



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**IDENTIFICACIÓN DE RECEPTORES NICOTÍNICOS FUNCIONALES EN  
NEURONAS DEL NÚCLEO DORSAL DEL RAFÉ**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**Doc. en Ciencias Biomedicas**

PRESENTA:

**GALINDO CHARLES LUIS MANUEL**

ASESOR: Stefan Mihailescu

MÉXICO, D. F.

2011



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.

IDENTIFICACIÓN DE RECEPTORES  
NICOTÍNICOS FUNCIONALES EN NEURONAS  
DEL NÚCLEO DORSAL DEL RAFÉ

El presente trabajo se desarrolló en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Stefan Mihailescu y con el respaldo económico de la beca de CONACYT número 153212.

## **Agradecimientos**

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Stefan Mihailescu por todo el apoyo otorgado en la realización de este proyecto.

De igual manera, agradezco a los doctores Marcia Hiriart, José Bargas y Salvador Hernández sus considerables aportaciones al ser miembros del Comité Tutorial.

Y a los investigadores miembros del Jurado:

Dra. Rosalinda Guevara  
Dr. Stefan Mihailescu  
Dr. Roberto Prado  
Dr. Rafael Salín Pascual  
Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina

Quienes con sus comentarios y sugerencias mejoraron este trabajo.

## **Dedicatoria**

El presente trabajo está dedicado a mis padres y a mi hermano porque en la unión que representan siempre he encontrado mis más grandes valores.

A tí, Miriam, por ser mi motivación más grande y estar en todos los momentos.

Al Dr. Salvador Hernández por ofrecer siempre su ayuda desinteresada y motivar el desarrollo intelectual.

A la Dra. Elvira Galarraga y al Dr. José Bargas por permitir mi desarrollo académico y el verdadero conocimiento de la disciplina científica.

A todos los amigos de los laboratorios donde he laborado en algún momento de mi vida.  
A todos ustedes, compañeros cotidianos, les comparto este logro mío y suyo.

# Índice

Resumen.....	5
Abreviaturas.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
1. El núcleo dorsal del rafé	
1.1 Anatomía del núcleo dorsal del rafé.....	7
1.2 Aferencias del NDR .....	8
1.3. Eferencias del NDR.....	10
1.3.1 El fascículo ascendente dorsal.....	11
1.3.2 El fascículo ascendente medial .....	11
1.3.3 El fascículo ascendente ventral.....	11
2. Las neuronas 5-HT del NDR y sus propiedades	
2.1 Características morfológicas de las células 5-HT del NDR.....	12
2.2 Propiedades electrofisiológicas de las células 5-HT del NDR.....	12
2.3 Propiedades farmacológicas de las neuronas 5-HT.....	13
3. La nicotina	
3.1 Breve reseña y perfil químico.....	14
3.2 Efectos sistémicos de la nicotina.....	15
4. Los receptores nicotínicos para acetilcolina	
4.1 Estructura.....	16
4.2 Distribución.....	17
4.3 Funciones de los nAChRs.....	18
4.4 Papel de los nAChRs en funciones cerebrales complejas y en varias patologías.....	19
4.5 Farmacología de los receptores nicotínicos. Agonistas y antagonistas.....	20
4.5.1 Agonistas nicotínicos.....	20
4.5.2 Antagonistas nicotínicos.....	23
5. La nicotina y el núcleo dorsal del rafé	
5.1 Receptores nicotínicos en el NDR.....	24
5.2 Efectos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	25
HIPÓTESIS.....	27
OBJETIVOS.....	27
MÉTODO.....	28
RESULTADOS.....	32
DISCUSIÓN.....	50
REFERENCIAS.....	53

## RESUMEN

En el telencéfalo, se ha demostrado que muy pocas neuronas expresan receptores colinérgicos nicotínicos postsinápticos funcionales (nAChRs). Entre estas, se encuentran las neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas. Sin embargo, no existencia evidencia de la expresión de nAChRs en células serotoninérgicas.

En este estudio, nos preguntamos si los nAChRs funcionales están presentes en las neuronas serotoninérgicas (5-HT) y no-serotoninérgicas (no 5-HT) del núcleo dorsal del rafe (NDR). En rebanadas de mesencéfalo de rata, la estimulación eléctrica directa del núcleo pedunculopontino tegmental (PPT) produjo corrientes postsinápticas evocadas (eEPSCs) con diferentes componentes en las neuronas del NDR. Después del bloqueo de los componentes glutamatérgico y GABAérgico, las eEPSCs remanentes fueron bloqueadas por mecamilamina (MEC) y reducidas por el antagonista específico de la subunidad alfa 7 de los nAChRs metilicaconitina o el antagonista específico de la subunidades alfa 4 beta 2 de los nAChRs dihidrobetaeritroidina (DH $\beta$ E). La adición simultánea de metilicaconitina y dihidrobetaeritroidina bloqueó todas las eEPSCs. La integridad de la vía PPT-NDR se estudió con la técnica de marcado de biocitina anterógrada y también con la estimulación eléctrica antidrómica desde el NDR. Las corrientes entrantes evocadas por la aplicación directa de acetilcolina (ACh) en presencia de atropina y tetrodotoxina, consistieron en dos corrientes cinéticamente diferentes. Una fue bloqueada con metilicaconitina y la otra con dihidrobetaeritroidina tanto en células 5-HT como en células no 5-HT del NDR. El análisis de los eventos sinápticos espontáneos (sEPSCs) y evocados (eEPSCs) llevó a la conclusión de que los nAChRs funcionales se encuentran localizadas en la membrana postsináptica. Se discuten, también, las posibles implicaciones de estos novedosamente descritos nAChRs y su papel en varios procesos fisiológicos y eventos conductuales como el ciclo sueño-vigilia.



## Abreviaturas

- 5-HT** - 5-Hidroxitriptamina (Serotonina)  
**ACh** - Acetilcolina  
**ACTH** - Hormona adrenocorticotrópica del inglés (Adenocorticotropin Hormone)  
**AP** - Potencial de acción (del inglés Action Potential)  
**CCK** – Colecistocinina (del inglés Colecystokinin).  
**CRF** - Factor liberador de corticotropina (del inglés Corticotropin Releasing Factor)  
**DA** - Dopamina  
**ePSCs** - Corrientes post-sinápticas evocadas (del inglés evoked Post-Synaptic Currents)  
**EPSCs** - Corrientes post-sinápticas excitadoras (del inglés Excitatory Post-Synaptic Currents)  
**Glu** - Glutamato  
**HRP** - Peroxidasa de rábano (del inglés Horseradish Peroxidase)  
**LDT** - Núcleo laterodorsal tegmental (del inglés Laterodorsal Tegmental Nucleus)  
**nAChRs** - Receptores colinérgicos nicotínicos (del inglés nicotinic Acetylcholine Receptors)  
**NCP** - Núcleo caudado putamen  
**NDR** - Núcleo dorsal del rafé  
**NMR** - Núcleo mediano del rafé  
**PPH** - Post-potencial hiperpolarizante  
**PPT** - Núcleo pedúnculo pontino tegmental (del inglés Pedunculopontine tegmental Nucleus)  
**SN** - Substantia Nigra  
**SNC** - Sistema Nervioso Central  
**sPSCs** - Corrientes post-sinápticas espontáneas (del inglés spontaneous Post-Synaptic Currents)  
**STD** - Depresión a corto plazo (del inglés Short Term Depresión)

# I. INTRODUCCIÓN

## 1. El núcleo dorsal del rafé

### 1.1 Anatomía del núcleo dorsal del rafé.

El núcleo dorsal del rafé (NDR) se encuentra localizado bilateralmente sobre la línea media a nivel del tallo cerebral, justo en el límite entre el puente y el mesencéfalo; ventral al acueducto cerebral y dorsal al fascículo longitudinal medial (Paxinos y Watson, 1982). Se ha estimado que el NDR del humano tiene en promedio 235 mil neuronas de las cuales, aproximadamente 165 mil contienen serotonina (Baker y cols., 1990).

En la mayoría de las especies, el NDR se puede dividir en 5 subregiones: interfascicular, ventral, ventrolateral, dorsal y caudal (Baker y cols., 1990). Cada una de estas subregiones recibe aferencias selectivas o compartidas y, de igual manera, da origen a fibras eferentes.

En 1964, Dahlström y Fuxe, utilizando la técnica de histofluorescencia Falck-Hillarp (fluorescencia inducida por formaldehído), observaron que la mayor parte de los somas de células serotoninérgicas (5-HT) se encuentran ubicados en un cúmulo de grupos a lo largo de la línea media del tallo cerebral. Identificaron nueve grupos de neuronas 5-HT y los denominaron B1 a B9 (Fig. 1). El grupo B7, que corresponde al NDR, contiene el mayor número de células 5-HT. Posteriormente, se ha estimado que la prevalencia de las células 5-HT en el NDR es del 30-60% (Glazer y cols., 1981; Descarries y cols., 1982; Jacobs y Azmitia, 1992; Baumgarten y Grozdanovic, 1997). También se determinó que los grupos B6, B9 y B8, contienen un gran número de células serotoninérgicas (Jacobs y Azmitia, 1992; Glazer y cols., 1981; Descarries y cols., 1982).

Por otro lado, las neuronas no 5-HT del NDR sintetizan una gran variedad de neurotransmisores y péptidos neuromoduladores, que incluyen norepinefrina, glutamato, GABA, dopamina, encefalina, neuropéptido Y, sustancia P, hormona liberadora de tirotropina, galanina, entre otros (Köhler y Steinbusch, 1982; Jacobs y Azmitia, 1992).

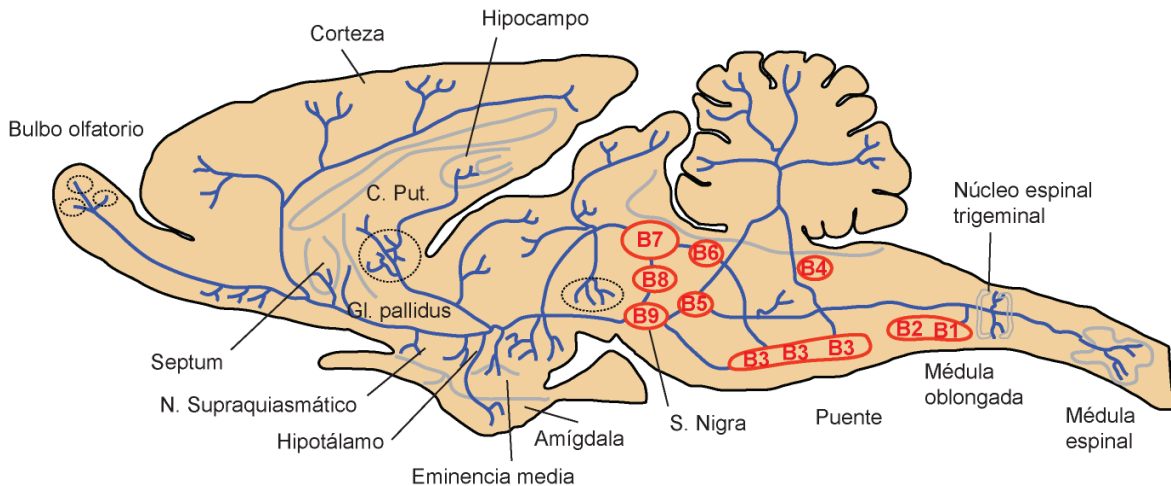


Figura 1. Esquema que muestra la localización neuroanatómica de los núcleos serotoninérgicos del rafe. Modificado de Consolazione y cols., 1982.

## 1.2 Aferencias del NDR

La aferencia más abundante que recibe el NDR proviene de los otros núcleos del rafe, específicamente del núcleo mediano, núcleo magno y neuronas ventrolaterales (Aghajanian y Wang, 1977; Kalén y cols., 1988). Existen además diferentes entradas que pueden ser clasificadas de acuerdo al neurotransmisor liberado (Tabla 1). Las fibras que surgen del PPT y del LDT son de naturaleza colinérgica (Woolf y Butcher, 1989). La corteza prefrontal cerebral proyecta fibras que liberan glutamato en el NDR (Aghajanian y Wang, 1977). El locus coeruleus es el origen de fibras noradrenérgicas que hacen sinapsis en el NDR (Swanson y Hartman, 1975, Lindvall y Bjorklund, 1974). La epinefrina es secretada por fibras provenientes del núcleo del tracto solitario (Aghajanian y Wang, 1977), así como del núcleo hipogloso (Sakai y cols., 1977) y el núcleo perihipogloso (Kalén y cols., 1985). Las aferencias dopaminérgicas se originan en el área ventral tegmental (Kalén y cols., 1988) y la sustancia nigra (Moore y Bloom, 1978). La entrada proveniente de la sustancia gris periacueductal provee varios neuropéptidos y galanina (Krieger, 1983 y Skofitsch y Jacobowitz, 1985).

Desde el hipotálamo, surgen fibras del área preóptica medial y el núcleo arqueado (Sakai y cols., 1977). Los núcleos hipotalámicos lateral y dorsomedial (Kalén y cols., 1985) son el origen de neuronas que sintetizan neuropéptidos (Krieger, 1983) e histamina (Hakanson y cols., 1986; Steinbusch y cols., 1986).

La región de la habénula lateral provee fibras con aminoácidos excitatorios tanto al NDR como al NMR y se ha observado que existe una interacción entre las interneuronas GABAérgicas y estas terminales cuando hacen contacto con células 5-HT del NDR (Kalén y cols., 1989).

Además, se ha establecido la existencia de aferencias peptidérgicas y hormonales en el NDR. Estas terminales liberan opioides (Atweh y Kuhar, 1977), sustancia P (Ljungdahl,

1977), angiotensina II (Jennes, 1982), somatostatina (Finley y cols., 1981), colecistocinina (Vanderhaeghen y cols., 1980) y neuropéptido Y (Kombian y Colmers, 1992).

Al interior del NDR se han identificado fibras que contienen sustancias relacionadas al eje hipotálamo – hipófisis – corticosuprarrenal, como el factor liberador de corticotropina (CRF) (De Souza y cols., 1985). De igual manera, se ha reportado una reacción para fibras que contienen la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) (Szafarczyk y cols., 1980).

**Tabla 1.**  
**Aferencias del núcleo dorsal del rafé.**

<b>Orígen</b>	<b>Neurotransmisor</b>	<b>Referencia</b>
Núcleo mediano, núcleo magno, núcleo paragigantocelular del rafé	5-HT	Aghajanian y Wang, 1977; Kalén y cols., 1985
Hipotálamo lateral, área lateral preóptica, substantia nigra reticulata, formación reticular pontina, habénula lateral.	GABA	Gervasoni y cols., 2000; Wang y cols., 1976
Núcleo vestibular superior, núcleo pedunculopontino, núcleo laterodorsal tegmental	ACh	Kalén y cols., 1985; Woolf y Butcher, 1989
Banda diagonal de Broca, stria terminalis	ACh	Aghajanian y Wang, 1977; Kalén y cols., 1985
Corteza prefrontal, habénula lateral	Glu	Aghajanian y Wang, 1977; Kalén y cols., 1985
Locus coeruleus y subcoeruleus, núcleo del tracto solitario, núcleo hipogloso y núcleo perihipogloso	NE	Aghajanian y Wang, 1977; Sakai y cols., 1977
Substantia nigra y área ventral tegmental	DA	Moore y Bloom, 1978
Área gris periacueductal ventral y ventrolateral	Neuropéptidos, glicina	Krieger, 1983; Rampon y cols., 1999
Área preóptica medial, hipotálamo lateral, hipotálamo dorsomedial y núcleo arqueado	Neuropéptidos, Histamina	Steinbusch y cols., 1986; Wilcox y Seybold, 1982; Sakai y cols., 1977
Núcleo central de la amígdala	Factor liberador de corticotropina	Sakanaka y cols., 1987; De Souza y cols., 1985
Núcleo interpeduncular, núcleo parabraquial, zona gris periacueductal	Encefalina	Kachaturian, 1983
Habénula medial, septum medial, núcleo del tracto solitario	Substancia P	Mantyh y cols., 1984; Ljungdahl, 1977
Zona gris periacueductal	Galanina	Skofitsch y Jacobowitz, 1985
Núcleo hipotalámico dorsomedial	Angiotensina II	Fuxe y cols., 1976
Núcleo del tracto solitario, núcleo	Neurotensina	Jennes y cols., 1982

parabraquial		
Núcleo olfatorio anterior, núcleo del lemnisco lateral, zona gris periacueductal	Somatostatina	Finley y cols., 1982
Núcleo olfatorio, área preóptica medial, núcleo hipotalámico lateral	CCK	Vanderhaeghen y cols., 1980
Núcleo parabraquial, colículo superior	Opioides	Atweh y Kuhar, 1977
Núcleos hipotalámicos paraventricular y arqueado	Neuropéptido Y	Kombian y Colmers, 1992

### 1.3. Eferencias del NDR

Los estudios anatómicos sobre el NDR sugieren la existencia de una organización topográfica en el plano rostro-caudal. Mas precisamente, las neuronas 5-HT localizadas rostralmente proyectan hacia los núcleos caudado y putamen, substantia nigra, y las regiones neocorticales, mientras que las neuronas 5-HT ubicadas caudalmente proyectan hacia el septo, hipocampo y corteza entorinal. Las neuronas 5-HT que proyectan hacia el caudado-putamen no proyectan hacia el hipocampo y viceversa. Estas observaciones anatómicas sugieren la existencia de subpoblaciones de neuronas 5-HT organizadas topográficamente que poseen propiedades funcionales distintas y modulan sistemas cerebrales específicos (Jacobs y Azmitia, 1992).

Las ramas de una sola neurona 5-HT ascendente pueden proyectar a miles de neuronas blanco en la corteza cerebral, el hipocampo, septum, globo pálido, neocortical, etc. De esta manera, el neuropilo de una neurona serotoninérgica cubre una gran área de inervación. Esto explica porque el sistema serotoninérgico tiene una participación reguladora en muchos procesos fisiológicos como la actividad locomotora, el ciclo sueño-vigilia, nocicepción, comportamiento sexual, ingesta alimentaria, función neuroendócrina, ritmicidad circadiana, agresión; y también, en distintas alteraciones mentales como la depresión, la ansiedad, demencia, esquizofrenia, entre otras (Jacobs y Azmitia, 1992).

De acuerdo al sitio de proyección de sus eferencias, los núcleos del rafé se han dividido en dos grupos: el llamado **grupo superior**; que inerva desde el tallo cerebral hasta el prosencéfalo y el diencefalo, y comprende al núcleo lineal caudal, el núcleo mediano del rafé, el núcleo dorsal del rafé y un cúmulo de neuronas laterales ubicado dorsalmente al lemnisco medio. El **grupo inferior** del rafé incluye los núcleos oscuro, pálido, magno así como neuronas ventrolaterales de la médula oblongada, las cuales envían proyecciones hacia la médula espinal.

El NDR envía sus proyecciones a través de varios fascículos ascendentes y descendentes, los cuales, en su mayor parte, contienen también fibras provenientes de otros núcleos del rafé. Existen tres fascículos ascendentes: dorsal, medial y ventral (Fig.2). Los fascículos ascendentes dorsal y ventral son los más importantes y dan la innervación del caudado-

putamen. Existen cuatro fascículos descendentes: bulbo-espinal, cerebelar, propiobulbar y el fascículo que da la innervación serotoninérgica del locus coeruleus, núcleo dorsal tegmental y del rafe pontino. Los fascículos descendentes dan la innervación del cerebelo, del tallo cerebral y de la médula espinal.

### 1.3.1 El fascículo ascendente dorsal

Proviene de la parte medial y rostral del NDR y da la innervación 5-HT del estriado y del globo pálido. El estriado es la principal estructura innervada por el NDR: aproximadamente un tercio de todas las eferencias 5-HT son destinadas al caudado-putamen (NCP). Se ha demostrado que 80-90% de las neuronas 5-HT que pertenecen al grupo ubicado en la región dorsomedial del NDR proyectan al NCP (Steinbusch y cols., 1980). El 20% de las proyecciones del NDR hacia el NCP son no-5-HT. El núcleo accumbens y el globo pálido reciben también una densa innervación 5-HT (Van Bockstaele y cols., 1993; Brown and Molliver, 2000, Steinbusch y cols., 1980).

### 1.3.2 El fascículo ascendente medial

La principal estructura innervada por el fascículo medial ascendente es la sustantia nigra (SN). Las proyecciones hacia la SN se originan en el NDR rostral (Imai y cols., 1986) y se dirigen hacia la pars compacta (Miller y cols., 1975). En una menor proporción, el fascículo medial ascendente inerva también el NCP.

### 1.3.3 El fascículo ascendente ventral

Brinda la innervación 5-HT de varias estructuras: tálamo, hipotálamo, habénula, septum, amígdala, corteza, bulbo olfativo, hipocampo, núcleo interpeduncular y cuerpos geniculados.

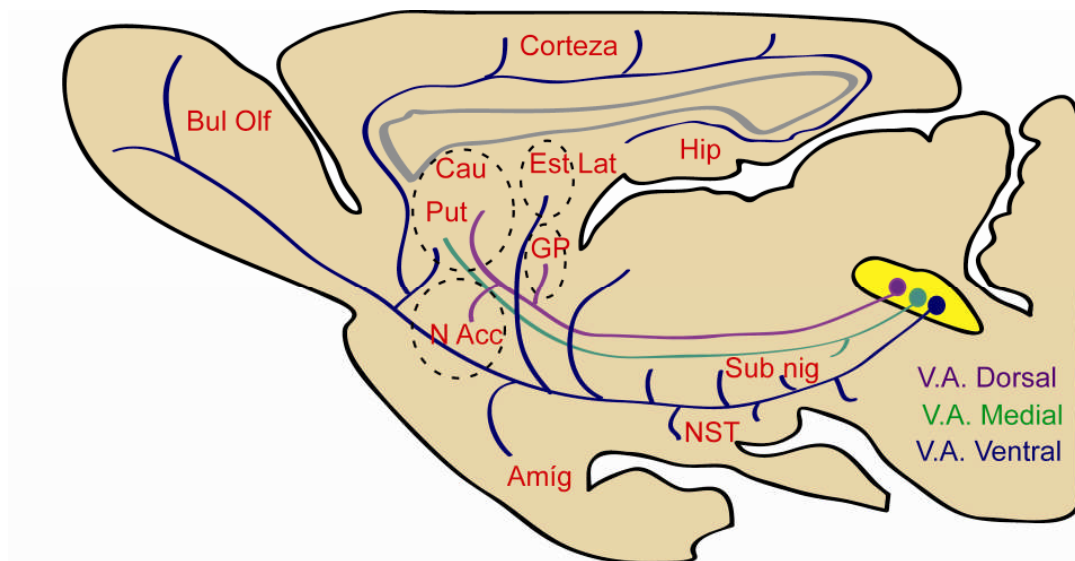


Figura 2. Los tres fascículos ascendentes del NDR de la rata (dorsal, medial y ventral) y sus principales sitios de proyección (modificado de Michelsen y cols., 2007).

## **2. Las neuronas 5-HT del NDR y sus propiedades**

### **2.1 Características morfológicas de las células 5-HT del NDR**

El número de células serotoninérgicas (5-HT) en el NDR de la rata es aproximadamente de 11,500, las cuales representan un tercio del total de células en el NDR. Se encuentran junto a los oligodendrocitos (Azmitia y Segal, 1978) y frecuentemente están cercanas a las células endoteliales (Descarries y cols., 1982).

Los somas de las células 5-HT del NDR de rata son de tamaño medio 15 – 35  $\mu\text{m}$  de diámetro y morfológicamente son redondeados, fusiformes, bipolares y multipolares (Glazer y cols., 1981). Las dendritas primarias son 4 a 7 y muestran un patrón de arborización escaso. Los campos dendríticos tienen una forma oval o triangular y poseen un diámetro máximo de 200 a 750  $\mu\text{m}$ , existen espinas dendríticas que incrementan su número en las dendritas distales.

Las células no 5-HT del NDR no presentan espinas dendríticas (Li y cols., 2001) y tienen un diámetro somático menor (10 – 15  $\mu\text{m}$ ) que las neuronas no 5-HT.

### **2.2 Propiedades electrofisiológicas de las células 5-HT del NDR**

Los registros obtenidos por Aghajanian y cols. (1968) en el NDR de ratas anestesiadas, identifican un patrón de disparo neuronal regular y lento (1-2 espigas/s) de las neuronas presuntamente 5-HT. De igual forma, Mosko y Jacobs (1976), en rebanadas de cerebro, demostraron que una población celular del NDR descarga con frecuencias de 0.8 – 2.5 Hz.

Aghajanian y Vandermaelen (1983), utilizando la técnica de registro electrofisiológico intracelular *in vivo*, describieron que las neuronas que contienen 5-HT tienen un patrón de disparo regular y lento de 1-2 espigas por segundo, un postpotencial hiperpolarizante (PPH) de gran amplitud, despolarización gradual interespigas y un potencial de acción de larga duración con una inflexión en la fase descendente. Estudios posteriores (Vandermaelen y Aghajanian, 1983; Burlhis y Aghajanian, 1987) confirmaron que estas células pueden ser silentes o espontáneamente activas, tener un patrón de disparo de 0.5 a 2.5 Hz, resistencia de entrada en el intervalo de 250 a 400  $\text{M}\Omega$ , constantes de tiempo ( $\tau$ ) muy largas y una duración del potencial de acción  $>1.8$  ms, seguido de un PPH de amplitud grande (10 – 20 mV) y larga duración (200 – 300 ms).

Asimismo, la respuesta de las neuronas serotoninérgicas del NDR a pulsos de corriente despolarizantes de larga duración consiste en una actividad de disparo regular de baja frecuencia (1 – 6 Hz), mientras que en las células no serotoninérgicas la frecuencia de disparo puede alcanzar los 20 Hz (Li y cols., 2001).

Estas características han sido verificadas y son citadas como rasgos distintivos de las neuronas que contienen 5-HT (Crunelli y cols., 1983; Kirby y cols., 2003).

Adicionalmente, dos estudios que utilizaron la técnica de registro de fijación de corriente en célula completa, indican que las características determinantes para diferenciar a las neuronas 5-HT de las no 5-HT son la constante de tiempo del PPH,  $\tau$ , ( $\tau = C_m R_m$ ) donde  $C_m$  es la capacitancia de la membrana y  $R_m$  es la resistencia de la membrana, y la duración del potencial de acción (Kirby y cols., 2003; Beck y cols., 2004).

### 2.3 Propiedades farmacológicas de las neuronas 5-HT

Las neuronas 5-HT del NDR expresan receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos cuyo bloqueo induce la desaparición de la actividad eléctrica espontánea (Baraban y cols., 1978; Menkes y cols., 1980). Vandermaelen y Aghajanian en 1983, demostraron que en rebanadas de cerebro, la estimulación con norepinefrina o fenilefrina de los receptores  $\alpha_1$  aumenta la frecuencia de disparo de las neuronas 5-HT hasta un máximo de 6 Hz. Este efecto es dependiente de dosis y tiene una  $ED_{50}$  de  $\approx 2.5 \mu\text{M}$  para el caso de la fenilefrina. La estimulación de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos produce el cierre de los canales de  $K^+$  de las neuronas 5-HT del NDR mediante la acción directa de las subunidades  $\beta\gamma$  sobre este canal.

La serotonina tiene una acción inhibitoria sobre la frecuencia de disparo de las neuronas 5-HT. Esto se debe a la activación de los autorreceptores somatodendríticos 5-HT<sub>1A</sub>, lo que produce una hiperpolarización por incremento de la conductancia de la membrana al potasio (Sprouse y Aghajanian, 1987). Se ha considerado la existencia del receptor 5-HT<sub>1A</sub> como autorreceptor exclusivo de las células 5-HT en el NDR y por ende, la existencia de esta proteína permitiría identificar, a través de un agente farmacológico las células que sintetizan 5-HT (Sprouse y Aghajanian, 1987). Sin embargo, artículos recientes describen la existencia de receptores 5-HT<sub>1A</sub> tanto en neuronas 5-HT como en neuronas no 5-HT (Kirby y cols., 2003; Beck y cols., 2004). Otros tipos de receptores a serotonina expresados por las neuronas del NDR son el 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub> y 5-HT<sub>2C</sub> cuya estimulación disminuye la liberación de serotonina (Davidson y Stamford, 1995).

