manera similar, el hecho de que la bicuculina administrada después de la nicotina magnificara los efectos estimuladores de ésta, sustenta la idea de que el ácido γ -aminobutírico (GABA), también limitó el incremento de la frecuencia de disparo de las neuronas estudiadas.

Los efectos inhibidores de la nicotina sobre la frecuencia de disparo de las neuronas serotoninérgicas del NDR resultaron dependientes de la serotonina, pero no del GABA, dado que esta inhibición fue revertida por el WAY-100635, antagonista de los receptores serotoninérgicos 5HT_{1A}, mas no por la bicuculina, antagonista de los receptores GABA_A. Una conclusión similar fue obtenida por Engberg y col. (2000), usando experimentos *in vivo*. Al respecto de la acción inhibidora de la serotonina sobre las neuronas serotoninérgicas del NDR se sabe que éstas poseen

autorreceptores de tipo 5-HT_{1A}, cuya estimulación provoca disminución de la frecuencia de disparo (Penington y col., 1993) e hiperpolarización (Li y col. 1998).

Por otra parte, diversos estudios apoyan la idea de que el GABA pueda mediar los efectos inhibitorios de la nicotina sobre la frecuencia de disparo de las neuronas estudiadas. En este sentido se sabe que el GABA provoca incremento de la frecuencia de corrientes postsinápticas inhibitorias en neuronas serotoninérgicas del NDR (Liu y col., 2000) y que las mismas están sujetas a inhibición GABAérgica durante el sueño de movimientos oculares rápidos (Nitz y Siegel, 1997). Además, en ratas 30% de la población neuronal total del NDR está constituida por neuronas GABAérgicas (Johnson, 1994) y la mayoría de éstas presentan receptores nicotínicos de tipo $\alpha 7$ (Bitner y Nikkel, 2002). Adicionalmente, se ha demostrado que la nicotina incrementa la liberación de GABA en rebanadas de cerebro (Yang y col., 1996). Sin embargo, como ya se señaló, en este estudio los efectos inhibitorios de la nicotina no se encontraron mediados por este neurotransmisor, ya que la administración de bicuculina no revirtió la disminución de la frecuencia de disparo, por el contrario la magnificó.

Los efectos duales de la nicotina sobre la frecuencia de disparo neuronal, observados en este trabajo, sugieren la existencia de dos poblaciones de neuronas presuntamente serotoninérgicas dentro del NDR. Una de estas representada por neuronas estimuladas tanto por la nicotina como por la bicuculina, lo que sugiere que expresan receptores nicotínicos y GABAérgicos tipo A. Estas neuronas fueron inhibidas por la serotonina a través de la estimulación de receptores 5HT_{1A} y son probablemente serotoninérgicas debido a que el aumento de la liberación de serotonina se presentó conjuntamente con el incremento de la frecuencia de disparo (véase el subcapítulo de liberación de serotonina).

Las neuronas que fueron inhibidas por la nicotina y por la bicuculina a través de la liberación de serotonina pertenecen a la segunda población, mismas que probablemente no expresan receptores nicotínicos ni GABA_A, pero sí receptores 5HT_{1A}. Estas neuronas exhiben una actividad recíproca con la de las neuronas que son estimuladas por la nicotina. Recientemente, Sakai y col. (2001) describieron seis diferentes tipos de neuronas en el NDR, uno de los cuales (Tipo II B) tiene un patrón de actividad recíproco con muchos de los otros tipos.

7.2 Efectos de la nicotina sobre la liberación de serotonina

Todas las concentraciones de nicotina utilizadas provocaron incremento de la liberación de serotonina. A concentraciones de nicotina de 0.2, 2, y 21 μM este incremento fue dependiente del aumento de la frecuencia de disparo de las neuronas serotoninérgicas del NDR. Un argumento a favor de esta afirmación es que la liberación de serotonina inducida por la nicotina fue inhibida casi por completo por la presencia de tetrodotoxina. Por lo tanto, es posible que la serotonina haya sido liberada a nivel de las terminales axónicas o desde la región somatodendrítica de las neuronas serotoninérgicas del NDR.

La dosis más alta de nicotina utilizada produjo un aumento de la liberación de serotonina independiente del disparo neuronal. En presencia de TTX esta dosis de

nicotina indujo una liberación de serotonina de 88.9 veces la liberación basal, mediante la estimulación de receptores nicotínicos de tipo $\alpha 7$, ya que esta liberación fue bloqueada por la metilcaconitina. Este efecto pudo deberse a la acción estimuladora directa de la nicotina sobre receptores nicotínicos presinápticos, localizados a nivel de las terminales axónicas de las neuronas serotoninérgicas; o a la estimulación de la liberación somatodendrítica, a través de receptores nicotínicos ubicados en este nivel. La liberación somatodendrítica de serotonina ha sido descrita en el NDR de ratas (Adell y col., 1993) y gatos (Fueri y col., 1984; Héry y col., 1986; Becquet y col., 1990) y se ha encontrado marcadamente afectada por la TTX, en estudios *in vivo*, pero no en estudios *in vitro* (Héry y col., 1986). Es importante mencionar que la activación de los receptores nicotínicos de tipo $\alpha 7$, induce el mayor aumento en la entrada de calcio a la célula, generado por los diferentes tipos de receptores nicotínicos conocidos, por lo que es posible que su estimulación pueda provocar la liberación de serotonina. La dosis efectiva media (DE_{50}) de nicotina para la activación de estos receptores tiene valores de 40 μM (Lindstrom, 1995), lo que explica el aumento brusco y de alta magnitud de la liberación de serotonina entre las dosis de 21 y 215 μM . Considerando lo anterior, resulta poco probable que la activación de los receptores $\alpha 7$ presinápticos represente *per se* un mecanismo importante para la liberación de serotonina bajo ciertas condiciones, como en el caso de fumadores, en los que se alcanzan niveles sanguíneos de nicotina del orden de 0.1–1 μM . Sin embargo, es posible que la estimulación de estos receptores potencie la liberación de serotonina inducida por los potenciales de acción de las neuronas serotoninérgicas del NDR, a través del aumento de la concentración de calcio en los botones terminales de las mismas.

La administración de la nicotina provocó, además del incremento de la liberación de serotonina, incremento de la liberación de GABA. El análisis del curso temporal de los experimentos individuales revelaron que tales incrementos fueron oscilatorios y recíprocos, lo que sugiere que la nicotina estimula directamente la liberación de ambos neurotransmisores, los cuales a su vez, ejercen acciones inhibitorias recíprocas. El hecho de que la administración de la bicuculina, provocara un incremento de la liberación de serotonina y que la administración del WAY-100635, incrementara la liberación de GABA, soporta esta idea. Además de la inhibición recíproca, los resultados obtenidos indican que tanto el GABA como la serotonina ejercen efectos autoinhibidores, debido a que la administración de bicuculina incrementó la liberación de GABA mientras que la administración del WAY-100635 incrementó la liberación de serotonina. Estos datos son acordes con estudios previos que indican que parte del control de la liberación de serotonina esta dado por retroalimentación negativa a través de la activación de receptores $5HT_{1A}$ (Bagdy y col., 2000; Tao y col., 1996) y que la estimulación de autorreceptores presinápticos, $GABA_A$, limita la liberación de GABA (Ennis y Minchin, 1993; Bagdy y col., 2000).

7.3 Actividad recíproca de las neuronas serotoninérgicas del NDR y colinérgicas de los núcleos LDT y PPT inducida por la nicotina

La administración a presión de la nicotina dentro del NDR indujo cambios recíprocos en la frecuencia de disparo de las neuronas del NDR y del LDT/PPT. Así, cuando la frecuencia de disparo de las neuronas del NDR aumentó después de la administración de la nicotina en un $99.5 \pm 27.7\%$, la frecuencia de disparo de las neuronas del LDT y PPT disminuyó significativamente en un $65.9 \pm 5.5\%$ y $53.9 \pm 10.1\%$, respectivamente. Cuando la frecuencia de disparo de las neuronas del NDR disminuyó transitoriamente después de la administración de la nicotina ($46.5 \pm 5.2\%$), la frecuencia de disparo de las neuronas del LDT y PPT aumentó ($23.1 \pm 5.3\%$ y $28.3 \pm 10\%$), muy probablemente debido a un proceso de desinhibición. Los cambios recíprocos en la frecuencia de disparo de las neuronas del NDR y del LDT/PPT inducidos por la nicotina fueron temporalmente coincidentes y exhibieron una correlación inversa significativa (Pearson Product Moment Correlation, $r = -0.83$ para las neuronas del LDT y $r = -0.96$ para las neuronas del PPT). La inhibición de las neuronas del LDT/PPT estuvo asociada con un incremento significativo en la liberación de serotonina ($28.4 \pm 2.4\%$) y, en el caso de las neuronas del LDT, fue bloqueada por el pretratamiento con el antagonista específico de los receptores 5-HT_{1A} , WAY-100635 y por los antagonistas menos específicos de los mismos receptores, espiperona y propranolol. Es importante señalar que tanto el WAY-100635 como la espiperona indujeron como efecto propio un incremento en la frecuencia de disparo de las neuronas del LDT ($55.4 \pm 17.5\%$), lo cual sugiere la existencia de una inhibición serotoninérgica tónica sobre las neuronas del LDT.