Las neuronas del NDR son inhibidas por el GABA, que se libera tanto por fibras aferentes al núcleo como por algunas interneuronas (Harandi y cols., 1987). Las células del NDR expresan los receptores para GABA tipo A y tipo B (Bowery y cols., 1987). El GABA ejerce una acción inhibitoria tónica sobre las neuronas 5-HT del NDR (Gervasoni y cols., 2000).

Las células 5-HT del NDR expresan receptores glutamatérgicos de tipo AMPA (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propiónico) y NMDA (N-methyl D-aspartato). La aplicación de estas sustancias in vivo o in vitro aumenta la actividad de las neuronas 5-HT (Vandermaelen y cols., 1986; Gartside y cols., 2007). El efecto del glutamato sobre las células 5-HT del NDR es bloqueado por el ácido kinurénico, un antagonista de los receptores a Glu (Kalén y cols., 1989).

Asimismo, las células del NDR contienen receptores a glicina (Papp y cols., 2008) la cual tiene una acción neuromoduladora en estas neuronas durante el ciclo sueño-vigilia (Darracq y cols., 1996). La histamina tiene un efecto depresivo sobre las células 5-HT del NDR al interactuar con receptores de tipo H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> (Lakoski y cols., 1983).



Aproximadamente 40% de las neuronas 5-HT del NDR co-secretan galanina, un neuropeptido compuesto de 29 aminoácidos (Melander y cols., 1986). En el NDR existen también terminales secretoras de galanina que hacen sinapsis con las neuronas 5-HT. Las neuronas 5-HT del NDR expresan los tres tipos de receptores metabotrópicos para galanina (Gal R1-3). Los estudios de Xu y cols. (1998) demostraron que la galanina produce hiperpolarización en las neuronas 5-HT del NDR, a través del aumento de la conductancia para  $K^+$ .

Las neuronas 5-HT del DRN reciben aferencias que secretan el factor liberador de corticotropina (CRF). Estas aferencias hacen sinapsis de tipo axo-somático o axo-dendrítico con las neuronas 5-HT de la región caudal y dorsolateral del NDR y sinapsis de tipo axo-axónico con las neuronas 5-HT de la región ventromedial y rostral del NDR (Waselus y Van Bockstaele, 2007). Las neuronas GABAérgicas y las 5-HT del NDR expresan los dos tipos de receptores para CRF: CRF-R1 y CRF-R2. La estimulación de los receptores CRF-R1 aumenta la entrada GABAérgica de las neuronas 5-HT del NDR, mientras que la estimulación de los receptores CRF-R2 produce una corriente entrante despolarizante en las neuronas 5-HT del NDR (Kirby y cols., 2008).

El NDR contiene concentraciones relativamente altas de neuropeptido Y (Yamazoe y cols., 1985) así como receptores para este neurotransmisor (Martel y cols., 1990). La administración de neuropeptido Y suprime los potenciales sinápticos excitadores e inhibidores lentos de las neuronas 5-HT del NDR (Kombian y Colmers, 1992).

En el NDR se expresa la enzima que degrada a los endocannabinoides, la hidrolasa de los ácidos grasos (Egertova y cols., 2003). Asimismo se ha comprobado la existencia de los receptores a cannabinoides de tipo CB1R en las neuronas del NDR (Moldrich and Wenger, 2000). Dosis bajas de agonistas de los receptores CB1R aumentan la actividad de disparo de las neuronas 5-HT del NDR (Bambico y cols., 2010).

Las neuronas 5-HT del NDR, así como las neuronas GABAérgicas del mismo núcleo, reciben aferencias encefalinérgicas. En el NDR existe una alta densidad de receptores encefalinérgicos de tipo mu ( $\mu$ ) y kappa ( $\kappa$ ). La administración de met-enkefalina inhibe las neuronas GABAérgicas, 5-HT y glutamatérgicas del NDR (Jolas y Aghajanian, 1997).

### **3. La nicotina**

#### **3.1 Breve reseña y perfil químico**

La nicotina es un alcaloide que se encuentra en la familia de las plantas Solanaceae y constituye aproximadamente el 0.6 - 3.0 % del peso total en seco del tabaco.

La sustancia fue llamada así después de que Jean Nicot de Villemain, embajador francés en Portugal, enviara semillas y especímenes de la planta del tabaco *Nicotiana tabacum*, de Brasil a París en 1560 y promoviera su uso medicinal.

La nicotina se aisló a partir de la planta del tabaco en 1828 por los químicos alemanes Posselt y Reimann, quienes la consideraron un veneno. La biosíntesis de la nicotina toma lugar en la raíz de la planta y su acumulación ocurre en las hojas. Su función natural es actuar como un químico repelente a los herbívoros, por lo que se le utilizó como insecticida en el pasado.

La nicotina es un líquido viscoso higroscópico; debido a que es una base nitrogenada, forma sales con ácidos que a menudo son sólidos y solubles en agua. La base libre de nicotina se quema a una temperatura menor a su punto de ebullición y sus vapores hacen combustión a 35°C en el aire a pesar de una baja presión de vapor. Lo anterior explica por qué la mayor parte de nicotina se quema cuando se fuma un cigarrillo.

### **3.2 Efectos sistémicos de la nicotina.**

A bajas concentraciones, la nicotina actúa como estimulante del sistema nervioso humano y es el principal factor responsable de la dependencia al tabaquismo (en promedio, un cigarrillo produce 1 mg de nicotina absorbida). El contenido de nicotina en cigarrillos ha sido incrementado lentamente a través de los años. Un estudio demuestra que entre los años 1998 – 2005 en promedio, se registró un incremento de 1.6% en el contenido de nicotina por cada cigarrillo proveniente de las principales marcas tabacaleras (Connolly y cols., 2007).

En humanos, la nicotina produce efectos reforzadores positivos como euforia leve, incremento de energía, sensación de despertamiento y una reducción de la tensión, de la ansiedad y del apetito (Benowitz, 1988). Fumar uno o dos cigarrillos induce una estimulación leve del sistema nervioso autónomo: la frecuencia cardíaca se incrementa de 5 a 40 latidos por minuto, la presión sanguínea sube de 5 a 20 mmHg y la liberación de epinefrina y cortisol se eleva (Hill y Wynder, 1974). La mayoría de los fumadores indican que fumar es una actividad placentera (81%), ayuda a la concentración (63%), los tranquiliza cuando están estresados o enojados (90%), y les permite manejar situaciones complejas de mejor forma (82%) (Etter y cols., 2000).

Igualmente, la nicotina produce activación locomotora, analgesia y mejoramiento del aprendizaje y la memoria en ratas (Clarke y Kumar, 1983; Benwell y Balfour, 1982).

La nicotina, cuando es inhalada, se absorbe rápidamente en los pulmones y alcanza el cerebro en 8 segundos, casi tan rápido como si fuese administrada en una inyección intravenosa (Benowitz, 1996). La concentración de nicotina alcanzada en el plasma es de 20-50 ng/ml por cigarrillo fumado, es decir, una concentración aproximada de 500 nM a 1 µM (Dani y Harris, 2005).

La absorción pasiva de nicotina ha sido bien establecida. Una persona no fumadora que cohabite la misma casa con un fumador de 40 cigarrillos diarios obtendrá un nivel de cotinina urinaria (uno de los principales metabolitos de la nicotina) equivalente al de una persona que fuma 3 cigarrillos al día (Matsukura y cols., 1984).

La nicotina es metabolizada principalmente en el hígado (80-90%) y, junto a sus metabolitos (cotinina y nicotina 1'-N-óxido), son excretados de manera conjunta en la orina. 70% de la nicotina es convertida en cotinina (Benowitz y cols., 1983).

La nicotina produce sus acciones en el sistema nervioso central y periférico a través de la unión a los receptores colinérgicos nicotínicos (Flores y cols., 1992).

La administración de antagonistas competitivos y no competitivos de estos receptores bloquea la auto-administración de nicotina en el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico en ratas, lo que indica que la activación de los nAChRs está involucrada en las acciones de reforzamiento de la nicotina (Corrigall y Coen, 1989; Watkins y cols., 1999). Otro componente importante del sistema de reforzamiento es la innervación colinérgica desde los núcleos pedúnculo pontino y laterodorsal tegmental hacia las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra y el área ventral tegmental (Tago y cols., 1989).

## **4. Los receptores nicotínicos para acetilcolina.**

### **4.1 Estructura**

Los receptores a ACh son de dos tipos: metabotrópicos muscarínicos e ionotrópicos nicotínicos (nAChRs).

Los nAChRs están conformados por cinco subunidades transmembranales dispuestas alrededor de un poro central lleno de agua. Las subunidades neuronales que conforman a los nAChRs heteroméricos, incluyen las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  ( $\alpha 2 - \alpha 6$  y  $\beta 2 - \beta 4$ ). Las subunidades capaces de formar nAChRs homoméricos son  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$  y  $\alpha 9$ . La subunidad  $\alpha 10$  forma un heterómero con la subunidad  $\alpha 9$ . La subunidad  $\alpha 7$  está ampliamente distribuida en el cerebro de mamífero. La subunidad  $\alpha 8$  se ha identificado en tejido de aves pero no en mamífero. (Whiting y cols., 1987; Albuquerque y cols., 2009).

Los receptores nicotínicos que contienen las subunidades  $\alpha 4$  y  $\beta 2$ , son considerados los más abundantes en el cerebro de humano y de rata, estas subunidades tienen una alta afinidad a la nicotina, participando fuertemente en la adicción a la nicotina (Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004; Gotti y cols., 1997).

La estructura básica de los receptores nicotínicos es homóloga a la del receptor nicotínico del músculo. En una sección lateral del canal-receptor se puede observar un vestíbulo lleno de agua extracelular de aproximadamente 20 Å (2 nm) de diámetro que se extiende 60 Å desde la membrana celular hacia la hendidura sináptica. El poro se estrecha a nivel de la superficie membranal y los iones permeantes pasan a lo largo de este poro de 40 Å (Toyoshima y Unwin, 1988).

Una representación esquemática y lineal de una subunidad revela un largo dominio amino-terminal extracelular, cuatro segmentos transmembranales, un asa intracelular por el tercero y cuarto dominios transmembranales y un extremo carboxilo-terminal corto. Ambos terminales finalizan en el espacio extracelular y el segundo segmento transmembranal (TM2) se alinea a lo largo del poro central de la estructura.

Estudios electrofisiológicos iniciales indican que existen dos sitios de unión a la ACh por receptor en la interfase entre dos subunidades adyacentes. En el caso de los receptores del músculo el sitio se encuentra entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Lo mismo ocurre con los receptores heteroméricos neuronales. En el caso del receptor homomérico (el receptor nicotínico formado sólo por subunidades  $\alpha 7$ ), el sitio de unión está definido por la cara

lateral de las subunidades adyacentes, de manera que en este tipo de receptor existen 5 sitios de unión a la ACh.

Una vez unido al receptor, el agonista induce una serie de cambios conformacionales a través de la interacción de residuos proteínicos, lo que confiere la propiedad de compuerta al canal. Existen aminoácidos cargados electrostáticamente que se acoplan a los dominios de unión de la subunidad  $\alpha$ .

Los nAChRs de mamífero son permeables a pequeños cationes divalentes y monovalentes ( $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  especialmente). La activación del canal-receptor nicotínico ocasiona despolarización y la permeabilidad a los cationes divalentes tiene un importante papel fisiológico al suplementar señales iónicas, incluidas las de calcio. La permeabilidad de los canales formados por subunidades  $\alpha 7$  al calcio es diez veces mayor que al sodio y dicha propiedad es ocasionada por el arreglo de residuos cargados en la boca interna del poro del canal.

Una característica prominente de estos receptores es su desensibilización, la cual es una propiedad intrínseca del canal-receptor, muy similar a la inactivación de los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje. No obstante lo anterior, la velocidad de desensibilización puede ser regulada por la fosforilación de las subunidades del receptor (Sher y cols., 2004).

## 4.2 Distribución

En las uniones neuromusculares y en los ganglios autónomos, la transmisión sináptica a través de los receptores nicotínicos es rápida y con ubicación postsináptica. Sin embargo, en el sistema nervioso central, el papel del receptor nicotínico no es actuar como un mecanismo de transmisión sináptica rápida sino como un mecanismo modulador de la liberación de varios neurotransmisores.

La mayoría de los nAChRs neuronales tienen una ubicación presináptica, en las terminales axónicas y su activación aumenta la liberación de varios neurotransmisores como el glutamato, la dopamina, la noradrenalina, la ACh, el GABA y la serotonina (Wonacott, 1997) debido a que la activación de los nAChRs eleva la concentración de calcio intraterminal.

De la misma forma, la aplicación exógena de agonistas y antagonistas de receptores nicotínicos presinápticos modula la liberación de dichos neurotransmisores.

Los receptores nicotínicos se encuentran distribuidos en los sitios preterminal axonal, dendrítico y somático.

Los nAChRs preterminales (ubicados antes del botón axónico), están localizados en los axones y su activación puede determinar la aparición de potenciales de acción, los cuales, al llegar a los botones terminales, activan canales de calcio dependientes de voltaje y aumentan la liberación de neurotransmisores. Este efecto de los nAChRs preterminales es inhibido por el bloqueador de canales de sodio tetrodotoxina, ya que evita la activación regenerativa de los canales de sodio impulsada por la brusca despolarización de un potencial de acción.

La estimulación de los nAChRs somatodendríticos produce despolarización local, la cual, a su vez, puede generar potenciales de acción autopropagados. Este tipo de respuesta

nicotínica ha sido observada solamente en las células de Renshaw de la médula espinal y en algunas interneuronas del cerebelo.

La estimulación de los nAChRs presentes en sinaptosomas produce un influjo de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , el cual despolariza la membrana, abre canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, lo que aumenta la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este último evento genera la liberación de neurotransmisores, el crecimiento de las neuritas, regula la transcripción de varios genes y puede activar segundos mensajeros.

Los nAChRs axonales, dendríticos y somáticos también modulan la liberación de un neurotransmisor en forma diferente. La activación de los nAChRs no sinápticos modifica la resistencia membranal y por ende, la constante de espacio de la membrana. Estos dos factores modifican la eficiencia y la transmisión de las entradas sinápticas en la célula blanco y el posible surgimiento de un potencial de acción se modifica. Además, la localización estratégica de estos receptores permite que un potencial de acción no sea capaz de llegar a una región específica del árbol dendrítico o axonal, ya que la despolarización local ocasionada por estos inactivaría a los canales de sodio dependientes de voltaje y esto impediría la formación de una espiga. La amplia distribución no sináptica de los nAChRs también podría permitirles tener una influencia directa en el valor del potencial de membrana a cada momento, lo que directamente tendría un efecto en la facilidad con la que se alcanza el valor umbral para producir un potencial de acción. Adicionalmente, la señalización por los nAChRs también es modificada por la desensibilización que ocurre en estos cuando la ACh difunde y alcanza sitios distantes. En estos puntos, la ACh se encuentra a muy bajas concentraciones como consecuencia del neurotransmisor remanente que no ha sido degradado por la enzima acetilcolinesterasa, la cual no siempre se encuentra en los mismos sitios donde se libera ACh.

### 4.3 Funciones de los nAChRs

Se han identificado diferentes subtipos de nAChRs, que difieren en sus propiedades, incluyendo sensibilidad a la nicotina, permeabilidad al calcio y la cinética de la desensibilización (Barik y Wonnacott, 2009).

Existe suficiente información que indica que un subtipo de nAChR se encuentra presente en múltiples sitios de la misma neurona, y también que en un dominio neuronal específico se puede localizar más de un subtipo de nAChR. Por ejemplo, se han encontrado los subtipos de receptor funcionales  $\alpha 7$  y  $\alpha 4\beta 2$  expresados en el soma, las dendritas y regiones axónicas preterminales en diferentes interneuronas de la región CA1 del hipocampo. Los receptores  $\alpha 7$  podrían tener una función sináptica y no sináptica en estas células que sintetizan GABA. Cuando son activados por la ACh, los nAChRs de tipo  $\alpha 7$  somatodendríticos de la interneurona pueden inducir una despolarización breve y de suficiente magnitud para inducir un potencial de acción y así ocasionar inhibición de la neurona piramidal postsináptica. De manera similar, la activación de los receptores  $\alpha 4\beta 2$  puede inducir una excitación más prolongada de la interneurona, lo que produciría una inhibición más larga de la neurona piramidal.

Considerando a las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo, se pueden observar tres diferentes funciones reguladoras de la activación de los nAChRs. La primera se refiere a que la activación de los nAChRs somatodendríticos, presinápticos o preterminales puede facilitar la transmisión GABAérgica a las neuronas piramidales postsinápticas y por lo tanto, ocasionar un efecto inhibitorio, durante el disparo de un potencial de acción procedente de una neurona colinérgica sobre esta interneurona. Esta llamada inhibición colinérgica, tendría un efecto supresor sobre cualquier señal excitatoria pequeña que llegase a las dendritas de la neurona piramidal y permitiría la propagación sólo de señales eléctricas lo suficientemente robustas para generar una espiga. Segunda, la liberación de GABA mediada por nAChR podría desinhibir a las neuronas piramidales de la región CA1 cuando sean inhibidas por otras interneuronas, es decir, la interneurona GABAérgica es silenciada por su propio neurotransmisor sintetizado: un efecto de inhibición de la inhibición. Tercera, la liberación de GABA mediada por nAChRs ocasiona una hiperpolarización neuronal que también afecta la función celular a través de diferentes mecanismos, entre los cuales se incluiría la remoción de la inactivación de los canales iónicos que generen corrientes entrantes. De igual manera, en otras áreas del cerebro como en el núcleo interpeduncular, se ha demostrado que una neurona puede expresar varios subtipos de nAChRs en múltiples sitios y que esta aparente redundancia del sistema finaliza en una acción convergente de los nAChRs y de la acción colinérgica rápida (De Biasi M y Dani J, 2010; Nomikos y cols., 2000).

#### **4.4 Papel de los nAChRs en funciones cerebrales complejas y en varias patologías.**

La nicotina y los receptores nicotínicos han sido implicados en un amplio cuadro de enfermedades mentales y disfunciones neuronales (Léna y Changeux, 1998; Picciotto y Zoli, 2002). Se ha demostrado que los mecanismos involucrados en la respuesta nicotínica contribuyen a la función cognitiva. Asimismo, la disminución o pérdida de los nAChRs se observa en enfermedades como el síndrome de Down, la demencia con cuerpos de Loewy, la enfermedad de Alzheimer, el autismo, la enfermedad de Parkinson, epilepsia, entre otras (Raggenbass y Bertrand, 2002; Dani y Harris, 2005).

De manera general, los agonistas nicotínicos mejoran ciertas formas de memoria (Hogg y cols., 2003). En un estudio con ratones en un laberinto radial, se observó que la nicotina mejoró la memoria de trabajo, excluyendo la latencia de la respuesta y la memoria de referencia (Levin y cols., 2006). Estos estudios de tipo conductual que han utilizado agonistas, antagonistas y también lesiones colinérgicas selectivas, indican que la influencia nicotínica más grande ocurre cuando el individuo está desarrollando una tarea complicada o está cognitivamente disfuncional (Levin y Simon, 1988; Picciotto, 2003).

En ratones mutantes que no expresan la subunidad  $\beta 2$  del nAChR, se ha observado la aparición temprana de procesos neurodegenerativos (Zoli y cols., 1999), lo que indica que los nAChRs son estructuras importantes que permiten mantener la integridad cerebral. En las tareas de atención, los agonistas nicotínicos mejoran la fidelidad de una respuesta, mientras que la mecamilamina, un antagonista de nAChRs, desacopla esta exactitud y enlentece el tiempo de reacción de la respuesta (Mizra y Stolerman, 1998).

Así como en los humanos, los ratones muestran un decremento notable de la expresión de nAChRs relacionada con la edad (Gahring y cols., 2005). Coincidente con el dato anterior, existe un incremento significativo en la expresión de subunidades  $\alpha 7$  de los nAChRs en astrocitos, un hallazgo que también ha sido reportado en pacientes con enfermedad de Alzheimer (Teaktong y cols., 2003).

En otras enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson, la nicotina facilita el aumento de la liberación de dopamina estriatal y previene la degeneración inducida por toxinas de las neuronas dopaminérgicas (Quik y cols., 2007).

El primer descubrimiento de una enfermedad humana relacionada con un nAChR neuronal fue una mutación en el gen codificador para la subunidad  $\alpha 4$  del nAChR (CHRNA4) (Steinlein y cols., 1995). Esta epilepsia basada en un nAChR disfuncional, presenta episodios que ocurren principalmente durante el sueño no-MOR (no-Movimiento Ocular Rápido) y se originan focalmente en el lóbulo frontal del cerebro (Oldani y cols., 1998).

#### **4.5 Farmacología de los receptores nicotínicos. Agonistas y antagonistas.**

El estudio inicial de Paton y Zaimis en 1949, mostró que los receptores a ACh en neuronas del sistema nervioso autónomo eran distintos farmacológicamente de los receptores musculares (Paton y Zaimis, 1949).

A inicios de los años ochenta se hizo evidente que los sitios de unión a nicotina tritiada y  $\alpha$ -bungarotoxina yodo radioactiva diferían en sus perfiles farmacológicos y también en su distribución anatómica en el cerebro de roedor (Romano y Goldstein, 1980). De esta forma se inició la identificación de la heterogeneidad de los nAChRs en el cerebro.

Actualmente se han identificado varias toxinas animales y vegetales que tienen como blanco a los nAChRs de manera específica y también se han producido de manera sintética otras más. Sin embargo, existe una carencia de herramientas específicas de subtipo, especialmente antagonistas (Wonnacott, 1997). Sólo la subunidad  $\alpha 7$  tiene una lista amplia de agonistas, antagonistas y moduladores alostéricos (Jensen y cols., 2005).

##### **4.5.1 Agonistas nicotínicos.**

De manera general, los agonistas nicotínicos se unen con alta afinidad al subtipo  $\alpha 4\beta 2$ , con menor afinidad al subtipo  $\alpha 7$  y con afinidad intermedia al subtipo  $\alpha 3$ . Con respecto a la potencia funcional, se puede observar una relación similar, excepto por los valores en la EC50 que indican una diferencia menos marcada entre cada subtipo.

Existen pocos agonistas (AR-R17779, compuesto A y PNU 282987 para  $\alpha 7$ ) que tienen selectividad de subtipo y que pueden activar sólo una subunidad específica en una población heterogénea.

**La acetilcolina (ACh).** Es el agonista endógeno para todos los subtipos de nAChRs. A menudo, su utilidad es comprometida porque carece de selectividad, incluso con los otros receptores a ACh (muscarínicos), y también por la susceptibilidad a la hidrólisis.

**La carbamilcolina (carbacol).** Utilizado normalmente como agonista de receptores muscarínicos, tiene una afinidad reducida en los subtipos  $\alpha 7$  y  $\alpha 4\beta 2$ . Sin embargo, el derivado N-metilcarbamilcolina (MCC) tiene alta afinidad por el subtipo  $\alpha 4\beta 2$  (Jensen y cols., 2003).

**La nicotina.** Ha sido el prototipo del agonista de nAChRs e históricamente ha permitido la clasificación de los subtipos de receptores (Langley, 1907). Excepto por los subtipos  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\beta 10$  donde actúa como antagonista, la nicotina activa el resto de los subtipos. Cruza la barrera hematoencefálica sin necesidad de transportadores (Benowitz y cols., 1998).

**La cotinina.** Es el principal metabolito de la nicotina. Debido a su vida media extendida de 5 a 6 horas (la nicotina tiene como vida media  $< 1$  hora), la cotinina alcanza altas concentraciones in vivo y puede desensibilizar algunas respuestas por nAChRs (Briggs y Mckenna, 1998).

**La trans-metanicotina (RJR-2403 o TC-2403).** Es un alcaloide del tabaco de síntesis reducida. Muestra una selectividad funcional por el subtipo  $\alpha 4\beta 2$  comparado con el subtipo  $\alpha 3$ , por lo que se le considera un agonista completo de aquel subtipo.

**La TC 2559.** Derivado de trans-metanicotina. La modificación en su estructura originó un compuesto con selectividad mejorada para el subtipo  $\alpha 4\beta 2$ , pero relativamente, de baja eficacia (Chen, 2003). Cuando se administra in vivo, no se observan efectos hipotérmicos, ni locomotores, en contraste con la nicotina (Chen, 2003).

**La anatoxina A.** Es un potente agonista originalmente aislado de algas verde-azul de agua fresca. En los nAChRs musculares, es 8 veces más potente que la ACh (Swanson, 1986) ya que activa los diferentes subtipos de nAChRs en concentraciones sub-micromolares y los valores de la EC50 son 20-100 veces menores que para ACh (Alkondon y Albuquerque, 1993).

**La citisina.** Derivado de plantas de la familia Leguminosae. Tiene la misma afinidad que la nicotina para los receptores  $\alpha 4\beta 2$ . Es considerado un agonista parcial, ya que su eficacia funcional depende de la presencia del tipo de subunidad  $\beta$  (Luetje y Patrick, 1991). En estudios in vivo de comportamiento, la citisina es menos potente que la nicotina (Chandler y Stolerman, 1997).

**La vareniclina.** Compuesto congénere de la citisina, desarrollado para aprovechar las propiedades de esta (selectividad y agonismo parcial del subtipo  $\alpha 4\beta 2$ ), como coadyuvante para terminar el hábito tabáquico (Coe, 2005). Aunque aparece como agonista selectivo de  $\alpha 4\beta 2$ , su potencia en varios subtipos o conformaciones de nAChRs muestra menos discriminación (Mihalak, 2006).

**La epibatidina.** Obtenida de extractos dérmicos de la rana amazónica *Epidobates tricolor*, es uno de los agonistas nicotínicos más potentes. Se une a distintos tipos de nAChRs heteroméricos con afinidades subnanomolares (Xiao y Kellar, 2004). La



potencia funcional de epibatidina es excepcionalmente alta y sólo los receptores musculares y aquellos con subunidades  $\alpha 7$  muestran valores de EC50 más altos (Gerzanich y cols., 1995). La ventana terapéutica de epibatidina es muy limitada debido a sus efectos colaterales explicados por la carencia de selectividad de subtipo (Jain, 2004).

**El A-85380.** Surgió de la modificación de epibatidina para imitar su potencia en los receptores  $\alpha 4\beta 2$  y minimizar las interacciones con otros subtipos de nAChRs (Rueter, 2006). Como la epibatidina, el A-85380 se une a los nAChRs heteroméricos con afinidades subnanomolares pero su interacción con los receptores  $\alpha 7$  requiere concentraciones más de 1000 veces más altas (Sullivan, 1996).

**El 5-Yodo-A-85380.** Es el radioligando yodado de A-85380. Este análogo muestra selectividad funcional para los nAChRs que contienen la subunidad  $\beta 2$  sobre los otros subtipos (Liu y cols., 2003).

**El UB-165.** Esta molécula es un híbrido de la anatoxina A y la epibatidina. Es un agonista parcial del subtipo  $\alpha 4\beta 2$  con potencia intermedia (Cao y cols., 2005).

**La DMPP (Dimetilfenilpiperazina).** Históricamente, se le ha considerado como un agonista ganglionar. Muestra baja selectividad entre los nAChRs neuronales con respecto a su afinidad de unión y potencia de activación (Jensen y cols., 2005). Debido a que la membrana celular es impermeable a este compuesto, se le ha utilizado para bloquear selectivamente los nAChRs expresados en la superficie celular (Peng y cols., 1999). Existe un compuesto relacionado a DMPP, llamado **metilpiperazina**, el cual es un agonista nicotínico más débil que DMPP.