En conjunto, estos datos indican que la aplicación de nicotina dentro del NDR estimula las neuronas serotoninérgicas del NDR, lo que a su vez inhibe a las neuronas colinérgicas del LDT y PPT por activación de sus receptores 5-HT_{1A} . Esta conclusión es apoyada por estudios previos que muestran que las neuronas serotoninérgicas del NDR envían proyecciones a las neuronas colinérgicas del LDT y PPT (Honda y Semba, 1994; Steininger y col., 1997) y que la serotonina hiperpolariza la mayoría de las neuronas del LDT y PPT actuando en receptores 5-HT_{1A} (Luebke y col., 1992; Leonard y Llinas, 1994).

Las neuronas del LDT y PPT que no cambiaron su frecuencia de disparo después de la aplicación de la nicotina probablemente pertenecen a subpoblaciones neuronales insensibles a la serotonina. La existencia de tales subpoblaciones ha sido demostrada tanto *in vitro* (Luebke y col., 1992; Leonard y Llinas, 1994) como *in vivo* (Thakkar, 1998).

Las neuronas del PPT y LDT inhibidas por la activación de las neuronas del NDR muy probablemente fueron colinérgicas debido a sus potenciales de acción de larga duración (> 3 mseg.) y a su frecuencia de disparo relativamente baja. En ratas jóvenes la mayoría de las neuronas del LDT con propiedades electrofisiológicas relacionadas con las espigas ponto-genículo-occipitales (PGO) han sido reportadas como colinérgicas e inhibidas por agonistas de los receptores 5-HT_{1A} (Luebke y col., 1992). Por lo tanto, puede asumirse que este tipo de neuronas es también inhibido

por la administración de la nicotina dentro del NDR. Estos hallazgos pueden explicar la desaparición de las espigas PGO del sueño MOR observada después de la administración sistémica de nicotina en experimentos *in vivo*.

Los resultados obtenidos apoyan la idea de que diversos efectos observados tras la administración de la nicotina, tales como la alteración de la duración de las fases del sueño, la supresión de las espigas PGO, el incremento de la actividad locomotora, el mejoramiento de la atención, así como los efectos anorexigénicos, antidepressivos, ansiolíticos y ansiogénicos, tienen su explicación, al menos en parte, en las acciones que la nicotina ejerce sobre las neuronas serotoninérgicas del NDR.

8. CONCLUSIONES

- La nicotina estimula aproximadamente a dos terceras partes de las neuronas del NDR, probablemente, dada la presencia de receptores nicotínicos en estas neuronas, por un efecto directo. Además inhibe aproximadamente a un tercio de las neuronas del NDR, mediante la liberación de serotonina.
- La nicotina puede provocar la liberación de serotonina mediante la estimulación de receptores nicotínicos de tipo $\alpha 7$, presuntamente localizados a nivel presináptico, a concentraciones ~100 veces mayores a las que se pueden encontrar en sangre de personas fumadoras.
- La estimulación de las neuronas serotoninérgicas del NDR con nicotina resulta en la inhibición, mediada por la serotonina, de la actividad de las neuronas colinérgicas del LDT y PPT, lo que puede explicar la inhibición de las espigas PGO del sueño MOR, observada tras la administración de nicotina.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Abdulla FA, Calaminici M, Wonnacott S, Gray JA, Sinden JD, Stephenson JD. Sensitivity of rat frontal cortical neurones to nicotine is increased by chronic administration of nicotine and by lesions of the nucleus basalis magnocellularis: comparison with numbers of [3H]nicotine binding sites. *Synapse* 1995; 21(4):281-288.
2. Adell A, Carceller A, Artigas F. In vivo brain dialysis study of the somatodendritic release of serotonin in the Raphe nuclei of the rat: effects of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin. *J Neurochem* 1993;60(5):1673-1681.
3. Aghajanian GK, VanDerMaelen CP. Intracellular recordings from serotonergic dorsal raphe neurons: pace-maker potentials and the effect of LSD. *Brain Res* 1982; 238:463-469.
4. Aghajanian GK, Graham AM, Sheard MH. Serotonin containing neurons in brain: depression of firing by monoamine oxidase inhibitors. *Science* 1970; 169:1100-1110.
5. Aghajanian GK, Haigler HJ, Bloom FE. Lysergic acid diethylamide and serotonin: direct actions on serotonin-containing neurons in rat brain. *Life Sci* 1972; 11:615-622.

6. Aghajanian GK, Sprouse JS, Rasmusen K. Physiology of the midbrain serotonin system. En: De Meltzer HY. *Psychopharmacology, the Third Generation of Progress*. New York:Raven Press, 1987:141-149.
7. Aghajanian GK, Wang RY, Baraban J. Serotonergic and non-serotonergic neurons of the dorsal raphe: reciprocal changes in firing induced by peripheral nerve stimulation. *Brain Res* 1978; 153:169-175.
8. Anand R, Lindstrom J. Nucleotide sequence of the human nicotinic acetylcholine receptor beta 2 subunit gene. *Nucleic Acids Res* 1990; 18(14):4272.
9. Azmitia EC. Bilateral serotonergic projections to the dorsal hippocampus of the rat: simultaneous localization of 3H-5HT and HRP after retrograde transport. *J Comp Neurol* 1981; 203(4):737-743.
10. Azmitia EC. The serotonin-producing neurons of the midbrain median and dorsal raphe nuclei. En: Iversen LL, Iversen SD, Snyder SH, editores. *Handbook of Psychopharmacology*. New York:Plenum, 1978, vol. 9:233-314.
11. Bagdy E, Kiraly I, Harsing LG. Reciprocal innervation between serotonergic and GABAergic neurons in raphe nuclei of the rat. *Neurochem Res* 2000; 25:1465-1473.
12. Baraban JM, Aghajanian GK. Suppression of firing of 5-HT neurons in the dorsal raphe by alpha-adrenoreceptor antagonists. *Neuropharmacology* 1980; 19:355-363.
13. Baraban JM, Aghajanian GK. Suppression of serotonergic neuronal firing by α -adrenoreceptor antagonists, evidence against GABA mediation. *Europ J Pharmacol* 1980; 66:287-294.
14. Baraban JM, Wang RY, Aghajanian GK. Reserpine suppression of dorsal raphe neurons firing: mediation by adrenergic system. *Eur J Pharmacol* 1978; 52:27-36.
15. Barnes JM, Costall B, Coughlan J, Domeney AM, Gerrard PA, Kelly ME, Naylor RJ, Onaivi ES, Tomkins DM, Tyers MB. The effects of ondansetron, a 5-HT₃ receptor antagonist, on cognition in rodents and primates. *Pharmacol Biochem Behav* 1990; 35(4):955-962.
16. Baumgarten HG, Lachenmayer L. 5,7-Dihydroxytryptamine: improvement in chemical lesioning of indoleamine neurons in the mammalian brain. *Z Zellforsch mikrosk Anat* 1972; 135:399-414.
17. Becquet D, Faudon M, Héry. The role of serotonin release and autoreceptors in the dorsalis raphe nucleus in the control of serotonin release in the cat caudate nucleus. *Neurosci* 1990; 39(3):639-647.
18. Bencherif M, Fowler K, Lukas RJ, Lippiello PM. Mechanisms of up-regulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in clonal cell lines and primary cultures of fetal rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 275(2):987-994.
19. Benwell ME, Balfour DJ. The effects of acute and repeated nicotine treatment on nucleus accumbens dopamine and locomotor activity. *Br J Pharmacol* 1992; 105(4):849-856.

20. Benwell MEM, Balfour DJK, Anderson JM. Evidence that tabaco smoking increases the density of (-)-[³H] nicotine binding sites in human brain. *J Neurochem* 1988; 50:1243-1247.
21. Bitner RS, Nikkel AL, Curzon P, Donnelly-Roberts DL, Puttfarcken PS, Namovic M, Jacobs IC, Meyer MD, Decker MW. Reduced nicotinic receptor-mediated antinociception following in vivo antisense knock-down in rat. *Brain Res* 2000; 871(1):66-74.
22. Bitner RS, Nikkel AL. Alpha-7 nicotinic receptor expression by two distinct cell types in the dorsal raphe nucleus and locus coeruleus of rat. *Brain Res* 2002; May 31;938(1-2):45-54
23. Björklund A, Baumgarten HG, Rensch A. 5,7-Dihydroxytryptamine: improvement of its selectivity for serotonin neurons in the CNS by pre-treatment with desipramine. *J Neurochem* 1975; 24:833-835.
24. Blier P, de Montigny C, Chaput Y. Modifications of the serotonin system by antidepressant treatments: implications for the therapeutic response in major depression. *J Clin Psychopharmacol* 1987; Dic;7(6 Suppl):24S-35S
25. Blier P, de Montigny C. Modification of 5-HT neuron properties by sustained administration of the 5-HT sub(1A) agonist gepirone: Electrophysiological studies in the rat brain. *Synapse* 1987; 1(5):470-480.
26. Blier P, de Montigny C, Azzaro AJ. Modification of serotonergic and noradrenergic neurotransmissions by repeated administration of monoamine oxidase inhibitors: Electrophysiological studies in the rat central nervous system. *J Pharmacol and Exp Ther* 1986; 237(3):987-994.
27. Blier P, de Montigny C, Tardif D. Effects of the two antidepressant drugs mianserin and indalpine on the serotonergic system: Single-cell studies in the rat. *Psychopharmacology* 1984; 84(2):242-249.
28. Bloom F, Battenberg E, Rossier J, King N, Guillemin R. Neurons containing β -endorphin in rat brain exist separately from those containing enkefalin: immunocytochemical studies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75:1591-1595.
29. Boden PR, Woodruff GN, Pinnock RD. Pharmacology of a cholecystokinin receptor on 5-hydroxytryptamine neurones in the dorsal raphe of the rat brain. *British journal of pharmacology* 1991; Mar;102(3):635-638.
30. Boschmann M, Frenz U, Murphy CM, Noack R. Changes in energy metabolism and metabolite patterns of obese rats after application of dexfenfluramine. *Pharmacol Biochem Behav* 1996; 53(3):549-558.
31. Boulenguez P, Foreman N, Chauveau J, Segu L, Buhot MC. Distractibility and locomotor activity in rat following intra-collicular injection of a serotonin 1B-1D agonist. *Behav Brain Res* 1995; 67(2):229-239.
32. Buhot MC, Patra SK, Naili S. Spatial memory deficits following stimulation of hippocampal 5-HT_{1B} receptors in the rat. *Eur J Pharmacol* 1995; 285(3):221-228
33. Buisson B, Bertrand D. Chronic exposure to nicotine upregulates the human (alpha)4((beta)2 nicotinic acetylcholine receptor function. *J Neurosci* 2001; 21(6):1819-1829.

34. Burns CM, Chu Hsin, Rueter SM, Hutchinson LK, Canton H, Sanders-Bush E, Emeson RB. Regulation of serotonin-2C receptor G-protein coupling by RNA editing. *Nature* 1997; 387(6630):303-308.
35. Callaway CW, Lydic R, Baghdoyan HA, Hobson JA. Pontogeniculooccipital waves: Visual system activity during rapid eye movement sleep (Review). *Cell Mol Neurobiol* 1987; 7:145-159.
36. Carboni E, Acquas E, Frau R, Di Chiara G. Differential inhibitory effects of a 5-HT₃ receptor antagonist on drug-induced stimulation on drug-induced stimulation of dopamine release. *Eur J Pharmacol* 1989; 164:515-519.
37. Carli M, Luschi R, Garofalo P, Samanin R. 8-OH-DPAT impairs spatial but not visual learning in a water maze by stimulating 5-HT_{1A} receptors in the hippocampus. *Behav Brain Res* 1995; 67(1):67-74.
38. Changeux J, Galzi A, Devillers-Thiery A, Bertrand D. The functional architecture of the acetylcholine nicotine receptor explored by affinity labeling and site directed mutagenesis. *Quart Rev Biophys* 1992; 25:395
39. Chaput Y, de Montigny C, Blier P. Effects of a specific 5-HT reuptake blocker, citalopram, on the sensitivity of 5-HT autoreceptors, electrophysiological studies in the rat. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1986; 334:253-260.
40. Charara A, Parent A. Chemoarchitecture of the primate dorsal raphe nucleus. *J Chem Neuroanat* 1998; 15(2):111-127.
41. Cheeta S, Irvine EE, Kenny PJ, File SE. The dorsal raphe nucleus is a crucial structure mediating nicotine's anxiolytic effects and the development of tolerance and withdrawal responses. *Psychopharmacology (Berl)* 2001a; 155(1):78-85.
42. Cheeta S, Kenny PJ, File SE. Hippocampal and septal injections of nicotine and 8-OH-DPAT distinguish among different animal tests of anxiety. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2000; 24(7):1053-1067.
43. Cheeta S, Tucci S, File SE. Antagonism of the anxiolytic effect of nicotine in the dorsal raphe nucleus by dihydro-beta-erythroidine. *Pharmacol Biochem Behav* 2001b; 70(4):491-496.
44. Cheeta S, Tucci S, Sandhu J, Williams AR, Rupniak NM, File SE. Anxiolytic actions of the substance P (NK1) receptor antagonist L-760735 and the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT in the social interaction test in gerbils. *Brain Res* 2001; 915(2):170-175.
45. Cheng FC, Kuo JS. High performance liquid chromatograph analysis with electrochemical detection of biogenic amines using microbore columns. *J Chromatography B* 1995; 665:1-13.
46. Chini B, Clementi F, Hukovic N, Sher E. Neuronal-type alpha-bungarotoxin receptors and the alpha 5-nicotinic receptor subunit gene are expressed in neuronal and nonneuronal human cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; Mar 1;89(5):1572-1576.
47. Chronwell BM, Di Maggio DA, Massari VJ, Pickel, VM, Ruggiero DA, O'Donohue TL. The anatomy of neuropeptide-Y-containing neurons in rat brain. *Neuroscience* 1985; 15: 1154-1181.

48. Clarke PB, Fu DS, Jakubovic A, Fibiger HC. Evidence that mesolimbic dopaminergic activation underlies the locomotor stimulant action of nicotine in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 246(2):701-708.
49. Collins AC, Marks MJ. Are nicotinic receptors activated or inhibited following chronic nicotine treatment? *Drug Dev Res* 1996; 38:231-234.
50. Conroy WG, Berg DK. Neurons can maintain multiple classes of nicotinic acetylcholine receptors distinguished by different subunit compositions. *J Biol Chem* 1995; 270(9):4424-4431.
51. Crunelli V, Forda S, Brooks PA, Wilson KC, Wise JC, Kelly JS. Passive membrane properties of neurones in the dorsal raphe and periaqueductal grey recorded in vitro. *Neurosci Lett* 1983; 40(3):263-268.
52. Curzon G. Serotonin and appetite. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 600:521-530.
53. Dahlstrom A, Fuxe K. Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 1964; 20(7):398-399.
54. Datta S, Hobson JA. Suppression of ponto-geniculo-occipital waves by neurotoxic lesions of pontine caudo-lateral peribrachial cells. *Neuroscience* 1995; 67(3):703-712.
55. Datta S, Siwek DF, Patterson EH, Cipolloni PB. Localization of pontine PGO wave generation sites and their anatomical projections in the rat. *Synapse* 1998; 30(4):409-423.
56. Daubas P, Devillers-Thiery A, Geoffroy B, Martinez S, Bessis A, Changeux JP. Differential expression of the neuronal acetylcholine receptor alpha 2 subunit gene during chick brain development. *Neuron* 1990; 5(1):49-60.
57. Davidson C, Stamford JA. Evidence that 5-hydroxytryptamine release in rat dorsal raphe nucleus is controlled by 5-HT1A, 5-HT1B and 5-HT1D autoreceptors. *Br J Pharmacol* 1995; Mar;114(6):1107-1109.
58. De Deurwaerdere P, Stinus L, Spampinato U. Opposite change of in vivo dopamine release in the rat nucleus accumbens and striatum that follows electrical stimulation of dorsal raphe nucleus: role of 5-HT3 receptors. *J Neurosci* 1998; 18(16):6528-6538.
59. De Montigny C, Blier P, Caille G, Kouassi E. Pre- and postsynaptic effects of zimelidine and norzimelidine on the serotonergic system: single cell studies in the rat. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 1981; 290:79-90.
60. De Souza EB, Insel TR, Perrin MH, Rivier J, Vale WW, Kuhar MJ. Corticotropin-releasing factor receptors are widely distributed within the rat central nervous system: an autoradiographic study. *J Neurosci* 1985; 5: 3189-3203.
61. Deneris ES, Boulter J, Swanson LW, Patrick J, Heinemann S. Beta3: a new member of nicotinic acetylcholine receptor gene family is expressed in brain. *J Biol Chem* 1989; Apr 15;264(11):6268-6272.
62. Descarries L, Watkins K, Garcia KC, Beaudet A. The serotonin neurons in the nucleus raphe dorsalis of the adult rat. A light and electron microscope radioautographic study. *J Comp Neurol* 1982; 207:239-254.