**La lobelina.** Alcaloide del tabaco indio, se une con alta afinidad a los nAChRs del tipo  $\alpha 4\beta 2$  en donde tiene los perfiles de agonista y antagonista (Dwoskin y Crookes, 2001). También muestra un efecto inhibitorio sobre el transporte vesicular de monoaminas y dopamina, así como en los receptores a opioides del tipo  $\mu$  (Miller, 2007).

**La anabasina.** Es un alcaloide del tabaco con actividad nicotínica no selectiva. Estructuralmente, semejante a la anabaseína, sin embargo este compuesto sí es selectivo al subtipo  $\alpha 7$  (Kem y cols., 1997).

**El levamisol.** Fármaco antihelmíntico que actúa como agonista completo en los nAChRs del músculo de nemátodos, En el nAChR de mamífero se ha reportado que actúa como modulador alostérico (Rayes y cols., 2007).

**El imidacloprid.** Actúa en el nAChR de insectos por lo que se le utiliza como insecticida. Puede actuar como agonista débil en el receptor de aves con subunidad  $\alpha 7$  pero carece de actividad en el subtipo  $\alpha 4\beta 2$ .

**El tropisetron.** Considerado como antagonista de los receptores ionotrópicos 5-HT<sub>3</sub>, muestra un agonismo parcial en los homómeros  $\alpha 7$ . También se ha reportado que puede inhibir a los nAChRs  $\alpha 3\beta 4$ .

## 4.5.2 Antagonistas nicotínicos.

### 4.5.2.1 Antagonistas competitivos.

Los antagonistas competitivos interactúan reversiblemente con el receptor nicotínico en el sitio de unión (o muy cercano a éste) del agonista. Estabilizan al receptor en una conformación de canal cerrado y evitan el acceso de los agonistas. La mayoría de los antagonistas competitivos procede de varios orígenes en la naturaleza y tienen un rango limitado de selectividad de subtipos.

**La d-tubocurarina.** Es un antagonista clásico, no selectivo, de nAChRs. Es capaz de antagonizar completamente las respuestas funcionales mediadas por estos receptores, ya sean musculares o neuronales, a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  (Chávez-Noriega, 1997).

**La dihidro- $\beta$ -eritroidina (DH $\beta$ E).** Alcaloide derivado de las semillas de *Erythrina*, es un antagonista específico de nAChRs neuronales. Puede ser considerado como un antagonista de los nAChRs no- $\alpha 7$  con preferencia por los subtipos con subunidades  $\beta$ . Comúnmente se le emplea en concentraciones de 1 a 10  $\mu\text{M}$  (Kenny y Markou, 2007).

**Las  $\alpha$ -conotoxinas.** Se encuentran presentes en los venenos de varias especies de conos marinos. Existen tres  $\alpha$ -conotoxinas bien caracterizadas y con diferentes especificidades para los nAChRs neuronales: MII, AuIB y Iml.

**La  $\alpha$ -conotoxina MII.** Originalmente fue conocida por ser un antagonista selectivo y potente de los nAChRs  $\alpha 3\beta 2$ . Posteriormente, se encontró que es un antagonista igual de efectivo con los receptores  $\alpha 6\beta 2$ , lo que indica la similaridad de secuencias de las subunidades  $\alpha 3$  y  $\alpha 6$  (McIntosh y cols., 2004).

**La  $\alpha$ -conotoxina AuIB.** Se ha reportado que sólo tiene selectividad por los subtipos  $\alpha 3\beta 4$ . Es una toxina derivada de *Conos aulicus*, considerada de baja potencia (Rigby y cols., 1997).

**La  $\alpha$ -conotoxina Iml.** Antagonista selectivo de los nAChRs  $\alpha 7$  a una concentración de 1  $\mu\text{M}$ . Una limitante con respecto al uso de  $\alpha$ -conotoxinas es que su especificidad puede ser altamente específica de especie (Broxton, 1999).

**La  $\alpha$ -bungarotoxina.** Es el antagonista selectivo al subtipo  $\alpha 7\text{-}\alpha 9$  mejor estudiado. Se obtiene del veneno del crótalo taiwanés *Bungarus Multicinctus*. Es posible que este antagonista no interactúe con nAChRs heteroméricos incluso a concentraciones micromolares.  $\alpha$ -Bgt muestra una cinética de disociación muy lenta, ya que el bloqueo funcional no es revertido por el lavado de una hora.

**La metilicaconitina (MLA).** Potente antagonista competitivo selectivo por los nAChRs  $\alpha 7$  que, a diferencia de  $\alpha$ -Bgt, discrimina entre los receptores musculares y aquellos con la subunidad  $\alpha 7$ . La inhibición de los subtipos  $\alpha 7$  con MLA es rápida y reversible, sin embargo también bloquea a los receptores con subunidades  $\alpha 9$  y  $\alpha 9\alpha 10$ .

**El MG 624.** Antagonista muy potente y selectivo de los nAChRs con la subunidad  $\alpha 7$  de pollo. La IC<sub>50</sub> para el bloqueo de estas respuestas es de 100 nM, casi 30 veces menos que para el efecto similar en los nAChRs  $\alpha 4\beta 2$  de músculo (Gotti y cols., 2000).

#### **4.5.2.2 Antagonistas no competitivos.**

Estas moléculas no se acoplan al sitio de unión de los agonistas. Interactúan con diferentes sitios que pueden incluir la luz del canal-receptor nicotínico.

**La mecamilamina (MEC).** Es el antagonista no competitivo arquetípico para los nAChRs neuronales. Inhibe a todos los receptores a una concentración de 10  $\mu$ M in vitro, aunque los subtipos  $\alpha 7$  son un poco menos sensibles que los heterómeros  $\alpha/\beta$ . En estudios de comportamiento, MEC cruza la barrera hematoencefálica y se administra a una concentración de 1 mg/kg en roedores para bloquear los nAChRs del sistema nervioso central.

**El hexametonio.** Se le identificó primero como un agente bloqueador de los nAChRs ganglionares. A diferencia de MEC, este compuesto no cruza la barrera hematoencefálica por lo que administrado periféricamente no bloquea a los nAChRs centrales in vivo.

**La clorisondamina.** Cuando este antagonista nicotínico cuando se administra in vivo produce un bloqueo persistente de los nAChRs que puede durar semanas o incluso meses. Se ha postulado que esta inhibición duradera surge como consecuencia de la acumulación intracelular del fármaco (el Bizri, 1995) y que el compuesto tendría una interacción específica con la subunidad  $\alpha 2$  (Costa y cols., 2001).

**La 2,2,6,6-Tetrametilpiperidina-4-il (TMPH).** A bajas concentraciones produce una inhibición de larga duración de los subtipos heteroméricos, mientras que el bloqueo de los receptores  $\alpha 7$  y musculares es fácilmente reversible. Por lo anterior, es posible distinguir diferentes clases de nAChRs. In vivo, la TMPH muestra una inhibición diferencial entre la analgesia y la discriminación inducidas por nicotina con respecto a los efectos locomotores y la hipotermia (Damaj, 2005).

## **5. La nicotina y el núcleo dorsal del raquídeo.**

### **5.1 Receptores nicotínicos en el NDR**

En 2000, Bitner y cols., observaron un doble marcado para las células 5-HT y la subunidad  $\alpha 4$  en el núcleo dorsal del raquídeo. Dicha expresión de la subunidad se encuentra asociada a un nivel aumentado de analgesia comparado con ratas que tienen una disminución de la expresión del subtipo  $\alpha 4$  del nAChR en el NDR. (Fig.3)

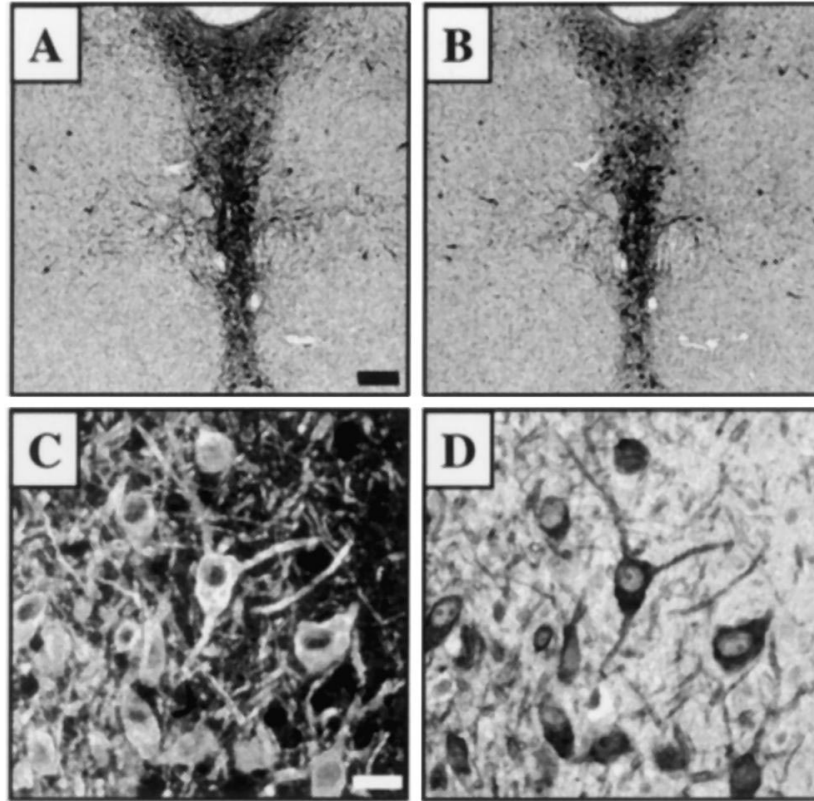


Figura 3. Reacción inmunohistoquímica a la enzima triptófano hidroxilasa (A,C) y la expresión de la subunidad  $\alpha 4$  de los nAChRs (B,D) en las células del NDR de rata. Barra de calibración negra 100  $\mu\text{m}$ . Barra de calibración blanca 20  $\mu\text{m}$ . (Tomado de Bitner y cols., 2000).

En 2002, Bitner y Nikkel, identifican la expresión de la subunidad  $\alpha 7$  de los nAChRs en células 5-HT y no 5-HT del NDR así como en las células del locus coeruleus, sitio en el cual ya habían sido identificados previamente (Léna y cols., 1999) (Fig. 4).

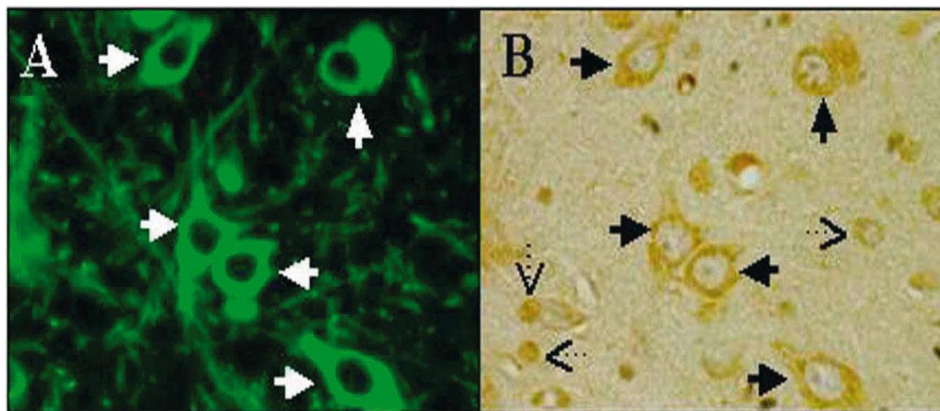


Figura 4. Doble marcado inmunocitoquímico de la enzima triptófano hidroxilasa (A) y de la subunidad  $\alpha 7$  de los nAChRs (B) en las neuronas del NDR. Las flechas sólidas en B, indican neuronas de tamaño somático grande; no obstante, las células pequeñas también muestran una inmunoreacción al anticuerpo contra la subunidad  $\alpha 7$  de los nAChRs. (Tomado de Bitner y Nikkel, 2002).

Estudios posteriores confirmaron la existencia de la subunidad  $\alpha 4$ , así como su funcionalidad, al aplicar epibatidina de manera sistémica y observar la expresión aumentada de c-Fos en diversos núcleos del tallo cerebral, entre ellos el NDR (Cucchiari y Commons, 2003).

Con técnicas de inmunocitoquímica y microscopía electrónica se ha confirmado la presencia de la subunidad  $\alpha 4$  de los nAChRs en las neuronas triptófano hidroxilasa (+) del NDR, así como en células triptófano hidroxilasa (-) (Commons, 2008).

## 5.2 Efectos *in vivo* e *in vitro*.

La expresión de la subunidad  $\alpha 4$  del nAChR en el NDR está asociada con un nivel aumentado de analgesia comprobado por la prueba de retiro de extremidad a una fuente de calor térmico (Bitner y cols., 2000).

Los estudios electrofisiológicos con aplicación de agonistas nicotínicos *in vitro*, indican que existen dos posibles mecanismos de acción de la nicotina dentro del NDR. El primero proviene de registros con la técnica de fijación de voltaje en la configuración de célula completa y establece que el sitio de acción de estos agonistas es a nivel presináptico, específicamente sobre los botones terminales noradrenérgicos y serotoninérgicos (Li y cols., 1998). Sin embargo, un estudio reciente con microscopía electrónica, demuestra que sólo 10 axones de 150 analizados presentan inmunomarcado positivo para la subunidad alfa 4 del receptor nicotínico, lo que indica que la influencia de esta regulación presináptica sería un participante menor sobre la actividad eléctrica de las neuronas 5-HT en el NDR (Commons y cols., 2008).

El segundo, realizado con registro extracelular de células del NDR, indica que la aplicación de nicotina induce una liberación oscilatoria de 5-HT y GABA (Mihailescu y cols., 2002). Lo anterior, concuerda con la demostración de que la administración sistémica de nicotina (0.2 mg/kg, s.c.) o del agonista nicotínico RJR-2430 (3.6  $\mu$ M/kg, s.c.) aumentan los niveles extracelulares corticales de serotonina (Summers y Giacobini, 1995; Summers y cols., 1996).

Adicionalmente, se demostró que la nicotina induce un aumento y también una inhibición de la frecuencia de disparo en neuronas 5-HT del NDR (Fig. 5). El análisis final de este trabajo mostró que 70% de las células 5-HT del NDR son excitadas y 30% de las neuronas 5-HT del NDR son inhibidas con la aplicación de nicotina a una concentración de 2.15  $\mu$ M (Mihailescu y cols., 2002).

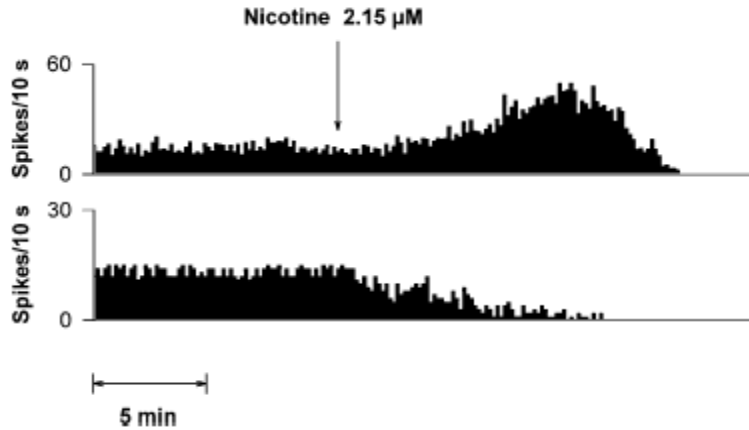


Figura 5. Histogramas de disparo de dos neuronas serotoninérgicas del NDR registradas simultáneamente. La nicotina ( $2.15 \mu\text{M}$ ) produjo cambios recíprocos en la tasa de disparo de estas neuronas. 70% de las neuronas 5-HT del NDR muestran aumento de la tasa de disparo, 30 % de las neuronas 5-HT del NDR muestran disminución de generación de potenciales de acción (Mihailescu y cols., 2002).

## II. HIPÓTESIS

1. Las células serotoninérgicas y no serotoninérgicas del NDR expresan receptores nicotínicos postsinápticos funcionales, cuya estimulación se puede realizar con agonistas exógenos y/o endógenos.

## III. OBJETIVOS

1. Estudiar si la ACh tiene un efecto mediado por los receptores nicotínicos postsinápticos sobre las neuronas del NDR.
2. Determinar el o los subtipos de receptores nicotínicos postsinápticos de las células 5-HT.
3. Caracterizar y diferenciar las neuronas 5-HT de las no-5-HT en el núcleo dorsal del rafe, utilizando técnicas electrofisiológicas e inmunocitoquímicas.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener en cada célula registrada los parámetros electrofisiológicos que permitan su identificación, tales como: la curva corriente – voltaje, la curva intensidad – frecuencia, duración de la espiga y del pospotencial hiperpolarizante, resistencia de la membrana.

2. Comparar los parámetros electrofisiológicos obtenidos de las células no serotoninérgicas con los de las células serotoninérgicas previamente identificadas por el método inmunocitoquímico.
3. Determinar la naturaleza serotoninérgica de las células registradas con anticuerpos anti-serotonina.
4. Registrar neuronas serotoninérgicas y no serotoninérgicas del NDR en la configuración de fijación de voltaje y observar la respuesta eléctrica a la aplicación focal de ACh.
5. Registrar posibles neuronas serotoninérgicas (identificadas electrofisiológicamente) y estimular al mismo tiempo la vía colinérgica pedunculopontina – rafé para obtener potenciales sinápticos evocados.
6. Aislar el componente colinérgico nicotínico en los potenciales sinápticos evocados.
7. Modular el potencial sináptico nicotínico evocado utilizando antagonistas colinérgicos nicotínicos, como la mecamilamina (MEC) y antagonistas nicotínicos específicos de las subunidades  $\alpha 7$ , como la metilcaconitina, y de las subunidades  $\beta 2$ , la dihidro- $\beta$ -eritroidina, para identificar el receptor nicotínico.
8. Utilizar el protocolo de estimulación repetitiva (trenes) para separar los efectos presinápticos y postsinápticos de los antagonistas a los receptores nicotínicos.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Preparación de las rebanadas de cerebro.**

Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo a la Guía para el Cuidado y el Uso de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Salud (NIH) y fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado Animal de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Los experimentos se realizaron en rebanadas de cerebro obtenidas de ratas Wistar, día postnatal 14 – 25. Los animales fueron anestesiados profundamente con isoflurano y decapitados. Se removió rápidamente el cerebro y se colocó en una solución salina externa enfriada en hielo, que contenía (en mM): 125 NaCl, 3 KCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1.2 CaCl<sub>2</sub>, 25 glucosa, osmolaridad = 300 mOsm/L, pH = 7.3, burbujeada con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>. Se cortaron rebanadas coronales del mesencéfalo que incluían al NDR y a los núcleos PPT y LDT (350  $\mu$ m de grosor) con un vibratomo (Vibratome 1500 Comp., St. Louis, MO) y se colocaron en una cámara con solución salina oxigenada a temperatura ambiente. Después de cortadas, las rebanadas se dejaron reposar en esta cámara durante una hora, para posteriormente ser utilizadas.

### **2. Registros con la técnica de fijación de voltaje en la configuración de célula completa.**

Las rebanadas individuales se transfirieron a una cámara de registro hecha con plexiglass y perfundida con solución salina a un flujo de 3-4 ml / min. y a temperatura de 25° C. Los registros con la técnica de fijación de voltaje en la configuración de célula completa y con

las modalidades de fijación de corriente y de voltaje se realizaron con un amplificador Multiclamp 700A (Axon Instruments, Union City, CA). Los registros fueron monitoreados y almacenados utilizando el programa pClamp 8 (Axon Instruments, Union City, CA). Las micropipetas para los registros se hicieron con tubos de vidrio de borosilicato (WPI, Sarasota, FL) con un estirador Flaming-Brown (Sutter Instrument Comp., Novato, CA) y se pulieron con una microforja (MF-830, Narishige Comp., Japón). La solución interna consistió (en mM): 115  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1  $\text{MgCl}_2$ , 10 HEPES, 0.5 EGTA, 2 $\text{Na}_2$ -ATP, 0.7  $\text{Na}_2$ GTP, biocitina 0.1%, pH= 7.2-7.3 con KOH 280-300 mOsm/l. La impedancia de los electrodos varió entre 4 y 7  $\text{M}\Omega$ . Los datos experimentales se almacenaron en un ordenador utilizando un convertidor analógico-digital Digidata 1322A (Axon Instruments, Union City, CA) a una frecuencia de muestreo de 5 kHz. Las neuronas se observaron utilizando un sistema de video-microscopía en infrarrojo (BX51WI, Olympus Instruments, Japón) y un objetivo de inmersión en agua de 60X. Las neuronas escogidas para el registro se localizaron cerca de la línea media del NDR, que se identificó como un área translúcida entre el fascículo longitudinal medial y el acueducto cerebral.

### **3. Administración local de acetilcolina.**

Se aplicó acetilcolina (1 mM) focalmente sobre las neuronas del NDR con un microinyector (IM 300, Narishige Comp., Japón), acoplado a una micropipeta de vidrio colocada aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  a un lado de la neurona próxima a registrarse. La ACh se aplicó mediante breves pulsos de presión (2-5 psi con duración de 500 ms) en presencia de atropina (5  $\mu\text{M}$ ) y tetrodotoxina (TTX) (1  $\mu\text{M}$ ), para eliminar el componente muscarínico de la respuesta y los efectos indirectos por la liberación de neurotransmisor dependiente de potencial de acción, respectivamente. Se establecieron intervalos de 5 a 10 minutos entre las administraciones sucesivas de ACh para permitir a los receptores nicotínicos la recuperación de la desensibilización.

### **4. Registro de las corrientes post-sinápticas espontáneas**

Se registraron corrientes post-sinápticas espontáneas (sPSCs) en las células 5-HT del NDR utilizando la técnica de fijación de voltaje en la configuración de célula completa. Una vez administrado el fármaco a la cámara, esperamos 10 minutos para permitir una distribución homogénea del fluido. Inmediatamente después, se registraron 20 minutos con las sPSCs de la neurona. Los fármacos se aplicaron de manera acumulativa siguiendo la secuencia:

- 1) 4-aminopiridina (4-AP, 100  $\mu\text{M}$ ), para incrementar la frecuencia de los sPSCs pues bloquea canales de potasio en la terminal presináptica (Flores-Hernández et al., 1994, 1997; Tibbs y cols., 1989).
- 2) Una combinación de sustancias que consistió de un bloqueador de receptores NMDA (AP5, 50  $\mu\text{M}$ ), un bloqueador de receptores AMPA/kainato (CNQX 10  $\mu\text{M}$ ), y un bloqueador de receptores GABA-A (bicuculina, 10  $\mu\text{M}$ ).
- 3) Finalmente, un bloqueador del receptor colinérgico nicotínico: mecamilamina (10  $\mu\text{M}$ ).



## 5. Registro de las corrientes post-sinápticas evocadas

Se utilizó la técnica de estimulación de campo para evocar corrientes post-sinápticas excitatorias sub-umbrales ePSCs en las células del NDR. Los estímulos consistieron en repeticiones de 10 estímulos a 14 Hz, 1 cada 10 segundos. Se puso especial cuidado para descartar las respuestas que decayeron o aumentaron con el tiempo. Un electrodo de tungsteno concéntrico, bipolar y con punta “de lápiz” (FHC, Bowdoinham, ME, USA) fue colocado en el área del núcleo pedunculopontino tegmental (PPT). Se utilizó una unidad de aislamiento para ajustar los parámetros del estímulo durante el experimento. La distancia entre los electrodos de registro y de estimulación fue de 1 mm aproximadamente. La resistencia en serie fue registrada con un pulso de prueba aplicado a la célula postsináptica antes de aplicar el tren de estímulos.

Para cerciorarnos de la integridad de la conexión desde el núcleo pedunculopontino tegmental (PPT) y el núcleo dorsal del rafe (NDR), se realizaron dos clases de experimentos. En el primero, las rebanadas de cerebro que contenían las dos áreas (PPT y NDR), se colocaron en una cámara de Plexiglass y se perfundieron de manera constante con solución salina oxigenada. Una pipeta de punta fina ( $<0.5 \mu\text{m}$ ) llena con solución salina y biocitina al 5%, se insertó dentro del área del núcleo PPT y se mantuvo allí durante 2-3 horas (Ibáñez-Sandoval et al., 2006). Luego, se removió la pipeta y la rebanada se mantuvo bajo la perfusión 5 horas más. El siguiente paso fue la fijación de la rebanada durante la noche con solución salina amortiguada con fosfatos (0.1 M PBS, pH = 7.4, 4°C), que contenía 4% de paraformaldehído y 1% de ácido pícrico. En la mañana siguiente, la rebanada fue sumergida en sucrosa al 30% durante 30 minutos y cortada en secciones de 60  $\mu\text{m}$  de grosor con un vibratomo (Ted Pella, Reading, CA, USA). Después de incubar las rebanadas en solución salina amortiguada con Tris (TBS) que contenía Tritón X-100 y el complejo avidina-biotina-peroxidasa (1:100; Laboratorios Vector, Burlingame, CA, USA) durante 4-6 horas a temperatura ambiente, se procedió a la reacción con 3,3'-tetrahidrocloruro de diaminobenzidina (DAB al 0.05%) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0.003% en TBS y las rebanadas se colocaron en un portaobjetos para visualizar la reacción de la HRP. Las neuronas marcadas dentro del área PPT y las fibras que proyectan hacia el NDR se observaron con un microscopio de trans-iluminación (Fig. 13).

El segundo experimento de verificación consistió en la estimulación eléctrica del NDR para provocar potenciales antidrómicos en neuronas del PPT. La posición de los electrodos fue establecida por los resultados de los experimentos de marcado. La probabilidad de obtener una respuesta antidrómica fue alta (seis de siete intentos). Si un potencial de acción fue evocado con el electrodo de registro en una neurona del PPT, se le pudo hacer colisionar con la respuesta antidrómica. El intervalo de colisión fue determinado como el intervalo interestímulo (2.5 ms) más largo que no pudo generar una respuesta antidrómica.

Al registrar las respuestas sinápticas en el NDR durante la estimulación de campo en el área del PPT, a la solución interna se le añadió el bloqueador de canales de sodio QX-314 (lidocaína) para evitar la aparición de potenciales de acción. CNQX (10  $\mu\text{M}$ ), AP5 (50  $\mu\text{M}$ ) y bicuculina (10  $\mu\text{M}$ ) se añadieron a la solución de perfusión para bloquear a los

receptores ionotrópicos glutamatérgicos y GABAérgicos, respectivamente. En estas condiciones, la respuesta evocada remanente (eEPSCs) fue sensible a MEC, methyllycaconitine (MLA) o dihydro- $\beta$ -eritroidina (DH $\beta$ E) quedando demostrada su naturaleza nicotínica. Las eEPSCs se utilizaron para realizar el análisis de varianza-promedio (gráficas V-M) (Clements & Silver, 2000). De esta forma, las amplitudes promedio de las eEPSCs fueron graficadas contra las varianzas de las mismas eEPSCs. Las gráficas V-M en nuestras condiciones de registro fueron lineales (Fig. 4E), lo que sugiere una baja probabilidad de liberación (Pr). Por lo tanto, analizamos las gráficas V-M al ajustar la ecuación de una línea recta (Eq. 1),

$$y = Ax$$

donde A es la pendiente. A partir de esta ecuación, se pudo calcular el promedio de la amplitud cuántica,  $Q_w$  (Eq.2):

$$Q_w = A / (1 + CV^2)$$

Donde CV es el coeficiente de variación de las amplitudes de eEPSCs.