63. Deutch AY, Holliday J, Roth RH, Chun LL, Hawrot E. Immunohistochemical localization of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor in mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84(23):8697-8701.
64. Dominiak P, Kees F, Grobecker H. Changes in peripheral and central catecholaminergic and serotonergic neurons of rats after acute and subacute administration of nicotine. *Klin Wochenschr* 1984; 62 Suppl 2:76-80.
65. Donzati BA, Yamamoto BK. An improved and rapid HPLC-EC method for the isocratic separation of amino acid neurotransmitters from brain tissue and microdialysis perfusates. *Life Sci* 1995; 43:913-922.
66. Eglen RM, Wong EH, Dumuis A, Bockaert J. Central 5-HT₄ receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1995; 16(11):391-398.
67. Elliott KJ, Ellis SB, Berckhan KJ, Urrutia A, Chavez-Noriega LE, Johnson EC, Velicelebi G, Harpold MM. Comparative structure of human neuronal alpha 2-alpha 7 and beta 2-beta 4 nicotinic acetylcholine receptor subunits and functional expression of the alpha 2, alpha 3, alpha 4, alpha 7, beta 2, and beta 4 subunits. *J Mol Neurosci* 1996; 7(3):217-228.
68. Engberg G, Erhardt S, Sharp T, Hajos M. Nicotine inhibits firing activity of dorsal raphe 5-HT neurones in vivo. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000; 362(1):41-45.
69. Ennis C, Minchin MC. Modulation of GABA_A-like autoreceptor by barbiturates but not by steroids. *Neuropharmacology* 1993; 32:355-357.
70. File SE, Kenny PJ, Ouagazzal AM. Bimodal modulation by nicotine of anxiety in the social interaction test: role of the dorsal hippocampus. *Behav Neurosci* 1998; 112(6):1423-1429.
71. Fitzgerald RE, Oettinger R, Battig K. Reduction of nicotine-induced hyperactivity by PCPA. *Pharmacol Biochem Behav* 1985; 23(2):279-284.
72. Foguet M, Hoyer D, Pardo LA, Parekh A, Kluxen FW, Kalkman HO, Stuhmer W, Lubbert H. Cloning and functional characterization of the rat stomach fundus serotonin receptor. *EMBO J* 1992; 11(9):3481-3487.
73. Fueri C, Faudon M, Hery M, Hery F. Release of serotonin from perikarya in cat nodose ganglia. *Brain Res* 1984; 304:173-177.
74. Gallager DW, Aghajanian GK. Effect of antipsychotic drugs on the firing of dorsal raphe cells II. Reversal by picrotoxin. *Eur J Pharmacol* 1976; 39(2):357-364.
75. Gallager DW. Benzodiazepines: potentiation of a GABA inhibitory response in the dorsal raphe nucleus. *Eur J Pharmacol* 1978; 49(2):133-143.
76. Gao B, Fritschy JM, Benke D, Mohler H. Neuron-specific expression of GABA_A-receptor subtypes: differential association of the alpha 1- and alpha 3-subunits with serotonergic and GABAergic neurons. *Neuroscience* 1993; 54(4):881-892.
77. Ge J, Barnes NM. 5-HT₄ receptor-mediated modulation of 5-HT release in the rat hippocampus in vivo. *Br J Pharmacol* 1996; 117(7):1475-1480.

78. Gervais J, Rouillard C. Dorsal raphe stimulation differentially modulates dopaminergic neurons in the ventral tegmental area and substantia nigra. *Synapse* 2000; 35(4):281-291.
79. Gervasoni D, Peyron C, Rampon C, Barbagli B, Chouvet G, Urbain N, Fort P, Luppi PH. Role and origin of the GABAergic innervation of dorsal raphe serotonergic neurons. *J Neurosci* 2000; 20(11):4217-4225.
80. Gervasoni D, Darracq L, Fort P, Soulière F, Chouvet G, Luppi PH. Electrophysiological evidence that noradrenergic neurons of the rat locus coeruleus are tonically inhibited by GABA during sleep. *Eur J Neurosci* 1998; Mar; 10(3):964-970.
81. Gotti C, Briscini L, Verderio C, Oortgiesen M, Balestra B, Clementi F. Native nicotinic acetylcholine receptors in human Imr32 neuroblastoma cells: functional, immunological and pharmacological properties. *Eur J Neurosci* 1995; 7(10):2083-2092.
82. Gotti C, Fornasari D, Clementi F. Human neuronal nicotinic receptors. *Prog Neurobiol* 1997; 53(2):199-237.
83. Greenberg ME, Ziff EB, Greene LA. Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science* 1986; 234(4772):80-83.
84. Grottick AJ, Corrigan WA, Higgins GA. Activation of 5-HT(2C) receptors reduces the locomotor and rewarding effects of nicotine. *Psychopharmacol (Berl)* 2001; 157(3):292-298.
85. Guzman-Marin R, Alam MN, Mihailescu S, Szymusiak R, McGinty D, Drucker-Colin R. Subcutaneous administration of nicotine changes dorsal raphe serotonergic neurons discharge rate during REM sleep. *Brain Res* 2001; 888(2):321-325.
86. Hammer VA, Gietzen DW, Beverly JL, Rogers QR. Serotonin3 receptor antagonists block anorectic responses to amino acid imbalance. *Am J Physiol* 1990; Sep; 259(3 Pt 2):R627-R636
87. Harandi M, Aguera M, Gamrani H, Didier M, Maitre M, Calas A, Belin MF. γ -aminobutyric acid and 5-hydroxytryptamine interrelationship in the rat nucleus raphe dorsalis: combination of radioautographic and immunohistochemical techniques at light and electron microscopic levels. *Neuroscience* 1987; 21:237-251.
88. Heishman SJ. What aspects of human performance are truly enhanced by nicotine? *Addiction* 1998; 93(3):317-320.
89. Heninger GR, Delgado PL, Charney DS. The revised monoamine theory of depression: a modulatory role for monoamines, based on new findings from monoamine depletion experiments in humans. *Pharmacopsychiatry* 1996; 29(1):2-11.
90. Henley K, Morrison AR. A re-evaluation of the effects of lesions of the pontine tegmentum and locus coeruleus on phenomena of paradoxical sleep in the cat. *Acta Neurobiol Exp (Warsz)* 1974; 34(2), 215-232.
91. Héry F, Faudon M, Fueri C. Release of serotonin in structures containing serotonergic nerve cell bodies: dorsalis raphe nucleus and nodose ganglia of the cat. *Ann NY Acad Sci* 1986; 473:239-255.