## 6. Inmunocitoquímica.

Las neuronas se llenaron con biocitina durante los registros. Para determinar la naturaleza serotonérgica de la neurona registrada, se utilizó la combinación del marcado intracelular con la inmunocitoquímica a 5-HT. Las rebanadas que contenían las neuronas inyectadas fueron fijadas durante una noche con paraformaldehído al 4% y ácido pícrico al 1% en 0.1 M PBS, pH 7.4. Se infiltraron con una solución de sacarosa al 30% y se cortaron en secciones de 40  $\mu$ m de grosor. Las secciones se incubaron 4 a 6 horas en solución PBS con 0.2 M Triton X-100 y estreptavidina conjugada a Cy3 (1 mg/ml; Zymed, SF, CA) para marcar a la célula registrada. Las secciones fueron enjuagadas en PBS e incubadas de 18 a 24 horas a 4° C con suero anti 5-HT primario de conejo (Incstar/Diasorin, MN, USA 20080, 1:1000). Después del lavado en PBS, las secciones fueron reincubadas durante 1 hora con anticuerpos secundarios conjugados a Cy5 (Jackson ImmunoResearch, diluido 1:50). Las secciones con la reacción fueron examinadas primero con un conjunto adecuado de filtros montados en un microscopio de epifluorescencia. Posteriormente, las secciones se impregnaron con medio específico (Vectashield, Vector Laboratories) y se examinaron con un microscopio confocal (MRC 1024; Bio-Rad, Natford, UK) equipado con un láser Kriptón/Argón. Se utilizó un láser de 2 líneas con emisiones a 550 y 650 nm de longitud de onda, para excitar Cy3 y Cy5, respectivamente. Las imágenes digitalizadas fueron transferidas a una computadora personal con un programa para captura de imágenes (Confocal Assitant, TC Brelje). La omisión del anticuerpo primario resultó en la ausencia de señales de inmuofluorecencia detectables (datos no mostrados).

## 7. Fármacos

Los fármacos, preparados el día del experimento, fueron disueltos en solución salina a partir de soluciones concentradas y se administraron utilizando un sistema de perfusión por gravedad. El tiempo requerido para obtener las concentraciones equilibradas de los fármacos en la cámara de registro fue de 5 a 6 minutos. La ACh fue aplicada localmente a una distancia aproximada de 50  $\mu\text{m}$  de la neurona registrada (ver los detalles anteriormente). La tetrodotoxina (TTX), el antagonista del receptor a N-metil-D-aspartato (NMDA): ácido DL-2-amino-5-fosfonoaléxico (AP5), el antagonista del receptor a L- $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazolepropionato (AMPA/kainato): 6-ciano-2,3 dihidroxi-7-nitroquinoxalina (CNQX), metil-yoduro de (-)bicuculina, 5-hidroxitriptamina (5-HT), mecamilamina (MEC), metilcaconitina (MLA), hidrobromuro de dihidro- $\beta$ -eritroidina (DH $\beta$ E), atropina, 4-aminopiridina (4-AP) y biocitina fueron adquiridos de Sigma Aldrich RBI Co (St. Louis, MO).

## 8. Análisis de los datos

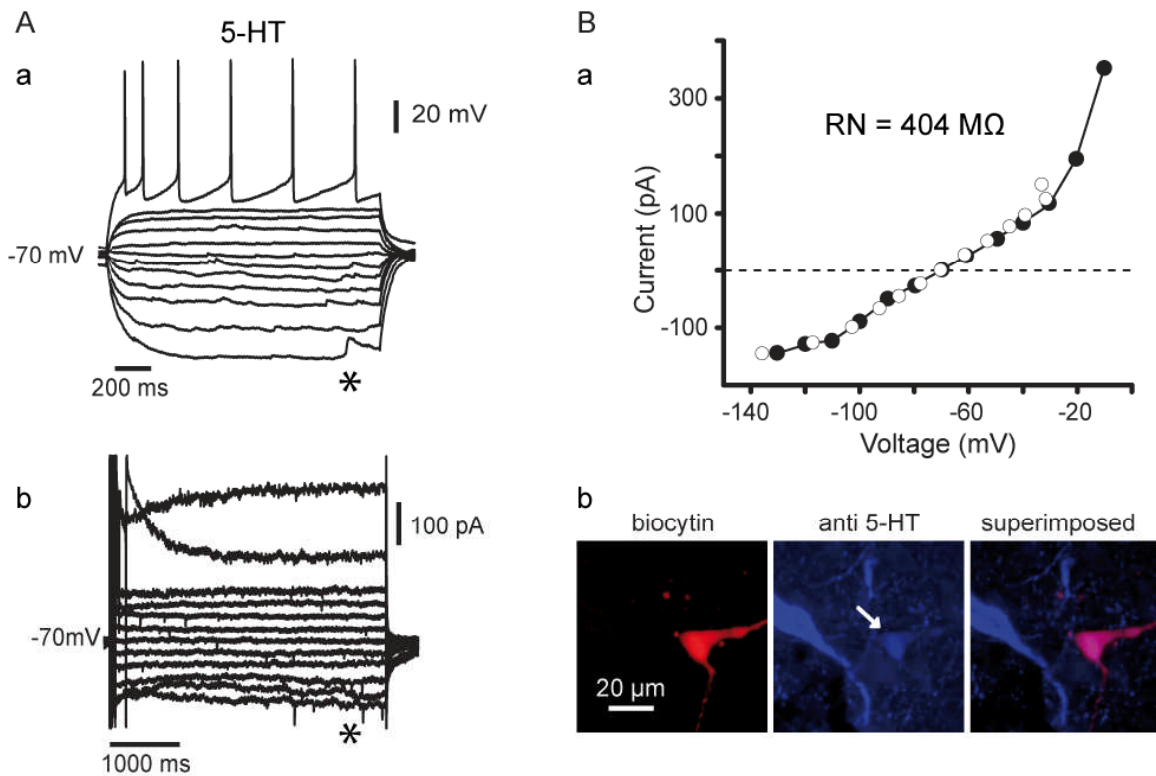
El análisis *a posteriori* de los datos se realizó con los programas Clampfit 8 (Axon Instruments, Union City, CA), Mini Análisis v.6.0.3 (Synaptosoft, Decatur, GA) y los paquetes de gráficas y estadística (Origin v.6. Microcal, Northampton MA y Systat, Richmond CA). Los datos están expresados como promedios  $\pm$  S.E.M. Las comparaciones estadísticas entre los datos no alterados fueron hechas con la prueba de U de Mann-Whitney ( $P < 0.05$  fue tomado como significativo).

# V. RESULTADOS

## 1. Identificación anatómica y electrofisiológica de las neuronas 5-HT y no 5-HT.

Se registraron 147 células que se encontraban en la región media del NDR. Se procesaron 56 neuronas con la técnica de inmunocitoquímica y 20 de ellas fueron identificadas como serotoninérgicas (llamadas neuronas 5-HT, Fig 6Bb; 20 de 56 = 36%). 36 neuronas fueron no-serotoninérgicas (llamadas no 5-HT, 36 de 56 = 64%). Además, las neuronas 5-HT y no 5-HT fueron identificadas en base a sus diferentes propiedades electrofisiológicas (Beck y cols., 2004; Li y cols., 2001; Marinelli y cols., 2004). Las figuras 6Aa, b muestran los trazos de corriente y voltaje obtenidos de la neurona que se ilustra en la figura 6Bb. Las respuestas de voltaje y de corriente a los pulsos hiperpolarizantes y despolarizantes (Fig. 6Aa) o a los comandos de voltaje (no mostrados) (Fig. 6Ab; las corrientes de acción no fijadas se cortaron), fueron utilizadas para construir las relaciones de corriente-voltaje (curvas I-V)(Fig. 6Ba). Los círculos rellenos fueron tomados de los trazos de corriente y los círculos vacíos de los trazos de voltaje, respectivamente. La sobreposición de estas curvas I-V, tomadas con las dos diferentes técnicas, sugieren que la resistencia en serie y el balanceo del puente no

agregan una desviación electrofisiológica. La inspección directa (Fig. 6Ba) revela que las curvas I-V no son lineales. Después de ajustar una función polinomial de tercer orden se obtuvo la primera derivada de dicha función y la resistencia de entrada de la neurona (RN) fue calculada en el punto de corriente cero al cruzar el eje del voltaje. Como se había reportado anteriormente (Aghajanian y Vandermaelen, 1982; Liu y cols., 2002), la RN de las neuronas 5-HT fue significativamente más grande (promedio  $\pm$  SEM)  $451 \pm 47$  M $\Omega$  (n=12) que la obtenida de las neuronas no 5-HT:  $264 \pm 14$  (n=14) (P<0.01). Las neuronas no 5-HT (Figs. 6C, D) exhibieron frecuencias de disparo más altas (Fig. 6 Ca) y una clara separación, con pendiente cercana a cero, entre la rectificación entrante y saliente en la curva I-V (Fig. 6 Da).



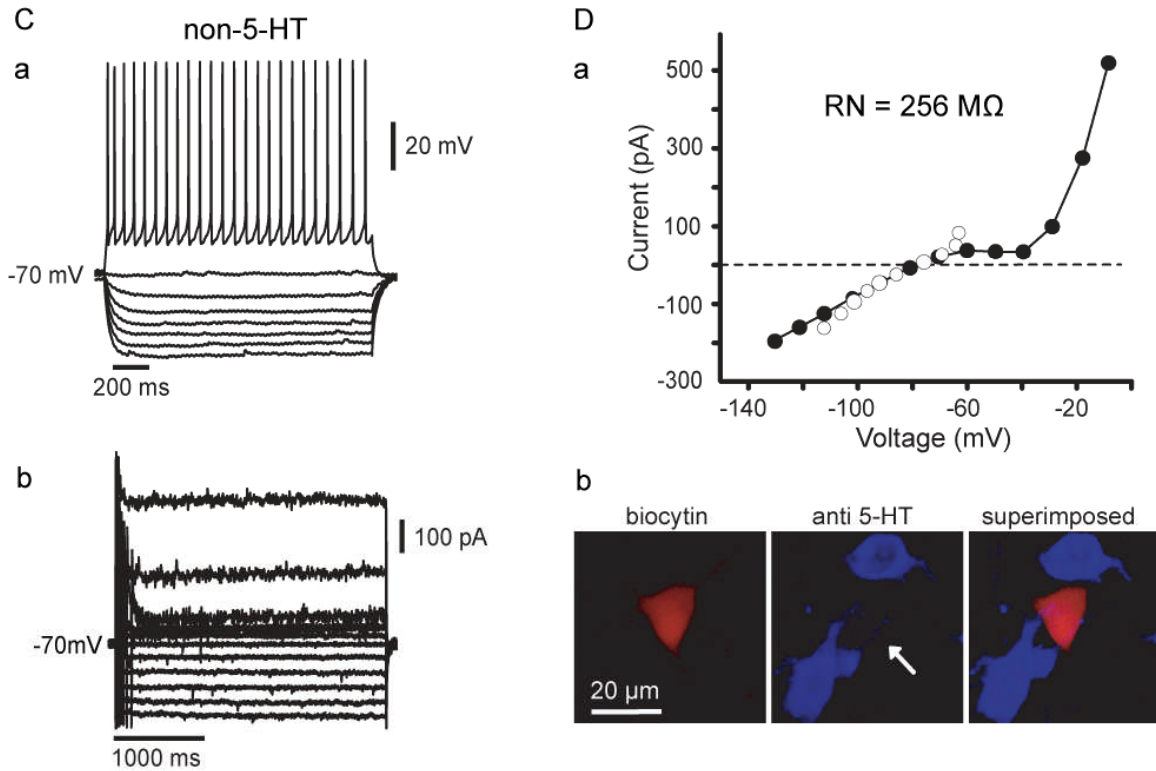


Fig. 6. Características electrofisiológicas de las neuronas serotoninérgicas y no serotoninérgicas del núcleo dorsal del rafe. (A) Trazos de voltaje (a) y trazos de corriente (b) despolarizantes e hiperpolarizantes en respuesta a los pulsos de voltaje o de corriente (no mostrados) respectivamente, registrados en una neurona serotoninérgica (5-HT). El potencial de mantenimiento = -70 mV. (B) Curvas de corriente-voltaje (curvas I-V) de la neurona indicada en A (a). Los trazos fueron medidos al final de la respuesta, como se indica con el asterisco (\*). Los círculos llenos son mediciones de los trazos de corriente y los círculos vacíos superpuestos son medidas de trazos de voltaje. Una función polinomial fue ajustada a los puntos de datos y la resistencia de entrada ( $R_N$ ) se obtuvo a partir de la primera derivada en el punto de corriente cero. Microfotografías (b) que ilustran la célula registrada después de la tinción con biocitina (izquierda), la inmunorreacción a 5-HT (en medio), y la sobreposición de ambas (derecha). (C) Trazos de voltaje (a) y trazos de corriente (b) en respuesta a comandos despolarizantes e hiperpolarizantes de voltaje y de corriente (no mostrados), respectivamente. Ambos tomados de una célula 5-HT y de una célula no-5-HT. El potencial de mantenimiento es de -70 mV. (D) Curvas I-V de la neurona en C (a). Las respuestas se midieron al final de los trazos. Los círculos llenos son mediciones obtenidas a partir de los trazos de corriente, los círculos vacíos superpuestos son mediciones hechas a partir de los trazos de voltaje. Nótese la clara separación entre la rectificación entrante y la saliente en la curva I-V,  $R_N$  fue obtenida de la misma forma que en (B). Se muestran las microfotografías de la célula registrada después de la tinción con biocitina (a la izquierda), la respuesta

inmunorreactiva de la célula negativa a 5-HT (en medio) y la sobreposición de ambas (a la derecha).

Una comparación de las propiedades de disparo de ambas clases de neuronas se muestra en la figura 7. Pulsos de corriente de intensidad creciente se aplicaron intracelularmente a la neurona. Se muestran varias respuestas representativas a los trazos de voltaje aplicados, tanto para una célula 5-HT (Fig. 7A) como para una célula no-5-HT (Fig. 7B). Las neuronas 5-HT exhibieron una frecuencia de disparo máxima de  $7.1 \pm 1.5$  Hz (n=13), mientras que las no-5-HT incrementaron su frecuencia de disparo hasta  $25 \pm 5$  Hz (n=8) ( $P < 0.001$ ). La figura 8 ilustra las curvas de intensidad – frecuencia promedio para ambas clases de neuronas (curvas I-F). Como se puede observar, las propiedades de disparo se pueden utilizar para distinguir ambos tipos de neuronas.

Adicionalmente, se ha reportado que los potenciales de acción (AP) de las neuronas 5-HT exhiben una inflexión durante la fase de repolarización del potencial de acción (Beck y cols., 2004; Marinelli y cols., 2004; Vandermaelen y Aghajanian, 1983). En nuestros experimentos, esta inflexión u hombro se encontró en 86% de las neuronas 5-HT y fue claramente detectada utilizando la primera derivada del AP (Fig. 9Ab). En contraste, 89% de las células no-5-HT no muestran esta inflexión durante la fase de repolarización del AP (Figs. 9Aa, a la derecha). Las duraciones promedio de los AP medidos desde la base fueron  $4.9 \pm 0.3$  ms (n=15) para las neuronas 5-HT y  $3 \pm 0.2$  ms (n=26) para las neuronas no-5-HT ( $P < 0.05$ ). Los diagramas de caja en la Figura 9B, ilustran las distribuciones de las mediciones en ambas clases de células. Las neuronas 5-HT y no-5-HT también difieren en la duración de los post-potenciales hiperpolarizantes (PPH) (Fig. 10), los cuales son más prolongados en las neuronas 5-HT (Fig. 10Aa). Los promedios de las duraciones de los PPH fueron  $356 \pm 19$  ms (n=15) para las neuronas 5-HT y  $226 \pm 12$  ms para las neuronas no-5-HT ( $P < 0.05$ ). Muchas de estas mediciones fueron hechas en neuronas identificadas con inmunocitoquímica (Fig. 10C y 10D), lo que demuestra la posibilidad de identificar la naturaleza de las células mediante métodos electrofisiológicos. Después de confirmar los métodos confiables para diferenciar las neuronas 5-HT de las no 5-HT en el NDR, decidimos verificar que la vía colinérgica que llega a estas células, estuviera preservada en las rebanadas coronales de tallo cerebral.

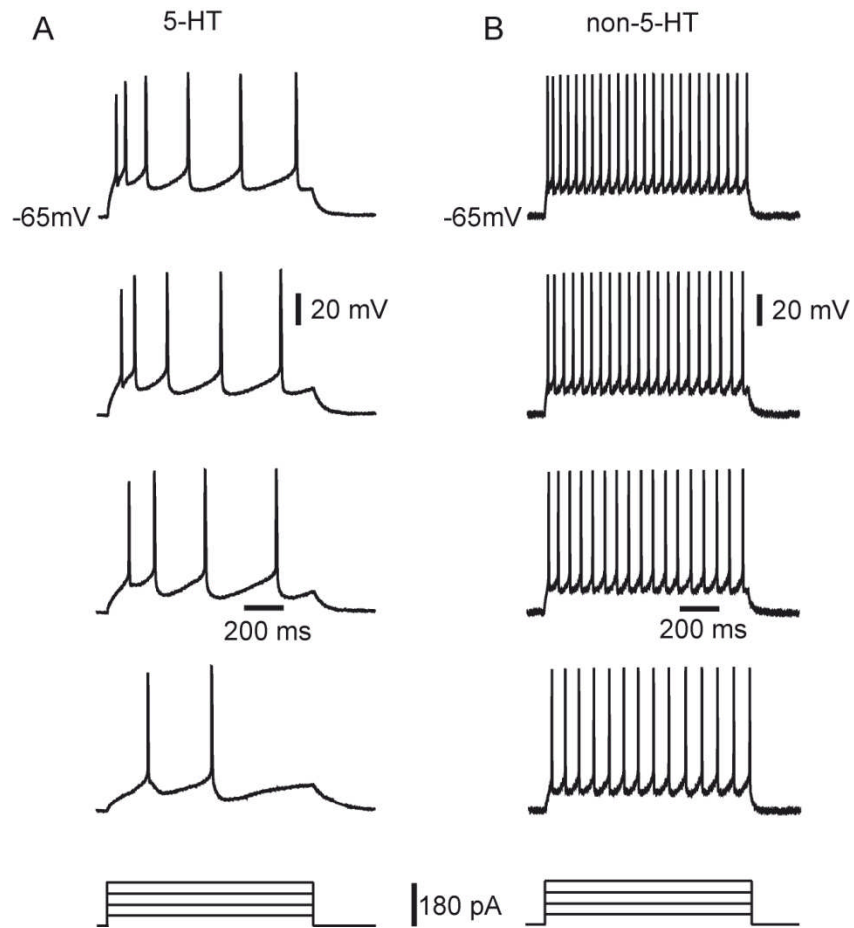


Fig. 7. Curvas de Frecuencia – Intensidad en las neuronas 5-HT y no 5-HT. (A) Muestras de registro del disparo repetitivo en respuesta a pulsos de corriente despolarizantes (mostrados abajo) de intensidad creciente (desde abajo hacia arriba) en una neurona 5-HT. (B) Disparo repetitivo en respuesta a pulsos despolarizantes de corriente de creciente intensidad (mostrados abajo) en una célula no 5-HT.

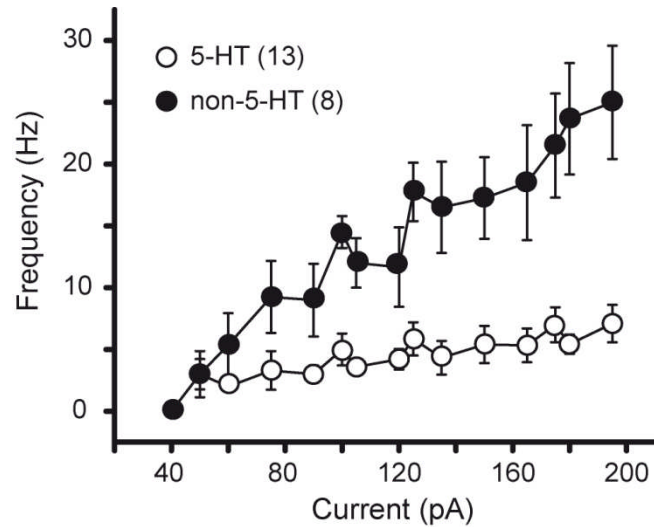


Fig. 8. Relaciones promedio de las pruebas de intensidad – frecuencia (Curvas I-F) construidas con protocolos similares a los que se muestran en la figura 7A y 7B obtenidos de 13 células 5-HT (círculos vacíos) y 8 células no 5-HT (círculos llenos). Las neuronas 5-HT exhibieron frecuencias de disparo más bajas y no sobrepasaron los 10 Hz. En contraste, las neuronas no 5-HT pudieron disparar a frecuencias más altas. Cada punto representa el promedio  $\pm$  SEM.

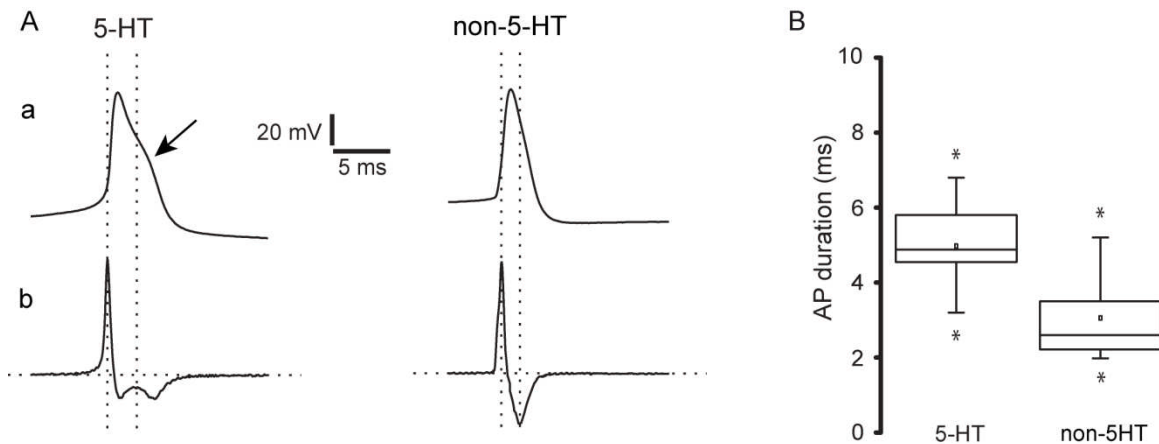


Fig. 9. Registro de potenciales de acción (PAs) con escalas de tiempo en el orden de los milisegundos, ocasionados por pulsos pequeños de corriente despolarizante (no mostrados) (Aa) en una célula 5-HT (a la izquierda) y en una célula no 5-HT (a la derecha). Nótese la repolarización del PA más lenta en las neuronas 5-HT. La derivada de estos PA (Ab) enfatiza las diferencias en la fase de repolarización. (B) Diagramas de caja comparando la duración del PA, medida al nivel umbral en muestras representativas de las neuronas 5-HT y no 5-HT (parte baja).



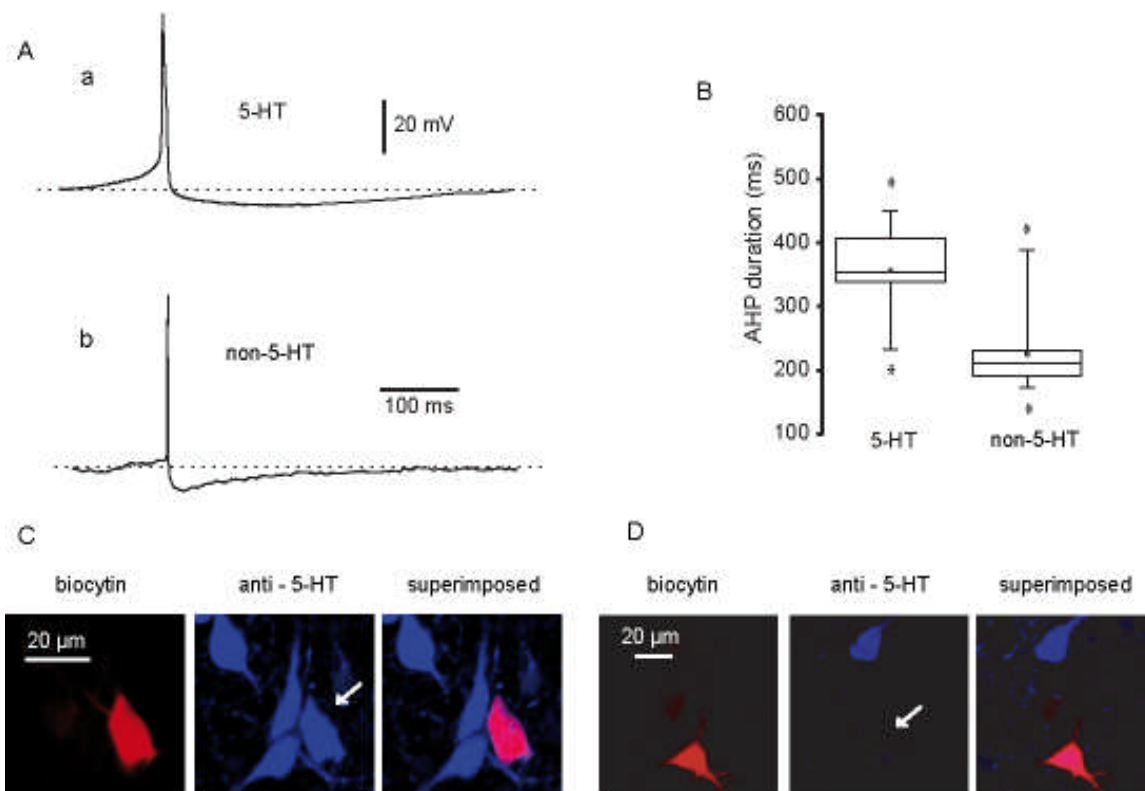


Fig. 10. Los post-potenciales hiperpolarizantes (PPH) de las neuronas 5-HT y no-5-HT tienen diferente duración. (A) Registro de un potencial de acción de una célula 5-HT (Aa) y una célula no 5-HT (Ab) provocados por un pulso despolarizante igual para ambos casos (no mostrado). Nótese el tiempo que transcurre para que el potencial de membrana regrese al estado basal (línea punteada). (B) Diagrama de cajas que muestra los promedios de las duraciones de los post-potenciales hiperpolarizantes (PPH). Para las neuronas 5-HT el promedio fue  $356 \pm 19$  ms ( $n=15$ ), mientras que para las neuronas no-5-HT fue  $226 \pm 12$  ms ( $P<0.05$ ). (C, D) Identificación inmunocitoquímica de las células registradas.

## La conexión núcleo pedúnculo pontino – núcleo dorsal del rafe.

Las figuras 11A y 11B ilustran el protocolo que se utilizó para lograr una estimulación ortodrómica de la vía pedúnculo pontina – rafe (conexión ortodrómica o sinapsis PPT→NDR). La estimulación eléctrica se hizo en el núcleo pedúnculo pontino tegmental (PPT) (Fig. 11A) mientras el registro se realizaba en una neurona de la parte central del NDR. Se ilustra una respuesta representativa (Fig. 11B1). Esta respuesta sináptica normalmente tiene una inflexión en la fase ascendente. Después de adicionar CNQX ( $10 \mu\text{M}$ ), AP5 ( $50 \mu\text{M}$ ) y bicuculina ( $10 \mu\text{M}$ ) para bloquear todas las corrientes ionotrópicas glutamatérgicas y GABAérgicas (Pan y Williams, 1989), una pequeña corriente sináptica permaneció (Fig. 11B2). Esta coincidió con la inflexión en la fase de ascenso de la

corriente sináptica completa. Esta corriente restante fue bloqueada completamente con MEC (10  $\mu$ M) (Fig. 11B3) lo cual indica la presencia de componente colinérgico nicotínico en la corriente sináptica evocada desde el PPT. A continuación, la localización de los electrodos de registro y de estimulación fue invertida (Fig. 12). El estímulo se aplicó en el NDR, mientras se registraba una neurona del PPT. Se registraron los potenciales de acción (AP) antidrómicos en 6 de 7 neuronas del núcleo PPT después de la estimulación del NDR (Fig. 12B1). Cuando los AP antidrómicos fueron precedidos por un AP evocado directamente por la aplicación de una breve corriente despolarizante en el PPT (Fig. 12B1), el intervalo entre ambos APs fue reducido hasta que ambos colisionaron (Fig. 12B2). Por lo tanto, se pudo concluir que parte de la conexión PPT  $\rightarrow$  NDR está preservada en estas rebanadas de tallo cerebral. Esta inferencia se confirmó poco después por el marcado anterógrado con biocitina (Fig. 13) (Ver la sección de Métodos e Ibañez-Sandoval y cols., 2006). Partiendo del sitio de inyección de biocitina en el PPT (flecha)(Fig. 13B) y dirigido hacia la localización del NDR cerca del acueducto (rectángulo en líneas discontinuas en la Fig. 13B), se pudo observar un conjunto numeroso y disperso de fibras con la tinción. Un acercamiento del NDR (Fig. 13C) mostró claramente la existencia de fibras que contenían biocitina dentro del NDR. De esta manera, nuestros experimentos demuestran la funcionalidad de la conexión PPT  $\rightarrow$  NDR en la rebanada cerebral. También muestran que un componente colinérgico nicotínico puede ser aislado al estimular esta conexión y al añadir bloqueadores de los receptores a glutamato y a GABA. Los mismos resultados indican que las células del NDR tienen receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs) postsinápticos funcionales.