92. Hirano H, Day J, Fibiger HC. Serotonergic regulation of acetylcholine release in rat frontal cortex. *J Neurochem* 1995; 65(3):1139-1145.
93. Hjorth S, Magnusson T. The 5-HT 1A receptor agonist, 8-OH-DPAT, preferentially activates cell body 5-HT autoreceptors in rat brain in vivo. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1988; 338(5):463-471.
94. Honda T, Semba K. Serotonergic synaptic input to cholinergic neurons in the rat mesopontine tegmentum. *Brain Res* 1994; 647:299-306.
95. Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev* 1994, 46(2):157-203
96. Innis RB, Nestler EJ, Aghajanian GK. Evidence for G-protein mediation of serotonin -and GABA_B-induced hyperpolarization of rat dorsal raphe neurons. *Brain Res* 1988; 459:27-36.
97. Jacobs BL, Foote SL, Bloom FE. Differential projections of neurons within the dorsal raphe nucleus of the rat: a horseradish peroxidase (HRP) study. *Brain Res* 1978; 147(1):149-153.
98. Jacobs BL, Fornal CA. Activity of serotonergic neurons in behaving animals. *Neuropsychopharmacology* 1999; 21(2 Suppl):9S-15S.
99. Jacobs BL, Asher R, Dement WC. Electrophysiological and behavioral effects of electrical stimulation of the raphe nuclei in the cat. *Phys Behav* 1973; 11:489-495.
100. Jacobs BL, Azmitia CL. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiological Reviews* 1992; 72(1):165-229.
101. Jakala P, Sirvio J, Jolkkonen J, Riekkinen P Jr, Acsady L, Riekkinen P. The effects of p-chlorophenylalanine-induced serotonin synthesis inhibition and muscarinic blockade on the performance of rats in a 5-choice serial reaction time task. *Behav Brain Res* 1992; 51(1):29-40
102. Johnson MD. Electrophysiological and histochemical properties of postnatal rat serotonergic neurons in dissociated cell culture. *Neuroscience* 1994; 63(3):775-787.
103. Jolas T, Aghajanian GK. Neurotensin excitation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat in vitro. *Eur J Neurosci* 1996 8(1):153-161.
104. Jolas T, Haj-Dahmane S, Kidd EJ, Langlois X, Lanfumey L, Fattaccini CM, Vantalon V, Laporte AM, Adrien JM, Gozlan H, Hamon M. Central pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in rats treated chronically with a novel antidepressant, cericlamine. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 268:1432-1143.
105. Kalen P, Karlson M, Wiklund D. Possible excitatory aminoacid afferents to nucleus raphe dorsalis of the rat investigated with retrograde wheat germ agglutinin and D-[H³]aspartate tracing. *Brain Res* 1985; 360:285-297.
106. Kawai H, Berg DK. Nicotinic acetylcholine receptors containing alpha 7 subunits on rat cortical neurons do not undergo long-lasting inactivation even when up-regulated by chronic nicotine exposure. *J Neurochem* 2001; 78(6):1367-1378.

107. Kayama Y, Mamoru O, Jodo E. Firing of "possibly cholinergic" neurons in the rat LDT nucleus during sleep and wakefulness. *Brain Res* 1992; 569:210-220.
108. Kenny PJ, File SE, Neal MJ. Evidence for a complex influence of nicotinic acetylcholine receptors on hippocampal serotonin release. *J Neurochem* 2000; 75(6):2409-2414.
109. Khachaturian H, Lewiss ME, Watson SJ. Enkephalin systems in the diencephalon and brainstem of the rat. *J Comp Neurol* 1983; 220:310-320.
110. Kirby LG, Allen AR, Lucki I. Regional differences in the effects of forced swimming on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid. *Brain Res* 1995; 682(1-2):189-196.
111. Kirby LG, Pernar L, Valentino RJ, Beck SG. Distinguishing characteristics of serotonin and non-serotonin-containing cells in the dorsal raphe nucleus: electrophysiological and immunohistochemical studies. *Neurosci* 2003; 116:669-983
112. Kirby LG, Rice KC, Valentino RJ. Effects of corticotropin-releasing factor on neuronal activity in the serotonergic dorsal raphe nucleus. *Neuropsychopharmacology* 2000; 22(2):148-162.
113. Kohler C, Chan-Palay V, Haglund L, Steinbusch H. Immunohistochemical localization of serotonin nerve terminals in the lateral entorhinal cortex of the rat: demonstration of two separate patterns of innervation from the midbrain raphe. *Anat Embryol (Berl)* 1980; 160(2):121-129.
114. Kombian SB, Colmers WF. Neuropeptide Y selectively inhibits slow synaptic potentials in the rat dorsal raphe in vitro by a presynaptic action. *J Neurosci* 1992; 12(3):1086-1093.
115. Koyama Y, Jodo E, Kayama Y. 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* 1994; 63:1021-1031.
116. Kramer MS, Cutler N, Feighner J, Shrivastava R, Carman J, Sramek JJ, Reines SA, Liu G, Snavely D, Wyatt-Knowles E, Hale JJ, Mills SG, MacCoss M, Swain CJ, Harrison T, Hill RG, Hefti F, Scolnick EM, Cascieri MA, Chicchi GG, Sadowski S, Williams AR, Hewson L, Smith D, Rupniak NM. Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors. *Science* 1998; 281:1640-1645
117. Krieger DT. Brain peptides: what, where and why?. *Science* 1983; 222:975-984.
118. Ksir C, Hakan R, Hall DP Jr, Kellar KJ. Exposure to nicotine enhances the behavioral stimulant effect of nicotine and increases binding of [3H]acetylcholine to nicotinic receptors. *Neuropharmacology* 1985; 24(6):527-531.
119. Le Novere N, Changeux JP. Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *J Mol Evol* 1995; Feb;40(2):155-72
120. Le Poul E, Lima L, Laporte AM, Even C, Doucet E, Fattaccini CM, Laaris N, Hamon M, Lanfumey L. [Central serotonin receptors and chronic treatment

- with selective serotonin reuptake inhibitors in the rat: comparative effects of fluoxetine and paroxetine]. *L'Encephale* 1995; Mar-Apr ; 21(2) :123-132.
121. Leibowitz SF, Alexander JT. Hypothalamic serotonin in control of eating behavior, meal size, and body weight. *Biol Psychiatry* 1998; 44(9):851-864.
 122. Leibowitz SF, Weiss GF, Shor-Posner G. Hypothalamic serotonin: pharmacological, biochemical, and behavioral analyses of its feeding-suppressive action. *Clin Neuropharmacol* 1988; 11 Suppl 1:S51-S71.
 123. Lena C, Changeux JP, Mulle C. Evidence for "preterminal" nicotinic receptors on GABAergic axons in the rat interpeduncular nucleus. *J Neurosci* 1993; 13(6):2680-2688.
 124. Lendvai B, Sershen H, Lajtha A, Santha E, Baranyi M, Vizi ES. Differential mechanisms involved in the effect of nicotinic agonists DMPP and lobeline to release [³H]5-HT from rat hippocampal slices. *Neuropharmacology* 1996; 35(12):1769-1777.
 125. Leonard CS, Llinas R. Serotonergic and cholinergic inhibition of mesopontine cholinergic neurons controlling REM sleep: an *in vitro* electrophysiological study. *Neuroscience* 1994; 59(2):309-330.
 126. Leonard TO, Lydic R. Nitric oxide synthase inhibition decreases pontine acetylcholine release. *Neuroreport* 1995; 6(11):1525-1529
 127. Leonard CS, Llinas R. Serotonergic and cholinergic inhibition of mesopontine cholinergic neurons controlling REM sleep: an *in vitro* electrophysiological study. *Neuroscience* 1994; 59:309-330.
 128. Levine ES, Jacobs BL. Neurochemical afferents controlling the activity of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus: microiontophoretic studies in the awake cat. *J Neurosci* 1992; 12:4037-4044.
 129. Levitt P, Moore RY. Developmental organization of raphe serotonin neuron groups in the rat. *Anat Embryol (Berl)* 1978; 154(3):241-251.
 130. Li BH, Spector AC, Rowland NE. Reversal of dexfenfluramine-induced anorexia and c-Fos/c-Jun expression by lesion in the lateral parabrachial nucleus. *Brain Res* 1994; 640(1-2):255-267.
 131. Li YQ, Li H, Kaneko T, Mizuno N. Morphological features and electrophysiological properties of serotonergic and non-serotonergic projection neurons in the dorsal raphe nucleus. An intracellular recording and labeling study in rat brain slices. *Brain Res* 2001; May 4;900(1):110-118.
 132. Li X, Rainnie D, McCarley R, Greene R. Presynaptic nicotinic receptors facilitate monoaminergic transmission. *J Neurosci* 1998; 18 (5) 1904-1912.
 133. Lind RW. Bi-directional, chemically specified neural connections between the subfornical organ and the midbrain raphe system. *Brain Res* 1986; 384(2):250-261.
 134. Lindstrom J. Nicotinic acetylcholine receptors. En: North RA, editor. *Handbook of receptors and channels*. CRC Press, 1995:153-175.
 135. Ljungdahl A, Hokefelt T, Nilsson G. Distribution of substance P-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. I. Cell bodies and nerve terminals. *Neuroscience* 1978; 3: 861-943.