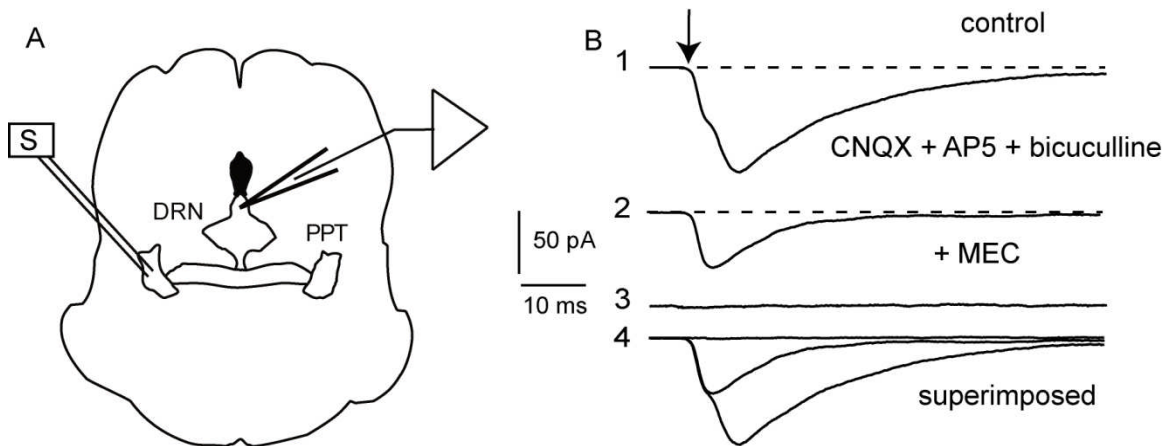


Fig. 11. La respuesta sináptica tiene un componente nicotínico. (A) Arreglo experimental utilizado para evocar las EPSCs de naturaleza colinérgica en neuronas del núcleo dorsal del raqué. El electrodo de estimulación de campo se encontraba localizado en el núcleo pedúnculo-pontino mientras se registraba una neurona en el NDR (conexión ortodrómica PPT  $\rightarrow$  NDR). (B) Corrientes sinápticas obtenidas durante la estimulación del núcleo PPT en neuronas 5-HT y no 5-HT del núcleo dorsal del raqué. La respuesta sináptica exhibe más de un componente en su fase ascendente (1). Después de la administración de 10  $\mu$ M CNQX, 50  $\mu$ M AP5 y 10  $\mu$ M bicuculina a la solución salina del baño (2), una

respuesta sináptica remanente pudo ser observada. Esta respuesta se pudo bloquear con mecamlamina (MEC), lo que sugiere que se trata de una corriente excitatoria postsináptica (EPSC) que fluye a través de los receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs). (3) Sobreposición de 1-3 (4).

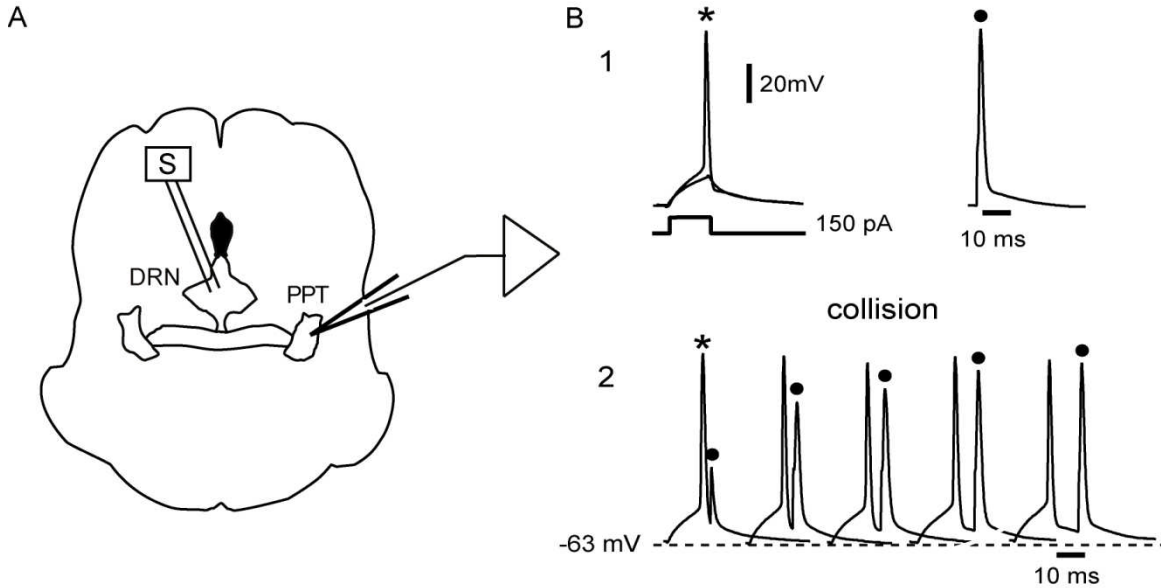


Fig. 12. Arreglo experimental utilizado para evocar potenciales de acción antidrómicos (PAs) en neuronas del núcleo PPT después de la estimulación de campo del NDR. Este arreglo muestra la integridad de la vía en las rebanadas coronales. (A) PA en una neuronas del núcleo PPT (PPT  $\rightarrow$  NDR) evocado por un pulso de corriente intracelular muy breve y consecuentemente un PA antidrómico (•) en la misma neurona, evocado por la estimulación en el NDR (1). (B) Un experimento de colisión con los PAs directo y antidrómico se ilustra. (2) El PA antidrómico es abolido cuando el tiempo del intervalo es  $\leq 2.5$  ms.

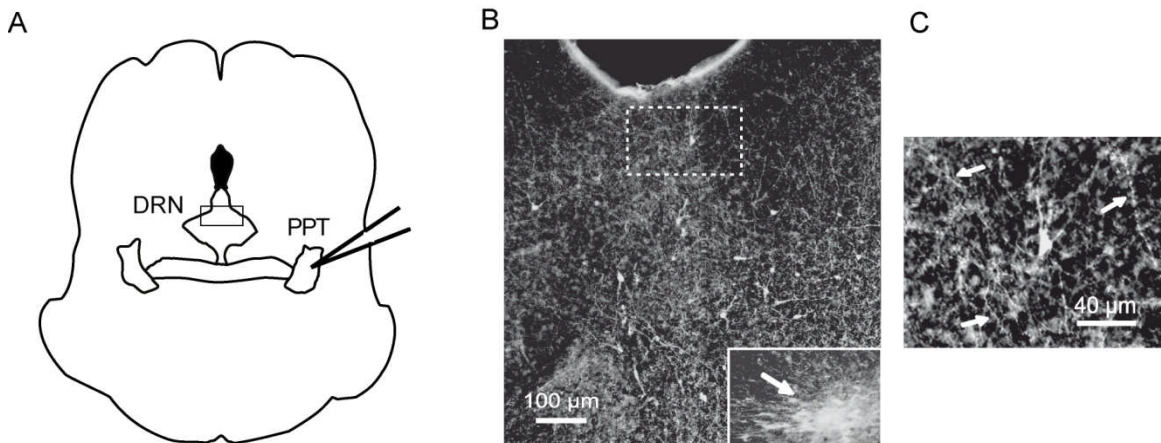


Fig. 13. (A) Esquema que muestra el arreglo experimental utilizado para teñir e identificar las fibras de la vía pedunculopontino-rafé. La punta del electrodo inyectó biocitina gota a gota en la rebanada cerebral viviente (ver la Sección de Métodos e Ibáñez-Sandoval et al., 2006). (B) Las fibras teñidas pueden observarse diseminadas alrededor del sitio de inyección (flecha) en el núcleo PPT y el NDR (el rectángulo con la línea punteada). (C) Aumento del rectángulo señalado en B que muestra la abundancia de las fibras teñidas de la vía pedunculopontino-rafé (flechas).

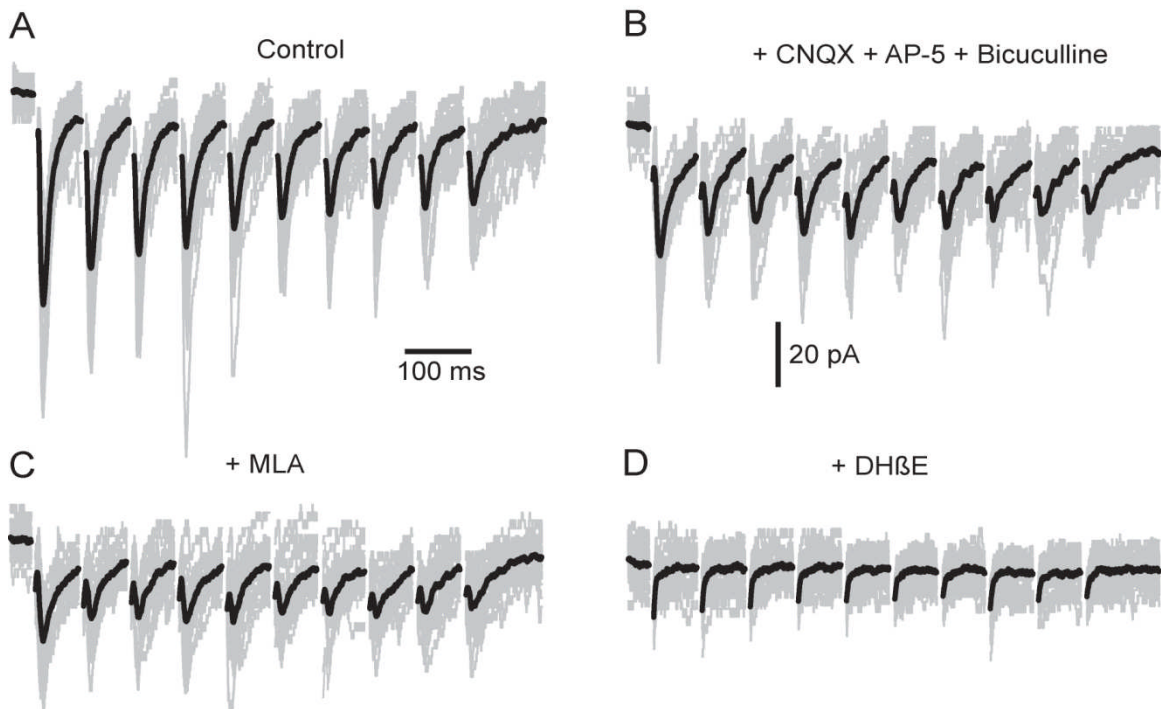
## Respuestas nicotínicas postsinápticas en neuronas del NDR.

Para caracterizar aún más la respuesta sináptica evocada desde el PPT, se diseñaron protocolos de estimulación repetida evocada (trenes) que consistieron en la aplicación de 10 estímulos a 14 Hz, 1 cada 10 segundos; en la conexión PPT → NDR. La Figura 14A muestra que en respuesta a un estímulo repetitivo de 14 Hz, la dinámica de corto plazo de la respuesta íntegra (respuesta sináptica compuesta) es la depresión a corto plazo (STD). La STD estuvo presente en todas las frecuencias estudiadas. La latencia de la primera corriente postsináptica evocada fue de  $7 \pm 0.1$  ms ( $n = 9$ ) y permaneció constante para todas las intensidades de estimulación, lo que confirmó la existencia de una conexión monosináptica. El trazo en negro es el promedio de 80 estímulos y los trazos en gris representan cada uno de estos estímulos, mostrando que existe variabilidad cuántica.

Después de la adición de CNQX, AP5 y bicuculina a la solución del baño, la amplitud de la respuesta decreció y se aisló el componente nicotínico (Fig. 14B). Esta reducción en la amplitud se acompañó de un cambio en la pendiente de la relación entre varianza y promedio (gráfica V-P), partiendo desde  $14.6 \pm 1.35$  (pendiente  $\pm$  SE) en la situación control hasta  $3.8 \pm 0.5$  después del bloqueo de los receptores GABAérgico y glutamatérgico (Fig. 14E,  $P < 0.001$ , prueba t de Student). No obstante, la depresión a corto plazo fue el tipo de plasticidad predominante para la respuesta nicotínica. La adición de MLA (100 nM), un antagonista selectivo de los nAChRs conformados por la subunidad  $\alpha 7$ , decrementó la amplitud de las corrientes sinápticas (Fig. 14C), aunque no abolió completamente las respuestas en todas las células (ver más adelante). La pendiente de la gráfica V-P después del efecto de MLA fue  $2.7 \pm 0.3$  (Fig. 14E,  $P < 0.001$  con respecto al control y  $P < 0.05$  con respecto a MLA). Después de MLA, la STD permaneció como el tipo de plasticidad identificado. Con la posterior adición de DH $\beta$ E (100 nM), un antagonista selectivo de los nAChRs con subunidades  $\alpha 4\beta 2$  y en la presencia continua de los bloqueadores previamente mencionados, se abolieron completamente todas las respuestas sinápticas (Fig. 14D). Esto indica que en algunas células, los dos tipos de receptores nicotínicos están involucrados en la conformación de esta respuesta. Se obtuvieron resultados similares si se aplicaba primero DH $\beta$ E y después MLA (no mostrado) lo que sugiere que ambos receptores nicotínicos se encuentran en la membrana postsináptica.

Debido a que los puntos utilizados para la construcción de las gráficas V-P (Ibáñez-Sandoval y cols., 2006) solo se pudieron ajustar con líneas rectas, se puede inferir que estas terminales tienen una baja probabilidad de liberación (Clements y Silver, 2000). La Figura 14F ilustra que la célula a partir de la cual se obtuvieron los registros es una neurona 5-HT. Se detectó un componente nicotínico en 9 de 13 conexiones PPT → NDR

evaluadas de esta forma (69%). Tres de estas conexiones tuvieron una neurona 5-HT como célula blanco y 6 tuvieron una neurona no-5-HT. MEC (10  $\mu$ M) se probó en dos neuronas y bloqueó la respuesta completamente. En 5 de 9 células, las ePSCs nicotínicas fueron bloqueadas completamente con DH $\beta$ E cuando se administró al inicio, lo que indica una marcada expresión de los nAChRs con la subunidades  $\alpha$ 4 $\beta$ 2 en las neuronas de este núcleo. En 2 de 9 neuronas (una “+” y la otra “-“ para 5-HT), las ePSCs solo pudieron ser completamente bloqueadas con la administración de tanto MLA como DH $\beta$ E, lo que sugiere que algunas células expresan nAChRs tanto con las subunidades  $\alpha$ 4 $\beta$ 2 como con las  $\alpha$ 7.



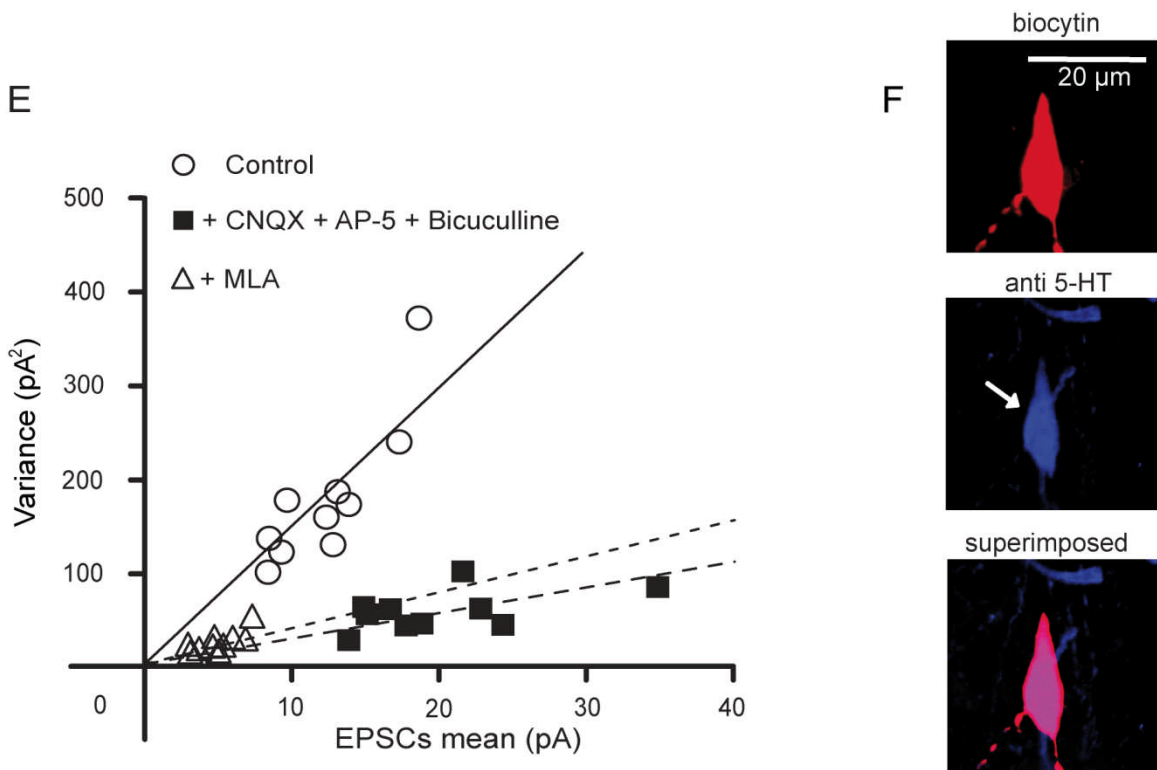


Fig. 14. EPSCs evocadas en neuronas del NDR por la estimulación del núcleo PPT. (A) Trenes de 10 EPSCs evocadas a 14 Hz muestran la depresión sináptica como la dinámica de corto plazo predominante de la conexión PPT → NDR (control). El trazo en negro es el promedio de 80 pulsos de evocación consecutivos. Los trazos en gris son los trazos individuales que muestran variación cuantal. (B) CNQX (10 μM), AP5 (50 μM) y bicuculina (10 μM) no bloquearon pero decrementaron la amplitud de los EPSCs. (C) La adición del antagonista selectivo de los nAChRs α7, MLA (100 nM) redujo aún más la amplitud de los EPSCs pero no los bloqueó completamente. La dinámica de corto plazo predominante aún fue la depresión sináptica. (D) La adición del antagonista selectivo de los nAChRs α4β2, dihidro-β-eritroidina (DHβE) a una concentración de 100 nM, con la continua presencia de los otros bloqueadores, abolió las EPSCs remanentes. (E) Gráficas de varianza-promedio en diferentes condiciones: varianzas pico promedio de las EPSCs en función de las amplitudes pico promedio de las EPSCs claramente demuestran tres diferentes cúmulos de datos de puntos que únicamente pudieron ser ajustados con tres líneas rectas diferentes, lo que sugiere que todos los bloqueadores actúan post-sinápticamente y que estas terminales poseen una baja probabilidad de disparo en cualquiera de las tres condiciones anteriores (las líneas rectas tienen diferentes pendientes, ver la Sección de Métodos). (F) La célula cuyos registros se muestran en A-D fue inmunorreactiva a 5-HT (flecha blanca).

Para validar estos resultados, se procedió al estudio del bloqueo de las corrientes entrantes producidas en las neuronas del NDR por la administración focal de ACh. La ACh fue aplicada por presión a una concentración de 1 mM. Para ello, se utilizó una pipeta localizada muy cerca de la célula registrada, aproximadamente a 50 μm del soma.

Se probaron 36 neuronas con este método, utilizando el registro de fijación de voltaje en la configuración de célula entera, a un potencial de mantenimiento de -70 mV. Adicionalmente, se agregaron al baño atropina (5  $\mu$ M) y TTX (1  $\mu$ M) para bloquear los receptores muscarínicos y los efectos indirectos dependientes del potencial de acción, respectivamente. Por lo anterior, podemos afirmar que las respuestas descritas a continuación son directas, postsinápticas y por la activación de receptores nicotínicos. La ACh evocó corrientes entrantes en 24 de 36 neuronas analizadas. Estas corrientes entrantes exhibieron dos componentes cinéticos diferentes: uno lento y uno rápido. La Figura 15 ilustra los experimentos representativos en las neuronas 5-HT. A continuación, se describen los resultados de estos experimentos, que también fueron observados en las neuronas no 5-HT (no mostrados). La Figura 15A ilustra un caso en el cual ambas corrientes entrantes, lenta y rápida, fueron provocadas por la administración local de ACh. Ambos componentes fueron bloqueados con el antagonista no específico de nAChRs MEC (10  $\mu$ M). El componente lento fue bloqueado primero, lo que sugiere que existen diferentes sensibilidades de los dos componentes para MEC, es decir, diferentes blancos moleculares. La figura 15B muestra una neurona que solo exhibió una corriente entrante rápida, que no fue afectada por la aplicación del antagonista específico para las subunidades  $\alpha 4\beta 2$  de los nAChRs, la DH $\beta$ E (100 nM). Sin embargo, fue completamente bloqueada por el antagonista específico para las subunidades  $\alpha 7$  de los nAChRs, MLA (100 nM). Este experimento fundamenta el postulado de que las corrientes entrantes lenta y rápida resultan de las activaciones de dos diferentes receptores. A continuación, se muestra en la figura 15C, una neurona que solo exhibió una corriente entrante lenta. Esta corriente fue bloqueada con el antagonista específico para las subunidades  $\alpha 4\beta 2a$  de los nAChRs: DH $\beta$ E (100 nM). Los experimentos anteriores confirman que los receptores nicotínicos postsinápticos en estas células pertenecen a dos tipos diferentes y que ambos pueden estar presentes en la misma neurona postsináptica. De hecho, 15 de 24 neuronas (63%) solo mostraron el componente lento y sensible a DH $\beta$ E. De estas 15 células, 5 fueron identificadas como 5-HT y 10 como no 5-HT. Por otro lado, 4 células de 24 (17%) solo exhibieron el componente rápido. 3 de ellas fueron 5-HT y 1 no 5-HT. Finalmente, 5 células de 24 (21%) exhibieron ambos componentes. Tres fueron 5-HT y dos fueron no 5-HT. En 12 de 36 neuronas (33%) ninguna respuesta fue observada después de la aplicación del pulso por presión de ACh. Los promedios de las amplitudes para las corrientes nicotínicas lentas y rápidas fueron  $156 \pm 52$  pA para la rápida y  $33 \pm 5$  pA para la corriente lenta. Los tiempos de ascenso al 90% de la corriente pico fueron  $39 \pm 7$  ms para la corriente rápida y  $459 \pm 53$  ms para la corriente lenta. Los registros en las figuras 15A-15C corresponden de manera respectiva a las figuras 15D-15F que muestran a las neuronas 5-HT identificadas con inmunocitoquímica.

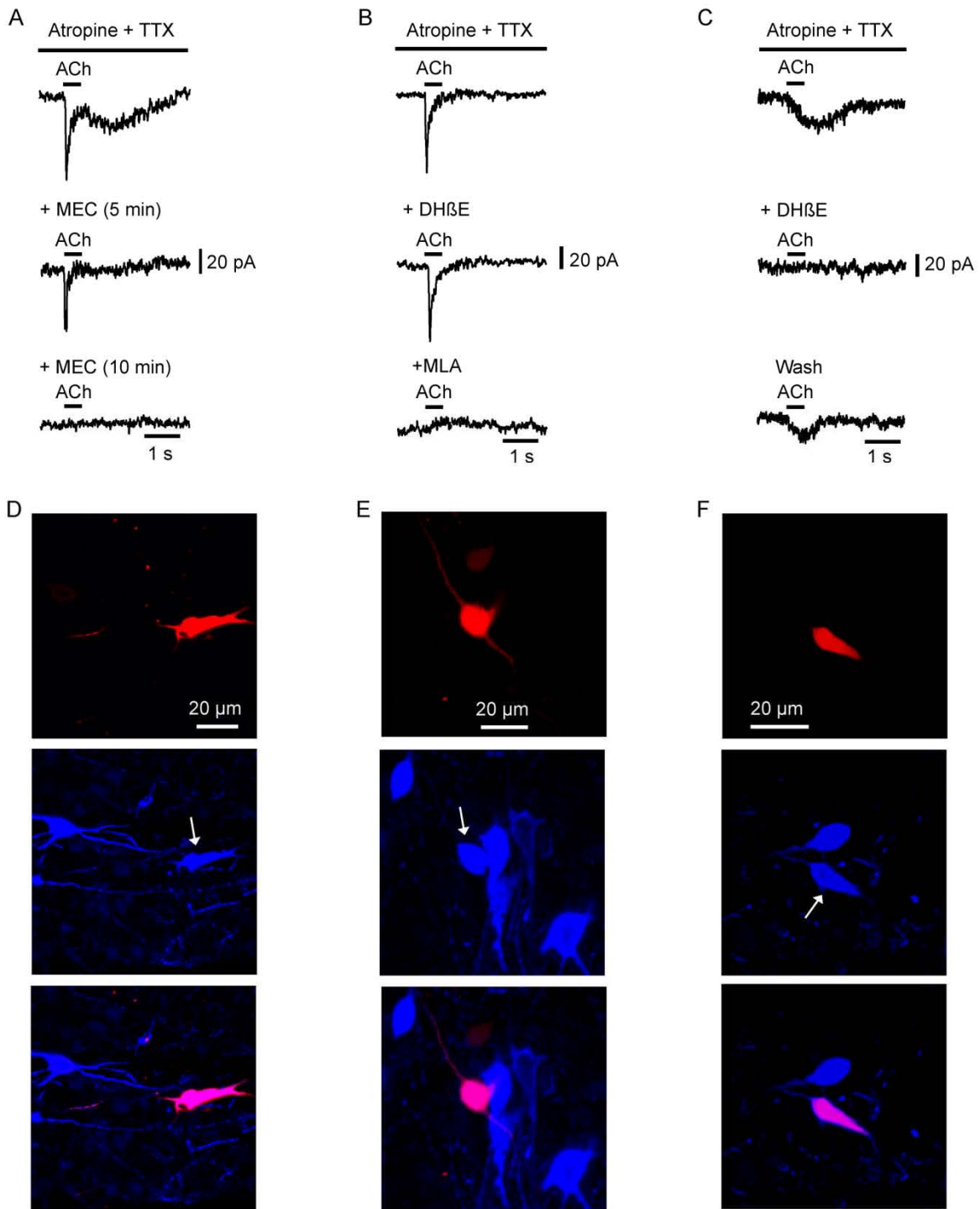


Fig. 15. La administración focal de ACh evocó corrientes entrantes en las neuronas 5-HT. (A) Desde arriba hacia abajo: un “soplo” de ACh (1 mM, 500 ms) aplicado a una neurona 5-HT evocó corrientes entrantes que mostraron dos componentes: rápido y lento (trazo superior). El componente lento fue bloqueado completamente 5 minutos después de la aplicación de MEC (10 μM, trazo medio), mientras que el componente rápido fue

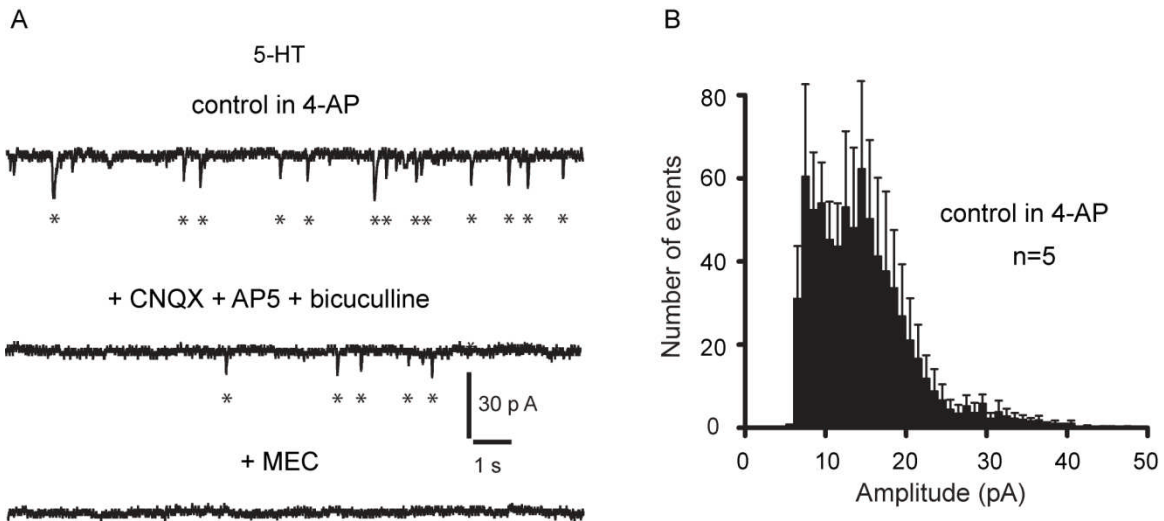


bloqueado subsecuentemente 10 minutos después de la aplicación del fármaco al baño (trazo inferior). (B) Se ilustra una célula que sólo exhibió la corriente rápida después del soplo de ACh (trazo superior). La corriente rápida fue insensible a la aplicación del antagonista selectivo a  $\alpha 4\beta 2$  DH $\beta$ E (100 nM, trazo medio). Sin embargo, fue bloqueado con la aplicación del antagonista selectivo a  $\alpha 7$ , MLA (100 nM, trazo inferior). (C) Se ilustra una célula que sólo mostró el componente lento después del soplo de ACh (trazo superior). La corriente lenta fue sensible a DH $\beta$ E (trazo medio). El efecto del antagonista fue reversible (trazo inferior). Todos estos registros se realizaron en presencia de atropina (5  $\mu$ M) y TTX (1  $\mu$ M) para evitar los efectos muscarínicos e indirectos, respectivamente. (D, E, F) Identificación inmunocitoquímica de las neuronas 5-HT que respondieron a la aplicación focal de ACh (1mM). Cada imagen ilustra la neurona que fue registrada previamente (trazos superiores).