136. Lucki I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav Pharmacol* 1997; 8(6-7):523-532.
137. Lucki I. The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol Psychiatry* 1998; 44(3):151-162.
138. Luebke JL, Greene RW, Semba K, Kamondi A, McCarley RW, Reiner PB. Serotonin hyperpolarizes cholinergic low-threshold burst neurons in the rat LDT tegmental nucleus *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:743-747.
139. Lydic R, Baghdoyan HA. Pedunculopontine stimulation alters respiration and increases ACh release in the pontine reticular formation. *Am J Physiol* 1993; 264(3 Pt 2):R544-R554.
140. Lydic R, McCarley RW, Hobson JA. The time-course of dorsal raphe discharge, PGO waves and muscle tone averaged across multiple sleep cycles. *Brain Res* 1983; 274:365-370.
141. Ma QP, Yin GF, Ai MK, Han JS. Serotonergic projections from the nucleus raphe dorsalis to the amygdala in the rat. *Neurosci Lett* 1991; 134(1):21-24.
142. Maes M, Meltzer HY. The serotonin hypothesis of major depression. En: Bloom FE, Kupfer DJ, editores. *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. New York: Raven Press, 1995:933-944.
143. Mantyh PW, Hunt SP, Maggio SP. Substance P receptors: localization by light microscopic autoradiography and in rat brain using [³H] SP as the radioligand. *Brain Res* 1984; 307: 147-165.
144. Mantyh PW, Peschansky M. Spinal cord projections from the periaqueductal grey and dorsal raphe in rat, cat and monkey. *Neuroscience* 1982; 11: 2769-2776.
145. Marhawa J, Aghajanian GK. Relative potencies of alpha-1 and alpha-2 antagonists in the locus coeruleus, dorsal raphe and dorsal lateral geniculate nuclei: an electrophysiological study. *J Pharmacol Exp Ther* 1982; 222:287-293.
146. Maricq AV, Peterson AS, Brake AJ, Myers RM, Julius D. Primary structure and functional expression of the 5-HT₃ receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science* 1991; 254:432-437.
147. Marks MJ, Burch JB, Collins AC. Effects of chronic nicotine infusion on tolerance development and nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1983; 226(3):817-825.
148. Marks MJ, Pauly JR, Gross SD, Deneris ES, Hermans-Borgmeyer I, Heinemann SF, Collins AC. Nicotine binding and nicotine receptor subunit RNA after chronic nicotine treatment. *J Neurosci* 1992; 12:2765-2784.
149. Maudhuit C., Hamon, M., Adrien, J. Electrophysiological activity of raphe dorsalis neurons in a possible model of endogenous depression. *Neuro Report* 6:681-684.
150. Maudhuit C, Jolas T, Chastanet M, Hamon M, Adrien J. Reduced inhibitory potency of serotonin reuptake blockers on central serotonergic neurons in rats selectively deprived of rapid eye movement sleep. *Biological psychiatry* 1996; Nov 15, 40(10):1000-1007.

151. McCarley RW, Greene RW, Rainnie D, Portas CM. Brainstem neuromodulation and REM sleep. *Sem. neurosci* 1995; 7(5) 341-354.
152. McCarley RW, Nelson JP, Hobson JA. Ponto-geniculo-occipital (PGO) burst neurons: correlative evidence for neural generators of PGO waves. *Science* 1978; 201:269-272.
153. McGehee DS, Heath MJ, Gelber S, Devay P, Role LW. Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors. *Science* 1995; 269(5231):1692-1696.
154. McGehee DS, Role W. Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors. *Annu Rev Physiol* 1995; 57:521-546.
155. McGinty DJ, Harper RM. Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleep in cats. *Brain Res* 1976; 101(3):569-75.
156. McNicol M, Schulman H. Multiple Ca^{2+} signalling pathways converge on CaM kinase in PC12 cells. *FEBS Lett* 1992; 204:237.
157. Menkes DB, Baraban JM, Aghajanian GK. Prazosin selectively antagonizes neuronal responses mediated by α_1 -adrenoreceptors in brain. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol* 1981; 317:273-275.
158. Mihailescu S, Guzman-Marin R, Drucker-Colin R. Nicotine stimulation of dorsal raphe neurons: effects on laterodorsal and pedunculopontine neurons. *Eur Neuropsychopharmacol* 2001; 11(5):359-366.
159. Mitani A, Ito K, Hallanger AE, Wainer BH, Kataoka K, McCarley RW. Cholinergic projections from the laterodorsal and pedunculopontine tegmental nuclei to the pontine gigantocellular tegmental field in the cat. *Brain Res* 1988; 451(1-2):397-402.
160. Miyata G, Meguid MM, Fetissov SO, Torelli GF, Kim HJ. Nicotine's effect on hypothalamic neurotransmitters and appetite regulation. *Surgery* 1999; 126(2):255-263.
161. Molinari EJ, Delbono O, Messi ML, Renganathan M, Arneric SP, Sullivan JP, Gopalakrishnan M. Up-regulation of human α_7 nicotinic receptors by chronic treatment with activator and antagonist ligands. *Eur J Pharmacol* 1998; 347(1):131-139.
162. Monti JM, Monti D. Role of dorsal raphe nucleus serotonin 5-HT1A receptor in the regulation of REM sleep. *Life Sci* 2000; 66(21):1999-2012.
163. Morris BJ, Hicks AA, Wisden W, Darlison MG, Hunt SP, Barnard EA. Distinct regional expression of nicotinic acetylcholine receptor genes in chick brain. *Mol Brain Res* 1990; 7(4):305-315.
164. Mosko SS, Jacobs BL. Recording of dorsal raphe unit activity in vitro. *Neuroscience Letters* 1976; 2:195-200.
165. Mosko SS, Jacobs BL. Midbrain raphe neurons: spontaneous activity and response to light. *Physiol Behav* 1974; 13:589-593.
166. Moulik S, Speth RC, Turner BB, Rowe BP. Angiotensin II receptor subtype distribution in the rabbit brain. *Exp Brain Res* 2002; 142(2):275-283.
167. Munster G, Battig K. Nicotine-induced hypophagia and hypodipsia in deprived and in hypothalamically stimulated rats. *Psychopharmacol* 1975; 41(3): 211-217.

168. Nelson JP, McCarley RW, Hobson JA. REM sleep burst neurons, PGO waves and eye movement information. *J Neurophysiol* 1983; 50:784-797.
169. Nishikawa T, Scatton B. The inhibitory GABAergic influence on striatal serotonergic neurons depends upon the habenulo-raphé pathways. *Brain Res* 1984; Jun 18;304(1):157-161.
170. 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.
171. O'Hearn E, Molliver ME. Organization of raphe-cortical projections in rat: a quantitative retrograde study. *Brain Res Bull* 1984; 13(6):709-726.
172. Olausson P, Engel JA, Soderpalm B. Behavioral sensitization to nicotine is associated with behavioral disinhibition; counteraction by citalopram. *Psychopharmacology (Berl)* 1999; 142(2):111-119.
173. Panula P. Histamine in the nervous system. En: Panula P, Paivarinta H, Soynila S, editores. *Neurohistochemistry: Modern Methods and Applications*. New York: Liss, 1986:425-442.
174. Park MR, Gonzales-Vegas JA, Kitai ST. Serotonergic excitation from dorsal raphe stimulation recorded intracellularly from rat caudate-putamen. *Brain Res* 1982; 243(1):49-58.
175. Pauwels PJ. Diverse signalling by 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptors. *Biochem Pharmacol* 2000; Dec 15;60(12):1743-1750.
176. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic press, 1982.
177. Peng X, Gerzanich V, Anand R, Whiting PJ, Lindstrom J. Nicotine-induced increase in neuronal nicotinic receptors results from a decrease in the rate of receptor turnover. *Mol Pharmacol* 1994; 46(3):523-530.
178. Penington NJ, Reiffenstein RJ. Lack of effect of antagonists on serotonin-induced inhibition in rat hippocampus. *Can J Physiol Pharmacol* 1986; 64(11):1413-1418.
179. Penington NJ, Kelly JS, Fox AP. Whole cell recordings of inwardly rectifying K⁺ currents activated by 5-HT_{1A} receptors on dorsal raphe neurons of the adult rat. *J Physiol Lond* 1993; 469:387-406.
180. Petrov T, Jhamandas JH, Krukoff TL. Characterization of peptidergic efferents from the lateral parabrachial nucleus to identified neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *J Chem Neuroanat* 1992; 5(5):367-373.
181. Pineyro G, Blier P, Dennis T, de Montigny C. Desensitization of the neuronal 5-HT carrier following its long-term blockade. *J Neurosci* 1994; 14(5 pt.2):3036-3047.
182. Portas CM, Thakkar M, Rainnie D, McCarley RW. 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.
183. Price ML, Curtis AL, Kirby LG, Valentino RJ, Lucki I. Effects of corticotropin-releasing factor on brain serotonergic activity. *Neuropsychopharmacology* 1998; 18(6):492-502.

184. Pugh PC, Berg DK. Neuronal acetylcholine receptors that bind alpha-bungarotoxin mediate neurite retraction in a calcium-dependent manner. *J Neurosci* 1994; 14(2):889-896.
185. Ramirez MJ, Cenarruzabeitia E, Lasheras B, Del Rio J. Involvement of GABA systems in acetylcholine release induced by 5-HT sub(3) receptor blockade in slices from rat entorhinal cortex. *Brain Res* 1996; 712(2):274-280.
186. Reuben M, Clarke PB. Nicotine-evoked [3H]5-hydroxytryptamine release from rat striatal synaptosomes. *Neuropharmacology* 2000; 39(2):290-299.
187. Ribeiro EB, Bettiker RL, Bogdanov M, Wurtman RJ. Effects of systemic nicotine on serotonin release in rat brain. *Brain Res* 1993; 621:311-318.
188. Riekkinen M, Tolonen R, Riekkinen P Jr. Interaction between 5-HT1A and nicotinic cholinergic receptors in the regulation of water maze navigation behavior. *Brain Res* 1994 a; 649(1-2):174-180.
189. Riekkinen P Jr, Riekkinen M, Sirvio J, Riekkinen P. Effects of concurrent nicotinic antagonist and PCPA treatments on spatial and passive avoidance learning. *Brain Res* 1992; 575(2):247-250.
190. Riekkinen P Jr, Sirvio J, Riekkinen M. Serotonin depletion decreases the therapeutic effect of nicotine, but not THA in medial septal-lesioned rats. *Brain Res* 1994b; 662(1-2):95-102.
191. Romagnano MA, Joseph SA. Immunocytochemical localization of ACTH₁₋₃₉ in the brainstem of the rat. *Brain Res* 1983; 276:1-16.
192. Rongjian L, Jolas T, Aghajanian G. Serotonin 5-HT₂ receptors activate local GABA inhibitory inputs to serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus. *Brain Res* 2000; 873:34-45.
193. Sacaan AI, Dunlop JL, Lloyd GK. Pharmacological characterization of neuronal acetylcholine gated ion channel receptor-mediated hippocampal norepinephrine and striatal dopamine release from rat brain slices. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 274(1):224-230.
194. Sakai K, Crochet S. Serotonergic dorsal raphe neurons cease firing by disfacilitation during paradoxical sleep. *Neuroreport* 2000; 11(14):3237-3241.
195. Sakai K, Jouvet M. Brain-stem PGO-on cells projecting directly to the cat dorsal lateral geniculate nucleus. *Brain Res* 1980; 194:500-505.
196. Sakai K, Crochet S. Differentiation of presumed serotonergic dorsal raphe neurons in relation to behavior and wake-sleep states. *Neuroscience* 2001; 104:1141-1155.
197. Sakai K, Salvvert D, Touret M, Jouvet M. Afferent connections of the dorsal raphe nucleus in the cat as visualized by the horseradish peroxidase technique. *Brain Res* 1977; 137:11-35.
198. Salín-Pascual R, Drucker-Colín R. A novel effect of nicotine on mood and sleep in major depression. *Neuroreport* 1998; 9(1):57-60.
199. Salin-Pascual RJ, Moro-Lopez ML, Gonzalez-Sanchez H, Blanco-Centurion C. Changes in sleep after acute and repeated administration of nicotine in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 1999; 145(2):133-138.

200. Salin-Pascual RJ, Rosas M, Jimenez-Genchi A, Rivera-Meza BL, Delgado-Parra V. Antidepressant effect of transdermal nicotine patches in nonsmoking patients with major depression. *J Clin Psychiatry* 1996; 57(9):387-389.
201. Sanderson EM, Drasdo AL, McCrea K, Wonnacott S. Upregulation of nicotinic receptors following continuous infusion of nicotine is brain-region-specific. *Brain research* 1993; 23, 617(2):349-352.
202. Sanford LD, Ross RJ, Seggos AE, Morrison AR, Ball WA, Mann GL. Central administration of two 5-HT receptor agonists: effect on REM sleep initiation and PGO waves. *Pharmacol Biochem Behav* 1994; 49(1):93-100.
203. Santarelli L, Gobbi G, Debs PC, Sibille ET, Blier P, Hen R, Heath MJ. Genetic and pharmacological disruption of neurokinin 1 receptor function decreases anxiety-related behaviors and increases serotonergic function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(4):1912-1917.
204. Sargent PB. The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annu Rev Neurosci* 1993; 16:403-443.
205. Saudou F, Amara DA, Dierich A, LeMeur M, Ramboz S, Segu L, Buhot MC, Hen R. Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT1B receptor. *Science* 1994 ; 265(5180):1875-1878.
206. Schofield SPM, Everitt J. The organization of indoleamine neurons in the brain of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *J Comp Neurol* 1981; 197:369-383.
207. Schwartz RD, Kellar KJ. Nicotinic cholinergic receptor binding sites in the brain: regulation in vivo. *Science* 1983; 220(4593):214-216.
208. Schwartz RD, Lehmann J, Kellar KJ. Presynaptic nicotinic cholinergic receptors labeled by [³H]acetylcholine on catecholamine and serotonin axons in brain. *J Neurochem* 1984; May;42(5):1495-1498.
209. Segal M, Dudai Y, Amsterdam A. Distribution of an alpha-bungarotoxin-binding cholinergic nicotinic receptor in rat brain. *Brain Res* 1978; 148(1):105-119.
210. Seguela P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, Patrick JW. Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci* 1993; 13(2):596-604.
211. Seroogy K, Ceccatelli S, Schalling M, Hokfelt T, Frey P, Walsh J, Dockray G, Brown J, Buchan A, Goldstein M. A subpopulation of dopaminergic neurons in rat ventral mesencephalon contains both neurotensin and cholecystokinin. *Brain Res* 1988; 455(1):88-98.
212. Sheard MH, Zolovick A, Aghajanian GK. Raphe neurons, effect of tricyclic depressants drugs. *Brain Res* 1972; 43:690-694.
213. Simansky KJ. Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. *Behav Brain Res* 1996; 73(1-2):37-42.
214. Soliakov L, Wonnacott S. Voltage-sensitive Ca²⁺ channels involved in nicotinic receptor-mediated [³H]dopamine release from rat striatal synaptosomes. *J Neurochem* 1996; 67(1):163-170.