## **Corrientes postsinápticas espontáneas por activación de receptores nicotínicos.**

La evidencia final que demuestra el origen postsináptico de los eventos ocasionados por la activación de los receptores nicotínicos proviene de las corrientes postsinápticas espontáneas (sPSCs) registradas en las neuronas del NDR en la configuración de fijación de voltaje en célula completa. Se detectó una subpoblación de sPSCs sensible a los antagonistas de receptores nicotínicos en 66% de las células (12 de 18), de las cuales 42% (5 de 12) fueron inmunopositivas a 5-HT (Fig. 16) y el resto no lo fue (Fig. 17). En condiciones control, la frecuencia de los sPSCs fue baja ( $0.26 \pm 0.03$  Hz) en ambas clases de neuronas. Sin embargo, después de la adición de 4-AP (100  $\mu$ M) en el baño, la frecuencia de las sPSCs se incrementó (Figs. 16A y 17A, parte superior) (Flores-Hernández y cols., 1994, 1997; Tibbs y cols., 1989) a  $2.8 \pm 0.5$  Hz (Promedio  $\pm$  SEM) para las neuronas 5-HT y  $1.6 \pm 0.4$  Hz para las no 5-HT ( $P < 0.01$ ). Los histogramas de amplitudes se construyeron con datos provenientes de 15 minutos de registro antes y después de la adición de los antagonistas específicos para los receptores de glutamato y GABA, en células que fueron identificadas posteriormente con la técnica de inmunocitoquímica (ver Sección de Métodos). Los histogramas control se muestran en la parte derecha. La mediana de la amplitud de las sPSCs fue  $9.9 \pm 3.6$  pA para las neuronas 5-HT. El histograma muestra una primera moda en el valor cercano a 10 pA (Fig. 16B). La amplitud de la mediana para las neuronas no 5-HT fue de  $12.03 \pm 2.5$  pA (Fig. 17B). Después de añadir los antagonistas específicos de los receptores glutamatérgicos y GABAérgicos (CNQX 10  $\mu$ M, AP5 50  $\mu$ M y bicuculina 10  $\mu$ M), fue posible aislar las sPSCs producidas por nAChRs en ambas clases de células (Figs. 16A y 17A, trazos superior y medio). Por sí misma, esta maniobra disminuyó la frecuencia promedio de las sPSCs a  $0.39 \pm 0.09$  Hz en las neuronas 5-HT ( $P < 0.01$ ) y a  $0.37 \pm 0.08$  Hz en las neuronas no 5-HT ( $P < 0.01$ ), dando una probabilidad de liberación similar (baja) en todas las entradas (Fig. 14E). Este hallazgo significa que los eventos nicotínicos constituyen cerca del 13% de todas las entradas postsinápticas funcionales en las neuronas 5-HT y cerca del 23% en las neuronas no 5-HT. Notar que, aunque la frecuencia de las sPSCs es significativamente diferente (ver arriba) en la situación control en donde se aprecian todas las respuestas ionotrópicas; esto no es significativamente diferente

cuando el componente nicotínico se aísla, lo que sugiere que ambas clases de células reciben entradas a partir de las mismas aferencias. A pesar de un cambio en la frecuencia de las sPSCs, después de la aplicación de los bloqueadores a GABA y glutamato (ver Figs. 16C, 16D, 17C y 17D), la mediana de la amplitud no cambió significativamente: para las neuronas 5-HT fue de  $9.6 \pm 3.1$  pA y para las neuronas no 5-HT fue de  $13.01 \pm 3.5$  pA. Esto significa que las amplitudes de las respuestas nicotínicas son básicamente las mismas que en la respuesta compuesta (glutamato, GABA y colinérgica nicotínica). Las sPSCs por nAChRs fueron completamente abolidas con la aplicación del antagonista para nAChRs MEC (10  $\mu$ M) (Figs. 16A y 17A trazos en la parte inferior). Las neuronas representadas en las figuras 16A-16D fueron inmunopositivas a la reacción con el anticuerpo a 5-HT, mientras que las representadas en las figuras 17A-17D no fueron inmunorreactivas.



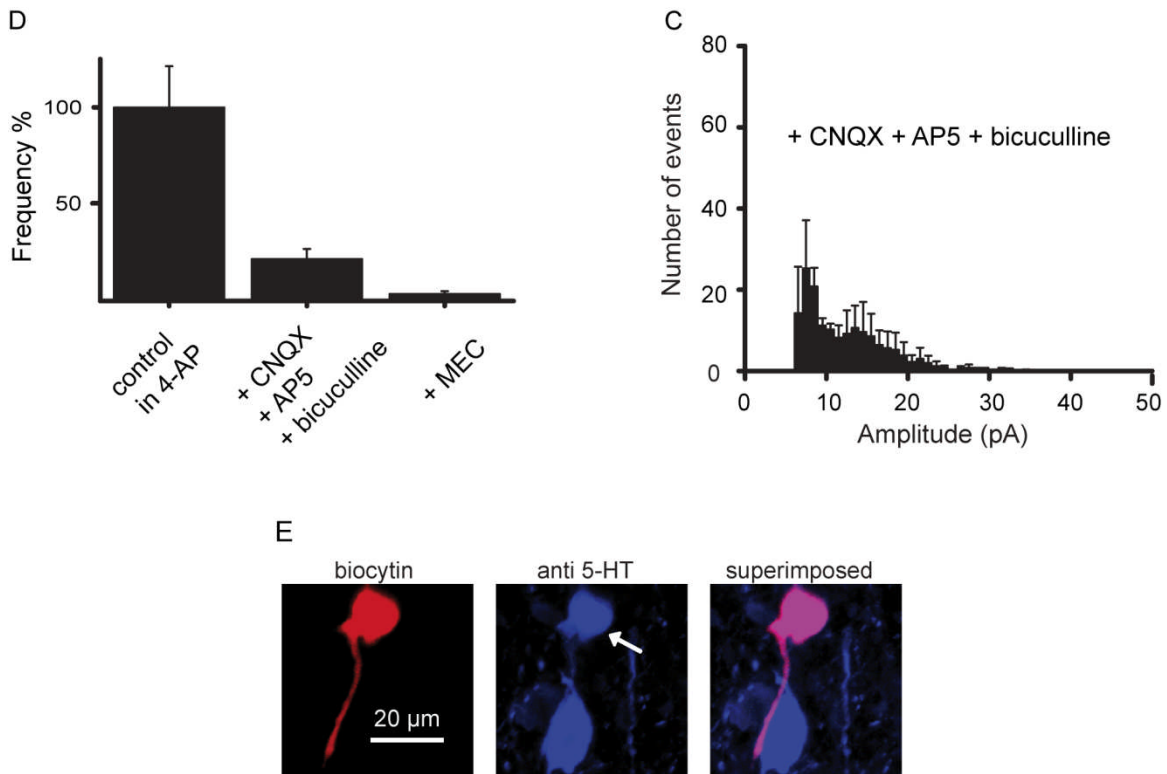


Fig. 16. Mecamilamina bloquea las EPSCs espontáneas en neuronas 5-HT. (A) Desde arriba hacia abajo: Se observan corrientes espontáneas postsinápticas (sPSCs) inducidas por la aplicación de 100 nM de 4-aminopiridina (4-AP) a la solución externa (registro superior) registradas a un potencial de mantenimiento de -70 mV. Notar que la frecuencia de los sPSCs es solamente reducida por la adición de CNQX (10 μM), AP5 (50 μM) y bicuculina (10 μM) (trazo medio). Las restantes sEPSCs fueron bloqueadas con 10 μM mecamilamina (MEC). (B) Histogramas de amplitud de los sEPSCs obtenidos a partir de una muestra de neuronas 5-HT. (C) Histograma de amplitud de las EPSCs obtenidas de la misma muestra de neuronas 5-HT después de añadir los bloqueadores glutamatérgicos y GABAérgicos (trazo medio en A). Nótese que el decremento en el número de eventos no cambió el rango de amplitud de los mismos. (D) Histograma que resume los resultados de una muestra de neuronas 5-HT bajo las tres diferentes condiciones mencionadas. (E) Las células representadas en A-D fueron inmunorreactivas al anticuerpo para 5-HT.

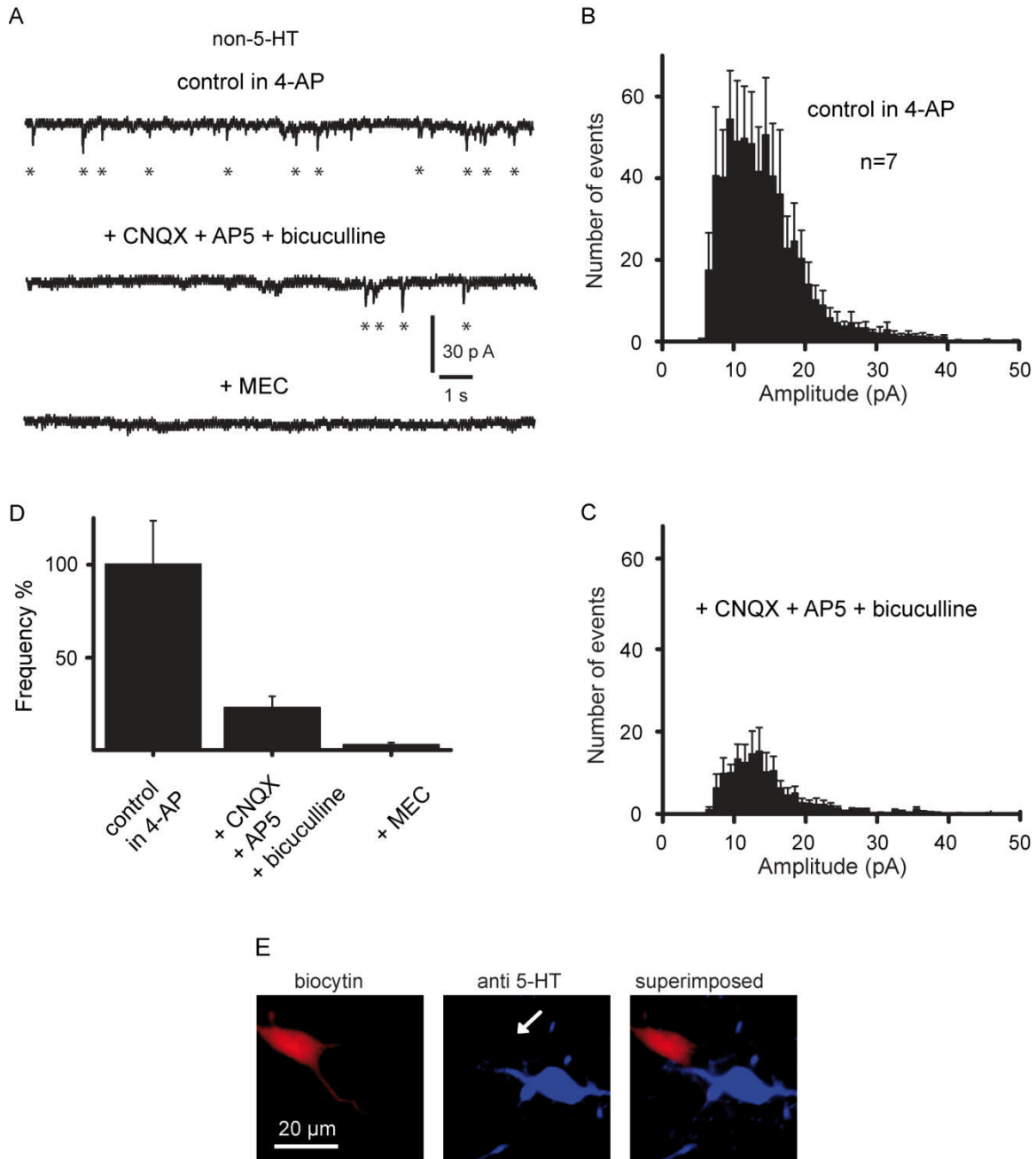


Fig. 17. Mecamilamina bloquea las EPSCs espontáneas en neuronas no 5-HT. (A) Desde arriba hacia abajo: Se observan corrientes espontáneas postsinápticas (sPSCs) inducidas por la aplicación de 100 nM de 4-aminopiridina (4-AP) a la solución externa (registro superior) registradas a un potencial de mantenimiento de -70 mV. La frecuencia de los sPSCs es reducida por la adición de CNQX (10  $\mu$ M), AP5 (50  $\mu$ M) y bicuculina (10  $\mu$ M) (trazo medio). Las restantes sEPSCs fueron bloqueadas con 10  $\mu$ M mecamilamina (MEC). (B) Histogramas de amplitud de los sEPSCs obtenidos a partir de una muestra de neuronas no 5-HT. (C) Histograma de amplitud de las EPSCs obtenidas de la misma muestra de neuronas no 5-HT después de añadir los bloqueadores glutamatérgicos y

GABAérgicos (trazo medio en A). Nótese que el decremento en el número de eventos no cambió el rango de amplitud de los mismos. (D) Histograma que resume los resultados de una muestra de neuronas no 5-HT bajo las tres diferentes condiciones mencionadas. (E) Las células representadas en A-D no fueron inmunorreactivas al anticuerpo para 5-HT.

## VI. DISCUSIÓN

El principal hallazgo de este estudio consistió en la identificación de nAChRs postsinápticos funcionales con subunidades  $\alpha 7$  y  $\alpha 4\beta 2$ , en neuronas serotoninérgicas y no serotoninérgicas del NDR. Adicionalmente, se demostró la existencia funcional de la vía PPT  $\rightarrow$  NDR que activa a estos nAChRs postsinápticos.

La funcionalidad de los nAChRs fue demostrada con la estimulación ortodrómica, los registros de los eventos postsinápticos y las aplicaciones directas de ACh.

Los resultados de estos experimentos se correlacionan con estudios previos que muestran la presencia de las subunidades  $\alpha 4$ ,  $\beta 2$  y  $\alpha 7$  de los nAChRs en las neuronas del NDR (Bitner y cols., 2000; Bitner y Nikkel, 2002; Cucchiario y Commons, 2003; Seguela y cols., 1993; Wada y cols., 1989). Asimismo, se ha demostrado que la administración subcutánea de epibatidina, un potente agonista de los receptores colinérgicos nicotínicos de tipo  $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 3\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 4$  (Gerzanich y cols., 1995), incrementa la expresión de c-fos en neuronas del NDR (Cucchiario y Commons, 2003). Más aún, la evidencia anatómica muestra que las proyecciones colinérgicas hacia el NDR se originan en las áreas de los núcleos PPT y LDT, lo que confirma datos previos (Woolf y Butcher, 1989). Aunque no se había demostrado la funcionalidad de los receptores colinérgicos nicotínicos en el NDR, los registros extracelulares obtenidos en rebanadas de mesencéfalo indican que la nicotina incrementa la tasa de disparo de las neuronas 5-HT del NDR (Mihailescu y cols., 1998, 2002), y los estudios de fijación de voltaje en la configuración de célula completa han mostrado que los agonistas de los receptores colinérgicos nicotínicos generan corrientes entrantes lentas en las neuronas 5-HT del NDR (Li y cols., 1998). Sin embargo, estos últimos efectos fueron atribuidos a la liberación presináptica de noradrenalina a través de la activación de los nAChRs  $\alpha 7$  (Li y cols., 1998). Debido a que los agonistas de nAChRs se aplicaron en la solución del baño, la desensibilización de los nAChRs y/o la contaminación con un efecto indirecto pudieron haber ocurrido (Gray y cols., 1996; Pidoplichko y cols., 1997; Wu y cols., 2004). Para evitar estos inconvenientes, en el presente trabajo aplicamos ACh (1 mM) de manera local y directa, a través de un sistema de eyección por presión y estos experimentos se desarrollaron en presencia de TTX y atropina para evitar los efectos indirectos por la generación de potenciales de acción y estimulación de los receptores muscarínicos. En estas condiciones, la aplicación de ACh indujo corrientes entrantes que fueron bloqueadas por los antagonistas selectivos de nAChRs. Estos resultados concuerdan con aquellos obtenidos con la activación ortodrómica de la conexión PPT $\rightarrow$ NDR. La estimulación de campo dentro del núcleo PPT evocó las ePSCs producidas por receptores nicotínicos. Ambos protocolos demostraron la existencia de corrientes postsinápticas sensibles a MLA y DH $\beta$ E lo que indica la presencia de nAChRs  $\alpha 7$  y  $\alpha 4\beta 2$ . Se demostró que la conexión PPT $\rightarrow$ NDR es monosináptica, debido a que los cambios en la intensidad de la estimulación no cambiaron el tiempo de latencia a la primera ePSC. En conjunto, estos

experimentos demuestran la funcionalidad de los nAChRs postsinápticos en las células inyectadas con biocitina e inmunocitoquímicamente identificadas como neuronas 5-HT y no-5-HT del NDR.

Las ePSCs por receptores nicotínicos también demostraron que una vía que activa estos receptores postsinápticos es la conexión PPT→NDR. La viabilidad de esta conexión fue demostrada con la generación de los potenciales de acción antidrómicos en las neuronas del núcleo PPT, después de la estimulación de campo en el NDR. Estos APs antidrómicos colisionaron con APs directos inducidos en las células del núcleo PPT. Adicionalmente, se realizó el marcado anterógrado por difusión de las fibras que alcanzan el NDR; inyectando biocitina de manera localizada en el núcleo PPT (Ibañez-Sandoval y cols., 2006).

Las aplicaciones locales y directas de ACh generaron dos tipos de corrientes entrantes en neuronas identificadas como 5-HT del NDR. La primera de ellas, exhibió el perfil farmacológico y electrofisiológico de las corrientes mediadas por los nAChRs compuestos exclusivamente por subunidades  $\alpha 7$ : amplitud grande, tiempo de ascenso rápido, tiempo de decaimiento breve y sensibilidad al fármaco MLA (Klink y cols., 2001; Pidoplichko y cols., 2004; Woollorton y cols., 2003; Wu y cols., 2004). La segunda corriente exhibió una amplitud relativamente menor, cinéticas más lentas y sensibilidad a DH $\beta$ E: todas ellas características de las corrientes mediadas por el subtipo de nAChRs  $\alpha 4\beta 2$  (Pidoplichko y cols., 1997; Woollorton y cols., 2003; Wu y cols., 2004). En algunas neuronas, se observaron ambos tipos de corrientes ( $\alpha 4\beta 2$  y  $\alpha 7$ ). Las ePSCs también mostraron sensibilidad diferente a MLA y a DH $\beta$ E. De esta manera, los resultados obtenidos sugieren que tanto las subunidades  $\alpha 7$  como las  $\alpha 4\beta 2$  pueden formar nAChRs postsinápticos funcionales en las neuronas tanto 5-HT (+) como 5-HT (-) del NDR. Es necesaria una investigación adicional que permita conocer cuáles son los factores que regulan la expresión de estos receptores y las diferencias que existen entre las células que poseen una o ambas clases del receptor. En las presentes condiciones, se observó que las subunidades  $\alpha 7$  de los nAChRs se expresan mayormente que las subunidades  $\alpha 4\beta 2$  en las células 5-HT del NDR.

Finalmente, los registros de las sPSCs cuya frecuencia se incrementó con la aplicación de 4-AP (Flores-Hernández y cols., 1994, 1997) confirmaron que las neuronas 5-HT son el blanco de algunas de las aferencias colinérgicas provenientes del núcleo PPT. Aunque la mayoría de las sPSCs fueron bloqueados por una mezcla de antagonistas de los receptores ionotrópicos a glutamato y GABA, en varias neuronas se observaron sPSCs remanentes. Estas corrientes fueron suprimidas por el antagonista nicotínico MEC (10  $\mu$ M) (Pidoplichko y cols., 1997) lo que demostró su naturaleza nicotínica. Estas sPSCs podrían provenir no únicamente de la conexión PPT→NDR, sino del núcleo LDT que se ha demostrado que envía proyecciones al NDR (Woolf y Butcher, 1989). Interesantemente, las SPSCs producidas por receptores nicotínicos exhibieron depresión a corto plazo, lo que sugiere que esta sinapsis es capaz de responder rápidamente a los estímulos emergentes provenientes del entorno (Abbott y Nelson, 2000).

## **Implicaciones funcionales de la presencia de los nAChRs postsinápticos en las neuronas 5-HT.**

El estado de alerta es mantenido por múltiples sistemas neuronales que utilizan varios mensajeros químicos como: glutamato, noradrenalina, dopamina, serotonina, histamina, orexina y acetilcolina (Jones, 2005a). La característica general de estos sistemas neuromoduladores es que sus proyecciones están ampliamente diseminadas en la corteza cerebral y áreas subcorticales y poseen influencias excitatorias mutuas (Jones, 2005b), por lo cual se les llama sistemas moduladores difusos o distribuidos.

La actividad de las neuronas 5-HT del NDR (Jacobs y Fornal, 1991; Lydic y cols., 1987; McGinty y Harper, 1976) y las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus (Foote y cols., 1983) es la más alta durante el estado de alerta, decrece durante el sueño de ondas lentas y prácticamente cesa durante el sueño de movimientos oculares rápidos (REM) (Hobson y cols., 1998). Durante el estado de alerta, las neuronas 5-HT del NDR y las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus inhiben tónicamente la actividad de un grupo reducido de células colinérgicas de los núcleos PPT y LTD, a través de la activación de los receptores postsinápticos inhibitorios 5-HT<sub>1A</sub> y  $\alpha_2$  – adrenérgicos. Estas células colinérgicas son las llamadas neuronas REM-on (Williams y Reiner, 1993) ya que son altamente activas durante la fase de sueño REM (Leonard y Llinás, 1994; Luebke y cols., 1992). Por otro lado, la mayoría de las neuronas colinérgicas (50-75%) de los núcleos PPT y LTD son altamente activas durante el estado de alerta y también durante el sueño REM (Steriade y cols., 1990a, b), etapa durante la cual son insensibles a las acciones inhibitorias ocasionadas por la activación del receptor 5-HT<sub>1A</sub> con el agonista específico 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT) (Thakkar y cols., 1998). Estas células, conocidas como neuronas vigilia/REM-on contribuyen al mantenimiento del estado de vigilia a través de las proyecciones al tálamo (el Mansari y cols., 1990; Steriade y cols., 1990a, b). Nuestra hipótesis de trabajo considera que las neuronas colinérgicas vigilia/REM-on envían proyecciones a las neuronas 5-HT del NDR y por lo tanto, son responsables de las respuestas postsinápticas que observamos en estas neuronas. De esta forma, las células vigilia/REM-on contribuyen en el mantenimiento del estado de vigilia a través de la estimulación directa de los nAChRs postsinápticos localizados en las neuronas 5-HT del NDR. Este mecanismo ayudaría a la activación de los nAChRs  $\alpha_7$  presinápticos localizados en las terminales noradrenérgicas lo que facilitaría la liberación de noradrenalina (Berridge y Foote, 1991; Bitner y Níkel, 2002; Li y cols., 1998; Pan y cols., 1994; Yoshimura y cols., 1985). La existencia de esta aferencia excitatoria colinérgica a la células 5-HT del NDR fue predicha por Hobson y cols., en el año 2000 como parte de una interacción recíproca entre las neuronas colinérgicas y aminérgicas a nivel mesopontino.

La administración sistémica de nicotina incrementa los niveles de serotonina en diferentes áreas cerebrales: corteza, estriado, hipocampo, núcleo dorsal del rafe e hipotálamo (Seth y cols., 2002). Tomando en cuenta los hallazgos del presente estudio, es posible que el incremento de la liberación de serotonina en estas zonas del cerebro que ocurre como respuesta a estímulos ambientales se produzca a través de la estimulación de los núcleos LTD y PPT, los cuales, a su vez, estimulan a las neuronas 5-HT del DRN. La conexión funcional entre los núcleos colinérgicos PPT y LTD por un lado y el NDR por otro lado podría explicar el efecto excitador de estímulos ambientales sobre conductas

dependientes de la liberación de 5-HT como la ansiolisis, ansiogénesis, incremento de la actividad locomotora, memoria, respuesta de alarma y facilitación de aprendizaje (Seth y cols., 2002).

## VII. REFERENCIAS

Abbott LF, Nelson SB. 2000. Synaptic plasticity: taming the beast. *Nat Neurosci* 3 Suppl:1178-1183.

Aghajanian GK, Foote WE, Sheard MH. 1968. Lysergic acid diethylamide: sensitive neuronal units in the midbrain raphe. *Science* 161:706-708.

Aghajanian GK, Vandermaelen CP. 1982. Intracellular identification of central noradrenergic and serotonergic neurons by a new double labeling procedure. *J Neurosci* 2:1786-1792.

Aghajanian GK, Wang RY. 1977. Habenular and other midbrain raphe afferents demonstrated by a modified retrograde tracing technique. *Brain Res* 122:229-242.

Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW. 2009. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 89:73-120.

Alkondon M, Albuquerque EX. 1993. Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. I. Pharmacological and functional evidence for distinct structural subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 265:1455-1473.

Atweh SF, Kuhar MJ. 1977. Autoradiographic localization of opiate receptors in rat brain. II. The brain stem. *Brain Res* 129:1-12.

Azmitia EC, Segal M. 1978. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 179:641-667.

Baker KG, Halliday GM, Törk I. 1990. Cytoarchitecture of the human dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol* 301:147-161.

Bambico FR, Cassano T, Dominguez-Lopez S, Katz N, Walker CD, Piomelli D, Gobbi G. 2010. Genetic deletion of fatty acid amide hydrolase alters emotional behavior and serotonergic transmission in the dorsal raphe, prefrontal cortex, and hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 35:2083-2100.

Baraban JM, Wang RY, Aghajanian GK. 1978. Reserpine suppression of dorsal raphe neuronal firing: mediation by adrenergic system. *Eur J Pharmacol* 52:27-36.



Barik J, Wonnacott S. 2009. Molecular and cellular mechanisms of action of nicotine in the CNS. *Handb Exp Pharmacol* 192:173-207.

Baumgarten HG, Grozdanovic Z. 1995. Psychopharmacology of central serotonergic systems. *Pharmacopsychiatry suppl* 28:73-79.

Beck SG, Pan YZ, Akanwa AC, Kirby LG. 2004. Median and dorsal raphe neurons are not electrophysiologically identical. *J Neurophysiol* 91:994-1005.

Benowitz NL. 1988. Pharmacological aspects of cigarette smoking and nicotine addiction. *N Eng J of Medicine* 319, 1318-1330.

Benowitz NL, Kuyt F, Jacob P, Jones RT, Osman AL. 1983. Cotinine disposition and effects. *Clin Pharm Ther* 34, 604-611.

Benowitz NL. 1996. Pharmacology of nicotine: addiction and therapeutics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 36: 597-613.

Benowitz NL, Zevin S, Jacob P 3<sup>rd</sup>. 1998. Suppression of nicotine intake during ad libitum cigarette smoking by high-dose transdermal nicotine. *J Pharmacol Exp Ther* 287:958-962.

Benwell ME, Balfour DJ. 1992. The effects of acute and repeated nicotine treatment on nucleus accumbens dopamine and locomotor activity. *Br J of Pharmacology* 105: 849-856.

Berridge CW, Foote SL. 1991. Effects of locus coeruleus activation on electroencephalographic activity in neocortex and hippocampus. *J Neurosci* 11:3135-3145.

Bitner RS, Nikkel AL. 2002. Alpha-7 nicotinic receptor expression by two distinct cell types in the dorsal raphe nucleus and locus coeruleus of rat. *Brain Res* 938:45-54.

Bitner RS, Nikkel AL, Curzon P, Donnelly-Roberts DL, Puttfarcken PS, Namovic M, Jacobs IC, Meyer MD, Decker MW. 2000. Reduced nicotinic receptor-mediated antinociception following in vivo antisense knock-down in rat. *Brain Res* 871:66-74.

Bowery NG, Hudson AL, Price GW. 1987. GABAA and GABAB receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience* 20:365-383.

Briggs CA, McKenna DG. 1998. Activation and inhibition of the human alpha7 nicotinic acetylcholine receptor by agonists. *Neuropharmacology* 37:1095-1102.

Brown P, Molliver ME. 2000. Dual serotonin (5-HT) projections to the nucleus accumbens core and shell: relation of the 5-HT transporter to amphetamine-induced neurotoxicity. *J Neurosci* 20:1952-1963.

Broxton NM, Down JG, Gehrman J, Alewood PF, Satchell DG, Livett BG. 1999. Alpha-conotoxin ImI inhibits the alpha-bungarotoxin-resistant nicotinic response in bovine adrenal chromaffin cells. *J Neurochem* 72:1656-1662.

Burlhis TM, Aghajanian GK. 1987. Pacemaker potentials of serotonergic dorsal raphe neurons: contribution of a low-threshold Ca<sup>2+</sup> conductance. *Synapse* 1:582-588.

Cao YJ, Surowy CS, Puttfarcken PS. 2005. Different nicotinic acetylcholine receptor subtypes mediating striatal and prefrontal cortical [3H]dopamine release. *Neuropharmacology* 48:72-79.

Chandler CJ, Stolerman IP. 1997. Discriminative stimulus properties of the nicotinic agonist cytisine. *Psychopharmacology (Berl)* 129:257-264.

Chavez-Noriega LE, Crona JH, Washburn MS, Urrutia A, Elliott KJ, Jonson EC. 1997. Pharmacological characterization of recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors h alpha 2 beta 2, h alpha 2 beta 4, h alpha 3 beta 2, h alpha 3 beta 4, h alpha 4 beta 2, h alpha 4 beta 4 and h alpha 7 expressed in *Xenopus* oocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 280:346-356.

Chen Y, Sharples TJ, Phillips KG, Benedetti G, Broad LM, Zwart R, Sher E. 2003. The nicotinic alpha 4 beta 2 receptor selective agonist, TC-2559, increases dopamine neuronal activity in the ventral tegmental area of rat midbrain slices. *Neuropharmacology* 45:334-344.

Clarke PB, Kumar R. 1983. The effects of nicotine on locomotor activity in non-tolerant and tolerant rats. *Br J of Pharmacology* 78: 329-337.

Clements JD, Silver RA. 2000. Unveiling synaptic plasticity: a new graphical and analytical approach. *Trends Neurosci* 23:105-113.

Coe JW, Brooks PR, Vetelino MG, Wirtz MC, Arnold EP, Huang J, Sands SB, Davis TI, Lebel LA, Fox CB, Shrikhande A, Heym JH, Schaeffer E, Rollema H, Lu Y, Mansbach RS, Chambers LK, Rovetti CC, Schulz DW, Tingley FD, O'Neill BT. 2005. Varenicline: an alpha4beta2 nicotinic receptor partial agonist for smoking cessation. *J Med Chem* 48:3474-3477.

Commons KG. 2008. Alpha4 containing nicotinic receptors are positioned to mediate postsynaptic effects on 5-HT neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuroscience* 153: 851-859.

Connolly GN, Alpert HR, Wayne GF, Koh H. 2007. Trends in nicotine yield in smoke and its relationship with design characteristics among popular US cigarette brands, 1997-2005. *Tob Control* 16:e5.

Consolazione A, Milstein C, Wright B, Cuello AC. 1981. Immunocytochemical detection of serotonin with monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem* 29:1425-1430.

Corrigall WA, Coen KM. 1989. Nicotine maintains robust self-administration in rats on a limited-access schedule. *Psychopharmacology* 99: 473-478.

Costa G, Abin-Carriquiry JA, Dajas F. 2001. Nicotine prevents striatal dopamine loss produced by 6-hydroxydopamine lesion in the substantia nigra. *Brain Res* 888:336-342.

Crunelli V, Forda S, Brooks PA, Wilson KC, Wise JC, Kelly JS. 1983. Passive membrane properties of neurones in the dorsal raphe and periaqueductal grey recorded in vitro. *Neurosci Lett* 40:263-268.

Cucchiario G, Commons KG. 2003. Alpha 4 nicotinic acetylcholine receptor subunit links cholinergic to brainstem monoaminergic neurotransmission. *Synapse* 49:195-205.

Dahlström A, Fuxe K. 1964. Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 20(7): 398-399.

Dajas-Bailador F, Wonnacott S. 2004. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci.* 25: 317-24.

Damaj MI, Wiley JL, Martin BR, Papke RL. 2005. In vivo characterization of a novel inhibitor of CNS nicotinic receptors. *Eur J Pharmacol* 521:43-48.

Dani JA, Harris RA. 2005. Nicotine addiction and comorbidity with alcohol abuse and mental illness. *Nat Neurosci* 8:1465-1470.

Darracq L, Gervasoni D, Souliere F, Lin JS, Fort P, Chouvet G, Luppi PH. 1996. Effect of strychnine on rat locus coeruleus neurones during sleep and wakefulness. *Neuroreport* 8:351-355.

Davidson C, Stamford JA. 1995. Evidence that 5-hydroxytryptamine release in rat dorsal raphe nucleus is controlled by 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>1D</sub> autoreceptors. *Br J Pharmacol* 114:1107-1109.

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

De Biasi M, Dani J. 2010. Reward, addiction, withdrawal with nicotine. *Annu Rev Neurosci*.

De Souza EB, Insel TR, Perrin MH, Rivier J, Vale WW, Kuhar MJ. 1985. Corticotropin-releasing factor receptors are widely distributed within the rat central nervous system: an autoradiographic study. *J Neurosci* 5:3189-3203.

Dwoskin LP, Crooks PA. 2001. Competitive neuronal nicotinic receptor antagonists: a new direction for drug discovery. *J Pharmacol Exp Ther* 298:395-402.

Egertova M, Cravatt BF, Elphick MR. 2003. Comparative analysis of fatty acid amide hydrolase and cb(1) cannabinoid receptor expression in the mouse brain: evidence of a widespread role for fatty acid amide hydrolase in regulation of endocannabinoid signaling. *Neuroscience* 119:481-496.

el-Bizri H, Rigdon MG, Clarke PB. 1995. Intraneuronal accumulation and persistence of radiolabel in rat brain following in vivo administration of [3H]-chlorisondamine. *Br J Pharmacol* 116:2503-2509.

el Mansari M, Sakai K, Jouvet M. 1990. Responses of presumed cholinergic mesopontine tegmental neurons to carbachol microinjections in freely moving cats. *Exp Brain Res* 83:115-123.

Etter JF, Humair JP, Bergman MM, Perneger TV. 2000. Development and validation of the attitudes towards smoking scale (ATS-18). *Addiction* 95, 613-625.

Finley JC, Maderdrut JL, Roger LJ, Petrusz P. 1981. The immunocytochemical localization of somatostatin-containing neurons in the rat central nervous system. *Neuroscience* 6:2173-2192.

Flores-Hernández J, Galarraga E, Bargas J. 1997. Dopamine selects glutamatergic inputs to neostriatal neurons. *Synapse* 25:185-195.

Flores-Hernández J, Galarraga E, Pineda JC, Bargas J. 1994. Patterns of excitatory and inhibitory synaptic transmission in the rat neostriatum as revealed by 4-AP. *J Neurophysiol* 72:2246-2256.

Flores CM, Rogers SW, Pabreza LA, Wolfe BB, Kellar KJ. 1992. A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of alpha 4 and beta 2 subunits and is up-regulated by chronic nicotine treatment. *Mol Pharmacol* 41:31-37.

Foote SL, Bloom FE, Aston-Jones G. 1983. Nucleus locus ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol Rev* 63:844-914.

Fuxe K, Ganten D, Hokfelt T, Bolme P. 1976. Immunohistochemical evidence for the existence of angiotensin II-containing nerve terminals in the brain and spinal cord in the rat. *Neurosci Lett* 2:229-234.

Gahring LC, Persiyanov K, Rogers SW. 2005. Mouse strain-specific changes in nicotinic receptor expression with age. *Neurobiol Aging* 26:973-980.

Gartside SE, Cole AJ, Williams AP, McQuade R, Judge SJ. 2007. AMPA and NMDA receptor regulation of firing activity in 5-HT neurons of the dorsal and median raphe nuclei. *Eur J Neurosci* 25:3001-3008.

Gervasoni D, Peyron C, Rampon C, Barbagli B, Chouvet G, Urbain N, Fort P, Luppi PH. 2000. Role and origin of the GABAergic innervation of dorsal raphe serotonergic neurons. *J Neurosci* 20:4217-4225.

Gerzanich V, Peng X, Wang F, Wells G, Anand R, Fletcher S, Lindstrom J. 1995. Comparative pharmacology of epibatidine: a potent agonist for neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 48:774-782.

Glazer EJ, Steinbusch H, Verhofstad A, Basbaum AI. 1981. Serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis and paragigantocellularis of the cat contain enkephalin. *J Physiol (Paris)* 77:241-245.

Gotti C, Fornasari D, Clementi F. 1997. Human neuronal nicotinic receptors. *Prog Neurobiol* 53:199-237.

Gotti CE, Carbonnelle E, Moretti M, Zwart R, Clementi F. 2000. Drugs selective for nicotinic receptor subtypes: a real possibility or a dream? *Behav Brain Res* 113:183-192.

Gray R, Rajan AS, Radcliffe KA, Yakehiro M, Dani JA. 1996. Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature* 383:713-716.

Hakanson R, Bottcher G, Ekblad E, Panula P, Simonsson M, Dohlsten M, Hallberg T, Sundler F. 1986. Histamine in endocrine cells in the stomach. A survey of several species using a panel of histamine antibodies. *Histochemistry* 86:5-17.

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

Hill P, Wynder EL. 1974. Smoking and cardiovascular disease. Effect of nicotine on the serum epinephrine and corticoids. *Am Heart J* 87:491-496.

Hobson JA, Pace-Schott EF, Stickgold R. 2000. Dreaming and the brain: toward a cognitive neuroscience of conscious states. *Behav Brain Sci* 23:793-842.

Hobson JA, Stickgold R, Pace-Schott EF. 1998. The neuropsychology of REM sleep dreaming. *Neuroreport* 9:R1-14.

Hogg RC, Raggensbass M, Bertrand D. 2003. Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 147:1-46.

Hokfelt T, Ljungdahl A, Terenius L, Elde R, Nilsson G. 1977. Immunohistochemical analysis of peptide pathways possibly related to pain and analgesia: enkephalin and substance P. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:3081-3085.

Ibañez-Sandoval O, Hernandez A, Floran B, Galarraga E, Tapia D, Valdiosera R, Erlj D, Aceves J, Bargas J. 2006. Control of the subthalamic innervation of substantia nigra pars reticulata by D1 and D2 dopamine receptors. *J Neurophysiol* 95:1800-1811.

Imai H, Steindler DA, Kitai ST. 1986. The organization of divergent axonal projections from the midbrain raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 243:363-380.

Jacobs BL, Azmitia CL. 1992. Structure and function of the brain serotonin system. *Phys Rev* 72:165-229.

Jacobs BL, Fornal CA. 1991. Activity of brain serotonergic neurons in the behaving animal. *Pharmacol Rev* 43:563-578.

Jain KK. 2004. Modulators of nicotinic acetylcholine receptors as analgesics. *Curr Opin Investig Drugs* 5:76-81.

Jennes L, Beckman WC, Stumpf WE, Grzanna R. 1982. Anatomical relationships of serotonergic and noradrenalinergic projections with the GnRH system in septum and hypothalamus. *Exp Brain Res* 46:331-338.

Jensen AA, Mikkelsen I, Frolund B, Brauner-Osborne H, Falch E, Krosgaard-Larsen P. 2003. Carbamoylcholine homologs: novel and potent agonists at neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 64:865-875.

Jensen AA, Frolund B, Liljefors T, Krosgaard-Larsen P. 2005. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: structural revelations, target identifications, and therapeutic inspirations. *J Med Chem* 48:4705-4745.

Jolas T, Aghajanian GK. 1997. Opioids suppress spontaneous and NMDA-induced inhibitory postsynaptic currents in the dorsal raphe nucleus of the rat in vitro. *Brain Res* 755:229-245.

Jones BE. 2005a. From waking to sleeping: neuronal and chemical substrates. *Trends in Pharmacological Sciences* 27: 578-586.

Jones BE, 2005b. Basic mechanisms of sleep-wake states. In: Kryger MH, Roth T, Dement WC. editors. *Principles and Practice of Sleep Medicine*. Elsevier Saunders. p.136-153.

Kalén P, Karlson M, Wiklund L. 1985. Possible excitatory amino acid afferents to nucleus raphe dorsalis of the rat investigated with retrograde wheat germ agglutinin and D-[3H] aspartate tracing. *Brain Res* 360:285-297.

Kalén P, Skagerberg G, Lindvall O. 1988. Projections from the ventral tegmental area and mesencephalic raphe to the dorsal raphe nucleus in the rat. Evidence for a minor dopaminergic component. *Exp Brain Res* 73:69-77.

Kalén P, Wiklund L. 1989. Projections from the medial septum and diagonal band of Broca to the dorsal and central superior raphe nuclei: a non-cholinergic pathway. *Exp Brain Res* 75:401-416.

Kem WR, Mahnir VM, Papke RL, Lingle CJ. 1997. Anabaseine is a potent agonist on muscle and neuronal alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 283:979-992.

Kenny PJ, Markou A. 2005. Conditioned nicotine withdrawal profoundly decreases the activity of brain reward systems. *J Neurosci* 25:6208-6212.

Khachaturian H, Lewis ME, Watson SJ. 1983. Enkephalin systems in diencephalon and brainstem of the rat. *J Comp Neurol* 220:310-320.

Kirby LG, Pernar L, Valentino RJ, Beck SG. 2003. Distinguishing characteristics of serotonin and non-serotonin-containing cells in the dorsal raphe nucleus: electrophysiological and immunohistochemical studies. *Neuroscience* 116:669-683.

Kirby LG, Freeman-Daniels E, Lemos JC, Nunan JD, Lamy C, Akanwa A, Beck SG. 2008. Corticotropin-releasing factor increases GABA synaptic activity and induces inward current in 5-hydroxytryptamine dorsal raphe neurons. *J Neurosci* 28:12927-12937.

Klink R, de Kerchove d'Exaerde A, Zoli M, Changeux JP. 2001. Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. *J Neurosci* 21:1452-1463.

Köhler C, Steinbusch H. 1982. Identification of serotonin and non-serotonin-containing neurons of the mid-brain raphe projecting to the entorhinal area and the

hippocampal formation. A combined immunohistochemical and fluorescent retrograde tracing study in the rat brain. *Neuroscience* 7:951-975.

Kombian SB, Colmers WF. 1992. Neuropeptide Y selectively inhibits slow synaptic potentials in rat dorsal raphe nucleus in vitro by a presynaptic action. *J Neurosci* 12:1086-1093.

Krieger DT. 1983. Brain peptides: what, where, and why? *Science* 222:975-985.

Lakoski JM, Aghajanian GK. 1983. Effects of histamine, H1- and H2-receptor antagonists on the activity of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *J Pharmacol Exp Ther* 227:517-523.

Langley JN. 1907. On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of "receptive" substances: Part I. *J Physiol* 36:347-384.

Léna C, Changeux JP. 1998. Allosteric nicotinic receptors, human pathologies. *J Physiol Paris* 92: 63-74.

Léna C, de Kerchove D'Exaerde A, Cordero-Erausquin M, Le Novère N, del Mar Arroyo-Jimenez M, Changeux JP. 1999. Diversity and distribution of nicotinic acetylcholine receptors in the locus coeruleus neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:12126-12131.

Leonard CS, Llinas R. 1994. Serotonergic and cholinergic inhibition of mesopontine cholinergic neurons controlling REM sleep: an in vitro electrophysiological study. *Neuroscience* 59:309-330.

Levin ED, Simon BB. 1998. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology* 138: 217-230.

Levin ED, McClernon FJ, Rezvani AH. 2006. Nicotinic effects on cognitive function: behavioral characterization, pharmacological specification, and anatomic localization. *Psychopharmacology* 184: 523-539.

Li X, Rainnie DG, McCarley RW, Greene RW. 1998. Presynaptic nicotinic receptors facilitate monoaminergic transmission. *J Neurosci* 18:1904-1912.

Li YQ, Li H, Kaneko T, Mizuno N. 2001. 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* 900:110-118.

Lindvall O, Björklund A. 1974. The organization of the ascending catecholamine neuron systems in the rat brain as revealed by the glyoxylic acid fluorescence method. *Acta Physiol Scand Suppl* 412:1-48.



Liu RJ, van den Pol AN, Aghajanian GK. 2002. Hypocretins (orexins) regulate serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus by excitatory direct and inhibitory indirect actions. *J Neurosci* 22:9453-9464.

Liu XA, Koren O, Yee SK, Pechnick RN, Poland RE, London ED. 2003. Self-administration of 5-iodo-A-85380, a beta2-selective nicotinic receptor ligand, by operantly trained rats. *Neuroreport* 14:1503-1505.

Lucki I. 1998. The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol Psychiatry* 44: 151-162.

Luebke JI, Greene RW, Semba K, Kamondi A, McCarley RW, Reiner PB. 1992. Serotonin hyperpolarizes cholinergic low-threshold burst neurons in the rat laterodorsal tegmental nucleus in vitro. *Proc Natl Acad Sci* 89:743-747.

Luetje CW, Patrick J. 1991. Both alpha- and beta-subunits contribute to the agonist sensitivity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci* 11:837-845.

Lydic R, McCarley RW, Hobson JA. 1987. Serotonin neurons and sleep. I. Long term recordings of dorsal raphe discharge frequency and PGO waves. *Arch Ital Biol* 125:317-343.

Mantyh PW, Hunt SP, Maggio JE. 1984. Substance P receptors: localization by light microscopic autoradiography in rat brain using [3H]SP as the radioligand. *Brain Res* 307:147-165.

Matsukura S, Taminato T, Kitano N, Seino Y, Hamada H, Uchihashi M, Nakajima H, Hirata Y. 1984. Effects of environmental tobacco smoke on urinary cotinine excretion in nonsmokers : Evidence for passive smoking. *N Eng J of Med* 311 : 828-832.

Marinelli S, Schnell SA, Hack SP, Christie MJ, Wessendorf MW, Vaughan CW. 2004. Serotonergic and nonserotonergic dorsal raphe neurons are pharmacologically and electrophysiologically heterogeneous. *J Neurophysiol* 92:3532-3537.

Martel JC, Fournier A, St. Pierre S, Quirion R. 1990. Quantitative autoradiographic distribution of [125I]Bolton-Hunter neuropeptide Y receptor binding sites in rat brain. Comparison with [125I]peptide YY receptor sites. *Neuroscience* 36:255-283.

McGinty DJ, Harper RM. 1976. Dorsal raphe neurons: depression of firing during sleep in cats. *Brain Res* 101:569-575.

McIntosh JM, Azam L, Staheli S, Dowell C, Lindstrom JM, Kuryatov A, Garrett JE, Marks MJ, Whiteaker P. 2004. Analogs of alpha-conotoxin MII are selective for alpha6-containing nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 65:944-952.

Melander T, Hokfelt T, Nilsson S, Brodin E. 1986. Visualization of galanin binding sites in the rat central nervous system. *Eur J Pharmacol* 124:381-382.

Menkes DB, Aghajanian GK, McCall RB. 1980. Chronic antidepressant treatment enhances alpha-adrenergic and serotonergic responses in the facial nucleus. *Life Sci* 27:45-55.

Michelsen KA, Schmitz C, Steinbusch HW. 2007. The dorsal raphe nucleus--from silver stainings to a role in depression. *Brain Res Rev* 55:329-342.

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

Mihailescu S, Guzmán-Marín R, Domínguez M del C, Drucker-Colín R. 2002. Mechanisms of nicotine actions on dorsal raphe serotonergic neurons. *Eur J Pharmacol* 452:77-82.

Mihalak KB, Carroll FI, Luetje CW. 2006. Varenicline is a partial agonist at alpha4beta2 and a full agonist at alpha7 neuronal nicotinic receptors. *Mol Pharmacol* 70:801-805.

Miller DK, Lever JR, Rodvelt KR, Baskett JA, Will MJ, Kracke GR. 2007.

Lobeline, a potential pharmacotherapy for drug addiction, binds to mu opioid receptors and diminishes the effects of opioid receptor agonists. *Drug Alcohol Depend* 89:282-291.

Miller JJ, Richardson TL, Fibiger HC, McLennan H. 1975. Anatomical and electrophysiological identification of a projection from the mesencephalic raphe to the caudate-putamen in the rat. *Brain Res* 97:133-136.

Mizra NR, Stolerman IP. 1998. Nicotine enhances sustained attention in the rat under specific task conditions. *Psychopharmacology* 138: 266-274.

Moldrich G, Wenger T. 2000. Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. *Peptides* 21:1735-1742.

Moore RY, Bloom FE. 1978. Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the dopamine systems. *Annu Rev Neurosci* 1:129-169.

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

Nomikos GG, Schilstrom B, Hildebrand BE, Panagis G, Grenhoff J, Svensson TH. 2000. Role of  $\alpha 7$  nicotinic receptors in nicotine dependence and implications for psychiatric illness. *Behav Brain Res* 113: 97-103.

Oldani A, Zucconi M, Asselta R, Modugno M, Bonati MT. 1998. Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. A video-polysomnographic and genetical appraisal of 40 patients and delineation of the epileptic syndrome. *Brain* 121: 205-223.

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

Pan ZZ, Grudt TJ, Williams JT. 1994. Alpha 1-adrenoceptors in rat dorsal raphe neurons: regulation of two potassium conductances. *J Physiol* 478:437-447.

Papp A, Juranyi Z, Nagymajtenyi L, Matyus P, Harsing LG. 2008. The synaptic and nonsynaptic glycine transporter type-1 inhibitors Org-24461 and NFPS alter single neuron firing rate in the rat dorsal raphe nucleus. Further evidence for a glutamatergic-serotonergic interaction and its role in antipsychotic action. *Neurochem Int* 52:130-134.

Paton WD, Zaimis EJ. 1949. The action of curarizing substances on respiration in the cat. *J Physiol* 108:Proc, 34.

Paxinos G y Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press, 1982.

Peng JH, Lucero L, Fryer J, Herl J, Leonard SS, Lukas RJ. 1999. Inducible, heterologous expression of human  $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors in a native nicotinic receptor-null human clonal line. *Brain Res* 825:172-179.

Picciotto MR. 2003. Nicotine as a modulator of behavior: beyond the inverted U. *Trends Pharmacol Sci* 24:493-499.

Picciotto MR, Zoli M. 2002. Nicotinic receptors in aging and dementia. *J Neurobiol* 53: 641-655.

Pidoplichko VI, DeBiasi M, Williams JT, Dani JA. 1997. Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. *Nature* 390:401-404.

Pidoplichko VI, Noguchi J, Areola OO, Liang Y, Peterson J, Zhang T, Dani JA. 2004. Nicotinic cholinergic synaptic mechanisms in the ventral tegmental area contribute to nicotine addiction. *Learn Mem* 11:60-69.

Quik M, Bordia T, O'Leary K. 2007. Nicotinic receptors as CNS targets for Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol* 74: 1224-1234.

Raggenbass M, Bertrand D. 2002. Nicotinic receptors in circuit excitability and epilepsy. *J Neurobiol* 53: 580-589.

Rampon C, Peyron C, Gervasoni D, Pow DV, Luppi PH, Fort P. 1999. Origins of the glycinergic inputs to the rat locus coeruleus and dorsal raphe nuclei: a study combining retrograde tracing with glycine immunohistochemistry. *Eur J Neurosci* 11:1058-1066.

Rayes D, Flamini M, Hernando G, Bouzat C. 2007. Activation of single nicotinic receptor channels from *Caenorhabditis elegans* muscle. *Mol Pharmacol* 71:1407-1415.

Rigby AC, Baleja JD, Li L, Pedersen LG, Furie BC, Furie B. 1997. Role of gamma-carboxyglutamic acid in the calcium-induced structural transition of conantokin G, a conotoxin from the marine snail *Conus geographus*. *Biochemistry* 36:15677-15684.

Romano C, Goldstein A. 1980. Stereospecific nicotine receptors on rat brain membranes. *Science* 210:647-650.

Rueter LE, Donnelly-Roberts DL, Curzon P, Briggs CA, Anderson DJ, Bitner RS. 2006. A-85380: a pharmacological probe for the preclinical and clinical investigation of the alphabeta neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *CNS Drug Rev* 12:100-112.

Sakai K, Salvat D, Touret M, Jouvet M. 1977. Afferent connections of the nucleus raphe dorsalis in the cat as visualized by the horseradish peroxidase technique. *Brain Res* 137:11-35.

Sakanaka M, Shibasaki T, Lederis K. 1987. Corticotropin releasing factor-like immunoreactivity in the rat brain as revealed by a modified cobalt-glucose oxidase-diaminobenzidine method. *J Comp Neurol* 260:256-298.

Seguela P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, Patrick JW. 1993. Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci* 13:596-604.

Seth P, Cheeta S, Tucci S, File SE. 2002. Nicotinic-serotonergic interactions in brain and behaviour. *Pharmacol Biochem Behav.* 71: 795-805.