215. Son JH, Baker H, Park DH, Joh TH. Drastic and selective hyperinnervation of central serotonergic neurons in a lethal neurodevelopmental mouse mutant, Anorexia (anx). *Brain Res Mol Brain Res* 1994; 25(1-2):129-134.
216. Sprouse JS, Aghajanian GK. Electrophysiological response of 5-HT dorsal raphe neurons to 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B} agonistas. *Synapse* 1987; 1:3-9.
217. Staubli U, Xu FB. Effects of 5-HT₃ receptor antagonism on hippocampal theta rhythm, memory, and LTP induction in the freely moving rat. *J Neurosci* 1995; 15(3 Pt 2):2445-2452.
218. Stauderman KA, Mahaffy LS, Akong M, Velicelebi G, Chavez-Noriega LE, Crona JH, Johnson EC, Elliott KJ, Gillespie A, Reid RT, Adams P, Harpold MM, Corey-Naeve J. Characterization of human recombinant neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit combinations alpha2beta4, alpha3beta4 and alpha4beta4 stably expressed in HEK293 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 284(2):777-789.
219. Steinbusch HW, Nieuwenhuys R, Verhofstad AA, Van der Kooy D. The nucleus raphe dorsalis of the rat and its projection upon the caudatoputamen. A combined cytoarchitectonic, immunohistochemical and retrograde transport study. *J Physiol (Paris)* 1981; 77(2-3):157-174.
220. Steinbusch HW, van der Kooy D, Verhofstad AA, Pellegrino A. Serotonergic and non-serotonergic projections from the nucleus raphe dorsalis to the caudate-putamen complex in the rat, studied by a combined immunofluorescence and fluorescent retrograde axonal labeling technique. *Neurosci Lett* 1980; 19(2):137-142.
221. Steinfels GF, Heym J, Strecker RE, Jacobs BL. Raphe unit activity in freely moving cats is altered by manipulations of central but not peripheral motor systems. *Brain Res* 1983; 279(1-2):77-84.
222. Steininger TL, Wainer BH, Blakely RD, Rye DB. Serotonergic dorsal raphe nucleus projections to the cholinergic and non-cholinergic neurons of the pedunculopontine tegmental region: a light and electron microscopic anterograde tracing and immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 1997; 382:302-322.
223. Stratford TR, Wirtshafter D. Ascending dopaminergic projections from the dorsal raphe nucleus in the rat. *Brain Res* 1990; 511(1):173-176.
224. Summers KL, 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.
225. Takada Y, Urano T, Ihara H, Takada A. Changes in the central and peripheral serotonergic system in rats exposed to water-immersion restrained stress and nicotine administration. *Neurosci Res* 1995; 23(3):305-311.
226. 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; 119:1375-1384.
227. Taylor P. Agents acting at the neuromuscular junction and autonomic ganglia. En: Goodman GA, Rall TW, Nies AS, Taylor P, editores. Goodman

- and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York: Pergamon Press, 1990: 166-186.
228. Thakkar M, Strecker E, McCarley RW. Behavioral state control through differential serotonergic inhibition in the mesopontine cholinergic nuclei: a simultaneous unit recording and microdialysis study. *J Neurosci* 1998; 18:5490-5497.
 229. Thibault L. Dietary carbohydrates: effects on self-selection, plasma glucose and insulin, and brain indoleaminergic systems in rat. *Appetite* 1994; 23(3):275-286.
 230. Toth E, Sehresen H, Hasim A, Vizi ES, Laith A. Effect of nicotine on extracellular levels of neurotransmitters assessed by microdialysis in various brain regions: role of glutamic acid. *Neurochem Res* 1992; 17:265-271.
 231. Trulson ME, Jacobs BL, Morrison AR. Raphe unit activity during REM sleep in normal cats and in pontine lesioned cats displaying REM sleep without atonia. *Brain Res* 1981; 226(1-2):75-91.
 232. Trulson ME, Jacobs BL. Raphe unit activity in freely moving cats: correlation with level of behavioral arousal. *Brain Res* 1979; 163:135-150.
 233. Vanderhaeghen JJ, Lotstra F, De Mey J, Gilles C. Immunohistochemical localization of cholecystokinin and gastrin-like peptides in the brain and hypofysis of the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77:1190-1194.
 234. Vandermaelen CP, Aghajanian GK. Electrophysiological and pharmacological characterization of serotonergic dorsal raphe neurons recorded extracellularly and intracellularly in rat brain slices. *Brain Res* 1983; 289:109-119.
 235. Vazquez J, Guzman-Marin R, Salin-Pascual RJ, Drucker-Colin R. Transdermal nicotine on sleep and PGO spikes. *Brain Res* 1996; 737(1-2):317-320.
 236. Velazquez-Moctezuma J, Shalauta MD, Gillin JC, Shiromani PJ. Microinjections of nicotine in the medial pontine reticular formation elicits REM sleep. *Neurosci Lett* 1990; 115(2-3):265-268.
 237. Vickers SP, Clifton PG, Dourish CT, Tecott LH. Reduced satiating effect of d-fenfluramine in serotonin 5-HT(2C) receptor mutant mice. *Psychopharmacology (Berl)* 1999; 143(3):309-314.
 238. Vizi ES, Lendvai B. Modulatory role of presynaptic nicotinic receptors in synaptic and non-synaptic chemical communication in the central nervous system. *Brain Res Rev* 1999; 30(3):219-235.
 239. Wada E, Wada K, Boulter J, Deneris E, Heinemann S, Patrick J, Swanson LW. Distribution of alpha 2, alpha 3, alpha 4, and beta 2 neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in the rat. *J Comp Neurol* 1989; 284(2):314-335.
 240. Wallace JA, Lauder JM. Development of the serotonergic system in the rat embryo: an immunohistochemical study. *Brain Res Bull* 1983; 10:459-479.
 241. Wang RY, Aghajanian GK. Inhibition of neurons in the amygdala by dorsal raphe stimulation: mediation through a direct serotonergic pathway. *Brain Res* 1977; 120(1):85-102.

242. Wang RY, Aghajanian GK. Antidromically identified serotonergic neurons in the rat midbrain raphe: evidence for collateral inhibition. *Brain Res* 1977; 132:186-193.
243. Warburton DM, Wesnes K, Shergold K, James M. Facilitation of learning and state dependency with nicotine. *Psychopharmacology (Berl)* 1986; 89(1):55-59.
244. Watson M, Roeske WR, Yamura IH. En: Meltzer H, editor. *Psychopharmacology: The Third Generation of Progress*. New York:Raven Press, 1987:241.
245. Weiss GF, Rogacki N, Fueg A, Buchen D, Suh JS, Wong DT, Leibowitz SF. Effect of hypothalamic and peripheral fluoxetine injection on natural patterns of macronutrient intake in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 1991; 105(4):467-476.
246. Westfall TC, Grant H, Naes L, Meldrum M. The effect of opioid drugs on the release of dopamine and 5 hydroxytryptamine from rat striatum following activation of of nicotinic-cholinergic receptors. *Eur J Pharmacol* 1983; 92:35-42.
247. Whiteaker P, Sharples CG, Wonnacott S. Agonist-induced up-regulation of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors in M10 cells: pharmacological and spatial definition. *Mol Pharmacol* 1998; 53(5):950-962.
248. Whiting P, Esch F, Shimasaki S, Lindstrom J. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor β -subunit is coded for by cDNA for α 4. *FEBS Lett* 1987; 219:459-463.
249. Williams JT, Colmers WF, Pan ZZ. Voltage- and ligand-activated inwardly rectifying currents in dorsal raphe neurons in vitro. *J Neurosci* 1988; 8:3499-3506.
250. Wong EH, Reynolds GP, Bonhaus DW, Hsu S, Eglén RM. Characterization of [3H]GR 113808 binding to 5-HT₄ receptors in brain tissues from patients with neurodegenerative disorders. *Behav Brain Res* 1996; 73(1-2):249-252.
251. Wonnacott S. Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci* 1997; 20(2):92-98.
252. Woolf NJ, Butcher LL. Cholinergic systems in the rat brain: IV. Descending projections of the pontomesencephalic tegmentum. *Brain Res Bull* 1989; 23(6):519-540.
253. Wurtman RJ, Wurtman JJ. Brain serotonin, carbohydrate-craving, obesity and depression. *Obes Res* 1995; 3 Suppl 4:477S-480S.
254. Yang X, Criswell HE, Breese GR. Nicotine-induced inhibition of medial septum involves activation of presynaptic nicotinic cholinergic receptors on aminobutyric acid-containing neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 276:482-489.
255. Yang ZJ, Meguid MM, Oler A, Miyata G. Infusion of nicotine into LHA enhances dopamine and 5-HT release and suppresses food intake. *Pharmacol Biochem Behav* 1999; 64(1):155-159.

256. Yu ZJ, Wecker L. Chronic nicotine administration differentially affects neurotransmitter release from rat striatal slices. *J Neurochem* 1994; 63(1):186-194.