Sher E, Chen Y, Sharples TJ, Broad LM, Benedetti G, Zwart R, McPhie GI, Pearson KH, Baldwinson T, De Filippi G. 2004. Physiological roles of neuronal nicotinic receptor subtypes: new insights on the nicotinic modulation of neurotransmitter release, synaptic transmission and plasticity. *Curr Top Med Chem* 4:283-297.

Skofitsch G, Jacobowitz DM. 1985. Immunohistochemical mapping of galanin-like neurons in the rat central nervous system. *Peptides* 6:509-546.

Sprouse JS, Aghajanian GK. 1987. Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT1A and 5-HT1B agonists. *Synapse* 1:3-9.

Steinbusch HW, Sauren Y, Groenewegen H, Watanabe T, Mulder AH. 1986. Histaminergic projections from the premammillary and posterior hypothalamic region to the caudate-putamen complex in the rat. *Brain Res* 368:389-393.

Steinbusch HW, van der Kooy D, Verhofstad AA, Pellegrino A. 1980. 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* 19:137-142.

Steinlein OK, Mulley JC, Propping P, Wallace RH, Phillips HA. 1995. A missense mutation in the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit is associated with autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *Nat Gen* 11: 201-203.

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

Steriade M, Pare D, Datta S, Oakson G, Curro Dossi R. 1990b. Different cellular types in mesopontine cholinergic nuclei related to ponto-geniculo-occipital waves. *J Neurosci* 10:2560-2579.

Sullivan JP, Donnelly-Roberts D, Briggs CA, Anderson DJ, Gopalakrishnan M, Piattoni-Kaplan M, Campbell JE, McKenna DG, Molinari E, Hettinger AM, Garvey DS, Wasicak JT, Holladay MW, Williams M, Arneric SP. 1996. A-85380 [3-(2(S)-azetidinylmethoxy) pyridine]: in vitro pharmacological properties of a novel, high affinity alpha 4 beta 2 nicotinic acetylcholine receptor ligand. *Neuropharmacology* 35:725-734.

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

Summers KL, Lippiello P, Giacobini E. 1996. A microdialysis study of the effects of the nicotinic agonist RJR-2403 on cortical release of acetylcholine and biogenic amines. *Neurochem Res* 21:1181-1186.

Swanson LW, Hartman BK. 1975. The central adrenergic system. An immunofluorescence study of the location of cell bodies and their efferent connections

in the rat utilizing dopamine-beta-hydroxylase as a marker. *J Comp Neurol* 163:467-505.

Swanson KL, Allen CN, Aronstam RS, Rapoport H, Albuquerque EX. 1986. Molecular mechanisms of the potent and stereospecific nicotinic receptor agonist (+)-anatoxin-a. *Mol Pharmacol* 29:250-257.

Szafarczyk A, Alonso G, Ixart G, Malaval F, Nougier-Soule J, Assenmacher I. 1980. Serotonergic system and circadian rhythms of ACTH and corticosterone in rats. *Am J Physiol* 239:482-489.

Tago H, McGeer PL, McGeer EG, Akiyama H, Hersh LB. 1989. Distribution of choline acetyltransferase immunopositive structures in the rat brainstem. *Brain Res* 495: 271-297.

Teaktong T, Graham A, Court J, Perry R, Jaros E, Johnson M, Hall R, Perry E. 2003. Alzheimer's disease is associated with a selective increase in  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor immunoreactivity in astrocytes. *Glia* 41: 207-211.

Thakkar MM, Strecker RE, McCarley RW. 1998. Behavioral state control through differential serotonergic inhibition in the mesopontine cholinergic nuclei: a simultaneous unit recording and microdialysis study. *J Neurosci* 18:5490-5497.

Tibbs GR, Barrie AP, Van Mieghem FJ, McMahan HT, Nicholls DG. 1989. Repetitive action potentials in isolated nerve terminals in the presence of 4-aminopyridine: effects on cytosolic free  $Ca^{2+}$  and glutamate release. *J Neurochem* 53:1693-1699.

Toyoshima C, Unwin N. 1988. Ion channel of acetylcholine receptor reconstructed from images of postsynaptic membranes. *Nature* 336:247-250.

Van Bockstaele EJ, Biswas A, Pickel VM. 1993. Topography of serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus that send axon collaterals to the rat prefrontal cortex and nucleus accumbens. *Brain Res* 624:188-198.

Vanderhaeghen JJ, Lotstra F, De Mey J, Giles C. 1980. Immunohistochemical localization of cholecystokinin- and gastrin-like peptides in the brain and hypophysis of the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:1190-1194.

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

Vandermaelen CP, Matheson GK, Wilderman RC, Patterson LA. 1986. Inhibition of serotonergic dorsal raphe neurons by systemic and iontophoretic

administration of buspirone, a non-benzodiazepine anxiolytic drug. *Eur J Pharmacol* 129:123-130.

Wada E, Wada K, Boulter J, Deneris E, Heinemann S, Patrick J, Swanson LW. 1989. 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. *The J Comp Neurol* 284:314-335.

Wang RY, Gallager DW, Aghajanian GK. 1976. Stimulation of pontine reticular formation suppresses firing of serotonergic neurons in the dorsal raphe. *Nature* 264:365-368.

Waselus M, Van Bockstaele EJ. 2007. Co-localization of corticotropin-releasing factor and vesicular glutamate transporters within axon terminals of the rat dorsal raphe nucleus. *Brain Res* 1174:53-65.

Watkins SS, Epping-Jordan MP, Koob GF, Markou A. 1999. Blockade of nicotine self-administration with nicotinic antagonists in rats. *Pharm Biochem Behav* 62, 743-751.

Whiting PJ, Liu R, Morley BJ, Lindstrom JM. 1987. Structurally different neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes purified and characterized using monoclonal antibodies. *J Neurosci* 7:4005-4016.

Wilcox BJ, Seybold VS. 1982. Localization of neuronal histamine in rat brain. *Neurosci Lett* 29:105-110.

Williams JA, Reiner PB. 1993. Noradrenaline hyperpolarizes identified rat mesopontine cholinergic neurons in vitro. *J Neurosci* 13:3878-3883.

Wonnacott S. 1997. Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci* 20:92-98.

Woolf NJ, Butcher LL. 1989. Cholinergic systems in the rat brain: IV. Descending projections of the pontomesencephalic tegmentum. *Brain Res Bull* 23:519-540.

Wooltorton JR, Pidoplichko VI, Broide RS, Dani JA. 2003. Differential desensitization and distribution of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in midbrain dopamine areas. *J Neurosci* 23:3176-3185.

Wu J, George AA, Schroeder KM, Xu L, Marxer-Miller S, Lucero L, Lukas RJ. 2004. Electrophysiological, pharmacological, and molecular evidence for alpha7-nicotinic acetylcholine receptors in rat midbrain dopamine neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 311:80-91.

Xiao Y, Kellar KJ. 2004. The comparative pharmacology and up-regulation of rat neuronal nicotinic receptor subtype binding sites stably expressed in transfected mammalian cells. *J Pharmacol Exp Ther* 310:98-107.

Xu ZQ, Zhang X. 1998. Galanin-5-hydroxytryptamine interactions: electrophysiological, immunohistochemical and in situ hybridization studies on rat dorsal raphe neurons with a note on galanin R1 and R2 receptors. *Neuroscience* 87:79-94.

Yamazoe MS, Shiosaka, Emson PC, Tohyama M. 1985. Distribution of neuropeptide Y in the lower brainstem: an immunohistochemical analysis. *Brain Res* 335:109-120.

Yoshimura M, Higashi H, Nishi S. 1985. Noradrenaline mediates slow excitatory synaptic potentials in rat dorsal raphe neurons in vitro. *Neurosci Lett* 61:305-310.

Zoli M, Picciotto MR, Ferrari R, Cocchi D, Changeux JP. 1999. Increased neurodegeneration during ageing in mice lacking high-affinity nicotin receptors. *EMBO J* 18: 1235-1244.



# Serotonergic Dorsal Raphe Neurons Possess Functional Postsynaptic Nicotinic Acetylcholine Receptors

LUIS GALINDO-CHARLES,<sup>1</sup> SALVADOR HERNANDEZ-LOPEZ,<sup>1\*</sup> ELVIRA GALARRAGA,<sup>2</sup> DAGOBERTO TAPIA,<sup>2</sup> JOSÉ BARGAS,<sup>2</sup> JULIETA GARDUÑO,<sup>1</sup> CARMEN FRÍAS-DOMÍNGUEZ,<sup>1</sup> RENÉ DRUCKER-COLIN,<sup>3</sup> AND STEFAN MIHAILESCU<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology, College of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510

<sup>2</sup>Department of Biophysics, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510

<sup>3</sup>Department of Neuroscience, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510

**KEY WORDS** serotonergic neurons; dorsal raphe nucleus; nicotinic acetylcholine receptor

**ABSTRACT** Very few neurons in the telencephalon have been shown to express functional postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), among them, the noradrenergic and dopaminergic neurons. However, there is no evidence for postsynaptic nAChRs on serotonergic neurons. In this study, we asked if functional nAChRs are present in serotonergic (5-HT) and nonserotonergic (non-5-HT) neurons of the dorsal raphe nucleus (DRN). In rat midbrain slices, field stimulation at the tegmental pedunculo-pontine (PPT) nucleus evoked postsynaptic currents (eEPSCs) with different components in DRN neurons. After blocking the glutamatergic and GABAergic components, the remaining eEPSCs were blocked by mecamylamine and reduced by either the selective  $\alpha 7$  nAChR antagonist methyllycaconitine (MLA) or the selective  $\alpha 4\beta 2$  nAChR antagonist dihydro- $\beta$ -eritroidine (DH $\beta$ E). Simultaneous addition of MLA and DH $\beta$ E blocked all eEPSCs. Integrity of the PPT-DRN pathway was assessed by both anterograde biocytin tracing and antidromic stimulation from the DRN. Inward currents evoked by the direct application of acetylcholine (ACh), in the presence of atropine and tetrodotoxin, consisted of two kinetically different currents: one was blocked by MLA and the other by DH $\beta$ E; in both 5-HT and non-5-HT DR neurons. Analysis of spontaneous (sEPSCs) and evoked (eEPSCs) synaptic events led to the conclusion that nAChRs were located at the postsynaptic membrane. The possible implications of these newly described nAChRs in various physiological processes and behavioral events, such as the wake-sleep cycle, are discussed. **Synapse** 62:601–615, 2008. ©2008 Wiley-Liss, Inc.

## INTRODUCTION

Cholinergic signaling mediated by nicotinic receptors is widespread in the central and peripheral nervous system and is involved in a large number of processes such as learning and memory, attention, arousal, locomotor activity, anxiety, regulation of food intake, and the processing of pain (Gotti et al., 1997; Hogg et al., 2003; Picciotto, 2003). Neuronal nicotinic cholinergic receptors (nAChRs) are pentameric ligand-gated cation channels formed by  $\alpha$  and  $\beta$  subunits. Nine types of  $\alpha$  subunits ( $\alpha 2$ – $\alpha 10$ ) and three types of  $\beta$  subunits ( $\beta 2$ – $\beta 4$ ), have been identified. Immunoprecipitation and in situ hybridization studies have shown that nAChRs containing  $\alpha 7$  and  $\alpha 4\beta 2$  subunits are frequently expressed in the central nervous system (Flores et al., 1992; Seguela et al., 1993; Whiting et al., 1987), mostly, in the presynaptic or

preterminal regions where they modulate neurotransmitter release (Jensen et al., 2005; Sher et al., 2004; Wonnacott, 1997). Very few neurons in the telencephalon have been shown to express postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), among them, the noradrenergic and dopaminergic neurons (Léna et al., 1999; Pidoplichko et al., 1997). That is, many global cholinergic–nicotinic actions are mediated indirectly via distributed modulatory systems.

Contract grant sponsor: PAPIIT-UNAM grants; Contract grant sponsor: CONACyT-Mexico; Contract grant numbers: 45032-M, 50147-M, 42636, 49484

\*Correspondence to: Salvador Hernández-López, Deptmento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM, PO Box: 70250. E-mail: salvador@liceaga.facmed.unam.mx

Received 10 April 2007; Accepted 22 January 2008

DOI 10.1002/syn.20526

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

Interestingly, among the neurons involved in the global nicotinic actions also stand the serotonergic neurons (5-HT neurons) of the dorsal raphe nucleus (DRN). Thus, the systemic administration of nicotine increases serotonin levels in various areas of the brain such as the cortex, striatum, hippocampus, DRN, and hypothalamus (see Seth et al., 2002 for review). And changes in the serotonergic tone induced by nicotine administration play a permissive role in the expression of several global actions such as anxiolysis, anxiogenesis, increased locomotor activity, startle response, memory, cognition, and learning (Lucki, 1998; Seth et al., 2002). Nevertheless, systems and behavioral studies have not rendered functional evidence of postsynaptic nAChRs on 5-HT DRN neurons. This lack of evidence raises the question about nicotinic actions being direct or indirect upon the serotonergic system. Therefore, in this study, we asked if functional nAChRs are present in 5-HT and non-5-HT neurons of the DRN.

A particular aspect emphasizing the importance of finding postsynaptic nAChRs on 5-HT DRN neurons relies in the prediction that a direct cholinergic input onto 5-HT DRN neurons should be a part of the system in charge of maintaining the waking state (Hobson et al., 1998, 2000). In fact, the activities of both cholinergic and serotonergic systems are elevated during arousal and wake states. However, this excitatory input has not been proved functionally, although, immunocytochemical studies have revealed the presence of postsynaptic  $\alpha 7$  and  $\alpha 4\beta 2$  nAChRs in 5-HT and non-5-HT neurons of the DRN (Bitner et al., 2000; Bitner and Nickel, 2002), and the cholinergic neurons from the tegmental pedunculo pontine (PPT) and laterodorsal (LDT) nuclei have been shown to send projections to DRN neurons (Woolf and Butcher, 1989). Accordingly, a main hypothesis of this work is that these projections represent the excitatory input for nAChRs expressed by 5-HT DRN neurons.

Our findings validated, electrophysiologically, that the receptors previously identified in 5-HT DRN neurons by immunocytochemistry are functional postsynaptic nAChRs. Furthermore, the subtypes of nAChRs were determined pharmacologically, and the PPT → DRN projections were proven to provide a cholinergic nicotinic excitatory input to 5-HT DRN neurons.

## MATERIALS AND METHODS

### Slice preparation

All procedures were carried out in accordance with the National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Institutional Animal Care Committee of the Universidad Nacional Autónoma de México. The experiments were performed on brain slices obtained from Wistar

rats, 14–25 postnatal day. Animals were deeply anesthetized with isoflurane and decapitated. Their brains were quickly removed and placed into ice cold (4°C) bath (external) saline containing (in mM): 125 NaCl, 3 KCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1.2 CaCl<sub>2</sub>, 25 glucose, 300 mOsm/L, pH = 7.3 by bubbling with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. Coronal midbrain slices containing the DRN (350 μm thick) and the tegmental PPT nuclei were cut using a vibratome (Vibratome 1500 Comp., St. Louis, MO) and stored in oxygenated bath saline at room temperature for at least 1 h before recording.

### Whole cell recordings

Individual slices were transferred into a custom made plexiglass recording chamber and superfused with bath saline at a rate of 3–4 ml/min at 25°C. Whole cell current and voltage clamp recordings were performed with a Multiclamp 700A amplifier (Axon Instruments, Union City, CA) and monitored with a PC running Clampex 8 software (Axon Instruments, Union City, CA). The micropipettes used for recordings were pulled from borosilicate glass tubes (WPI, Sarasota, FL) with a Flaming-Brown puller (Sutter Instrument Comp., Novato, CA) and fire polished using a microforge (MF-830, Narishige Comp., Japan). The internal solution consisted of (mM): 115 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 0.5 EGTA, 2 Na<sub>2</sub>-ATP, 0.7 Na<sub>2</sub>GTP, biocytin 0.1%, pH = 7.2–7.3 with KOH, 280–300 mOsm/l. Electrodes' DC impedance varied between 4 and 7 MΩ. Experimental data were stored in a PC using a Digidata 1322A AD converter (Axon Instruments, Union City, CA), at a sampling rate of 5 KHz. Individual neurons were visualized using an infrared video-microscopy system (BX51WI, Olympus Instruments, Japan) endowed with a 60× water immersion objective. Neurons selected for recording were located close the midline area of the DRN, identified as the translucent area between the medial longitudinal fasciculus and the aqueduct.

### Local administration of acetylcholine

Microinjections of acetylcholine (ACh) (1 mM) on DRN neurons were applied by using a microinjector (IM 300, Narishige Comp., Japan) coupled to a fine tip glass micropipette placed about 50 μm above the recorded neuron. Brief “puffs” of ACh (2–5 psi, during 500 ms) were applied in the presence of atropine (5 μM) and tetrodotoxin (TTX) (1 μM) to eliminate the muscarinic component of the response and also to avoid indirect effects. Intervals of 2–3 min were left between each ACh administration to avoid desensitization of the nicotinic receptors.

### Spontaneous postsynaptic currents

Spontaneous postsynaptic currents (sPSCs) were recorded from DRN neurons using the whole cell voltage clamp mode. After drugs administration, 10 min were left to attain equilibrium. Thereafter, 20 min of sPSCs recordings was taken for analysis. Drugs administration was achieved in a cumulative manner, in the following sequence: first, 4-aminopyridine (4-AP, 100  $\mu$ M) was added to the bath saline to increase the frequency of sPSCs (Flores-Hernandez et al., 1994, 1997; Tibbs et al., 1989); afterward, a cocktail consisting in CNQX (10  $\mu$ M), AP5 (50  $\mu$ M), and bicuculline (10  $\mu$ M) was added to the bath solution to block glutamatergic and GABAergic ionotropic receptors; finally, mecamylamine (MEC 10  $\mu$ M) was added to the perfusate.

### Evoked postsynaptic currents

Field stimulation was used to evoke subthreshold excitatory postsynaptic currents (eEPSCs) in DRN neurons. Stimuli consisted in 80–100 consecutive 14 Hz trains applied at 0.1 Hz. Care was taken to discard responses that either decayed or augmented with time. A concentric bipolar tungsten electrode (12- $\mu$ m pencil tip) (FHC, Bowdoinham, ME) was placed at the PPT area. An isolation unit (Digitimer, Hertfordshire UK) was used to adjust stimulus parameters during the experiment. Distance between stimulating and recording electrodes was about 1 mm. Series resistance was monitored by a test command applied to the postsynaptic cell before the train of stimuli. To assess the integrity of the connection from the PPT to the DRN, two classes of experiments were done. First, midbrain slices containing both PPT and DRN areas were placed in a Plexiglass chamber and constantly superfused with oxygenated bath saline. A sharp pipette (tip diameter < 0.5  $\mu$ m) loaded with saline-containing biocytin (5%) was placed inside the PPT area and kept there for 2–3 h (e.g., Ibanez-Sandoval et al., 2006). Then, the pipette was removed, and the slice was kept under superfusion for other 5 h. Thereafter, the slice was fixed overnight in a 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS; pH = 7.4; 4°C) containing 4% paraformaldehyde and 1% picric acid. The slice was then immersed in sucrose (30%) for about 30 min and cut into 60  $\mu$ m sections with a vibratome (Ted Pella, Reading, CA). After incubating the slices in Tris-buffered saline (TBS) containing Triton X-100 and the avidin-biotin-peroxydase complex (1:100; Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 4–6 h at room temperature, the slices were reacted with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; 0.05%) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.003%) in TBS and mounted on a slide to visualize the bound HRP. Labeled neurons inside the PPT area and fibers projecting from the PPT to the DRN were visualized through trans-illumination microscopy (Figs. 3F and

3G). In addition, field stimulation was delivered at the DRN to elicit antidromic potentials in PPT neurons. Arrangement of electrodes was dictated by the results of the tracing experiments. The probability of getting an antidromic response was high (six of seven trials). If an action potential was evoked with the recording electrode in a PPT neuron, it could be made to collide with the antidromic response. Collision interval was determined as the longest interstimulus interval (2.5 ms) that failed to result in an antidromic response.

When recording synaptic responses in the DRN during field stimulation in the PPT area, the recording pipette solution contained QX-314 to eliminate active orthodromic spikes. CNQX (10  $\mu$ M), AP5 (50  $\mu$ M), and bicuculline (10  $\mu$ M) were added to the bath solution to block glutamatergic and GABAergic ionotropic receptors. In these conditions, the remaining evoked response (eEPSC) was sensitive to MEC, methyllycaminotone (MLA) or dihydro- $\beta$ -eritroidine (DH $\beta$ E). eEPSCs were used to perform variance–mean (V–M plots) analysis (Clements and Silver, 2000). Thus, mean eEPSC amplitudes were plotted against eEPSCs variances. V–M plots in our recording conditions were linear (see Fig. 4E), suggesting a low probability of release ( $P_r$ ). Therefore, we analyzed V–M plots by fitting the equation to a straight line (Eq. 1),

$$y = Ax \quad (1)$$

where  $A$  is the slope. From this, a weighted average of the quantal amplitude,  $Q_w$ , was calculated (Eq. 2):

$$Q_w = A/(1 + CV^2) \quad (2)$$

where CV is the coefficient of variation of eEPSCs amplitudes.

### Immunocytochemistry

Neurons were filled with biocytin during recordings. A combination of intracellular labeling and 5-HT immunocytochemistry was used to determine the serotonergic nature of the recorded neuron. Slices containing injected neurons were fixed overnight with 4% paraformaldehyde and 1% picric acid in 0.1 M PBS, pH 7.4. The slices were then infiltrated with 30% sucrose and cut on a vibratome into 40- $\mu$ m sections. The sections were incubated 4–6 h in PBS solution containing 0.2 Triton X-100 and streptavidin conjugated to Cy3 (1 mg/ml; Zymed, SF, CA) to label the recorded neuron. Sections were rinsed in PBS and incubated for 18–24 h at 4°C with primary rabbit anti 5-HT antisera (Inctar/Diasorin, MN 20080, 1:1000). After rinsing in PBS, sections were reincubated for 1 h with secondary antibodies conjugated to Cy5 (Jackson ImmunoResearch, diluted 1:50). The reacted sections were first examined with an appropriate set of filters on an epifluorescence-equipped microscope.

Afterward, the sections were mounted in an anti-quenching media (Vectashield, Vector Laboratories) and examined under a confocal microscope (MRC 1024; Bio-Rad, Natford, UK) equipped with a Krypton/Argon laser. A two-line laser emitting at 550 and 650 nm wavelength was used for exciting Cy3 and Cy5, respectively. Digitized images were transferred to a personal computer by using the image-capturing software (Confocal Assistant, TC Brelje). Omission of primary antisera resulted in no detectable signal (data not shown).

### Drugs

Drugs were dissolved into the bath saline from daily made stock solutions and administered using a gravity-driven superfusion system. The time required for obtaining equilibrated concentrations of the drugs in the recording chamber was of 5–6 min. ACh was “puffed” in the vicinity of the recorded DRN neuron (see details above). TTX, *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid (AP5), L- $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazolepropionate and kainate receptor antagonist 6-cyano-2,3-dihydroxy-7-nitroquinoxaline (CNQX), (–)bicuculline methiodide, 5-hydroxytryptamine (5-HT), MEC, MLA, dihydro- $\beta$ -erythroidine hydrobromide (DH $\beta$ E), atropine, 4-aminopyridine (4-AP), and biocytin were purchased from Sigma Aldrich RBI (St. Louis, MO).

### Data analysis

Offline analysis of the data was performed using Clampfit 8 (Axon Instruments, Union City, CA), Mini Analysis (Synaptosoft, Decatur, GA), and graphing and statistical software packages (Origin v.6. Microcal, Northampton, MA; and Systat, Richmond, CA). Unless stated otherwise, data are expressed as means  $\pm$  SEM statistical comparisons between samples were made by using the free from distribution Mann-Whitney's *U* test ( $P < 0.05$  was taken as significant).

## RESULTS

### Anatomical and electrophysiological identification of 5-HT and non-5-HT neurons

Hundred and forty-seven neurons were recorded from the midline region of the DRN. Fifty-six neurons were processed for immunocytochemistry and 20 of them were identified as being serotonergic (called 5-HT neurons, Fig. 1Bb; 20 of 56 neurons or 36%). Thirty-six neurons were nonserotonergic (called non-5-HT neurons; 36 of 56 neurons or 64%). In addition, 5-HT and non-5-HT neurons were identified on the basis of their different electrophysiological properties (Beck et al., 2004; Li et al., 2001; Marinelli et al., 2004). Figures 1Aa and 1Ab show voltage and current traces obtained from the neuron depicted in Figure 1Bb. Voltage and current responses to hyperpolarizing

and depolarizing current steps (Fig. 1Aa) or voltage commands (not shown) (Fig. 1Ab; unclamped action currents were clipped) were used to build current-voltage relationships (*I*–*V* plots) (Fig. 1Ba). Filled circles were taken from current, and empty circles were taken from voltage traces, respectively. Superimposition of these *I*–*V* plots, taken with two different techniques, suggested that bridge balance and series resistance did not represent a problem. Direct inspection (Fig. 1) reveals that *I*–*V* plots are not linear. After fitting a third-order polynomial function, whole neuronal input resistance ( $R_N$ ) was approximated from its first derivative at the zero current point crossing the voltage axis. As previously reported (Aghajanian and Vandermaelen, 1982; Liu et al., 2002), the  $R_N$  of 5-HT neurons was significantly higher (mean  $\pm$  SEM)  $451 \pm 47 \text{ M}\Omega$  ( $n = 12$ ) than the one obtained from non-5-HT neurons:  $264 \pm 14 \text{ M}\Omega$  ( $n = 14$ ) ( $P < 0.01$ ). Non-5-HT neurons (Figs. 1C and 1D) exhibited higher firing frequencies (Fig. 1Ca) and a clear separation, with near zero slope, between inward and outward rectification in the *I*–*V* plot (Fig. 1Da).

A comparison of the firing properties of both neuron classes is shown in Figure 2. Current steps of increasing strength were intracellularly injected. Several representative voltage responses to them are shown, for a 5-HT neuron (Fig. 2A) and for a non-5-HT neuron (Fig. 2B). 5-HT neurons exhibited a maximal firing rate of  $7.1 \pm 1.5 \text{ Hz}$  ( $n = 13$ ) whereas non-5-HT neurons increased their firing rate up to  $25 \pm 5 \text{ Hz}$  ( $n = 8$ ) ( $P < 0.01$ ). Figure 2C illustrates average intensity-frequency relationships for both neuron classes (*I*–*F* plots). Note that firing properties can be used to separate both neuronal classes electrophysiologically.

Moreover, it has been reported that action potentials (APs) of 5-HT neurons exhibit an inflection during AP repolarization (Beck et al., 2004; Marinelli et al., 2004; Vandermaelen and Aghajanian, 1983). In our hands, this inflection or “shoulder” was found in 86% of 5-HT neurons and was clearly detected by the AP first time derivative (Figs. 2Da and 2Db left). In contrast, 89% of non-5-HT neurons did not exhibit the slightest inflection during AP repolarization (Figs. 2Da and 2Db right). Mean AP durations measured at the base were  $4.9 \pm 0.3 \text{ ms}$  ( $n = 15$ ) and  $3 \pm 0.2 \text{ ms}$  ( $n = 26$ ) for 5-HT and non-5-HT neurons, respectively ( $P < 0.05$ ). Box plots in Figure 2D (bottom) illustrate the distributions from samples of both cell classes. 5-HT and non-5-HT neurons also differed in the duration of their afterhyperpolarizing potentials (AHPs), which are prolonged in 5-HT neurons (not shown). Mean AHP durations were  $356 \pm 19 \text{ ms}$  ( $n = 15$ ) for 5-HT neurons and  $226 \pm 12 \text{ ms}$  for non-5-HT neurons ( $P < 0.05$ ). Many of these measurements were done in immunocytochemically identified neurons (not shown), bringing further support to electrophysiological identification.

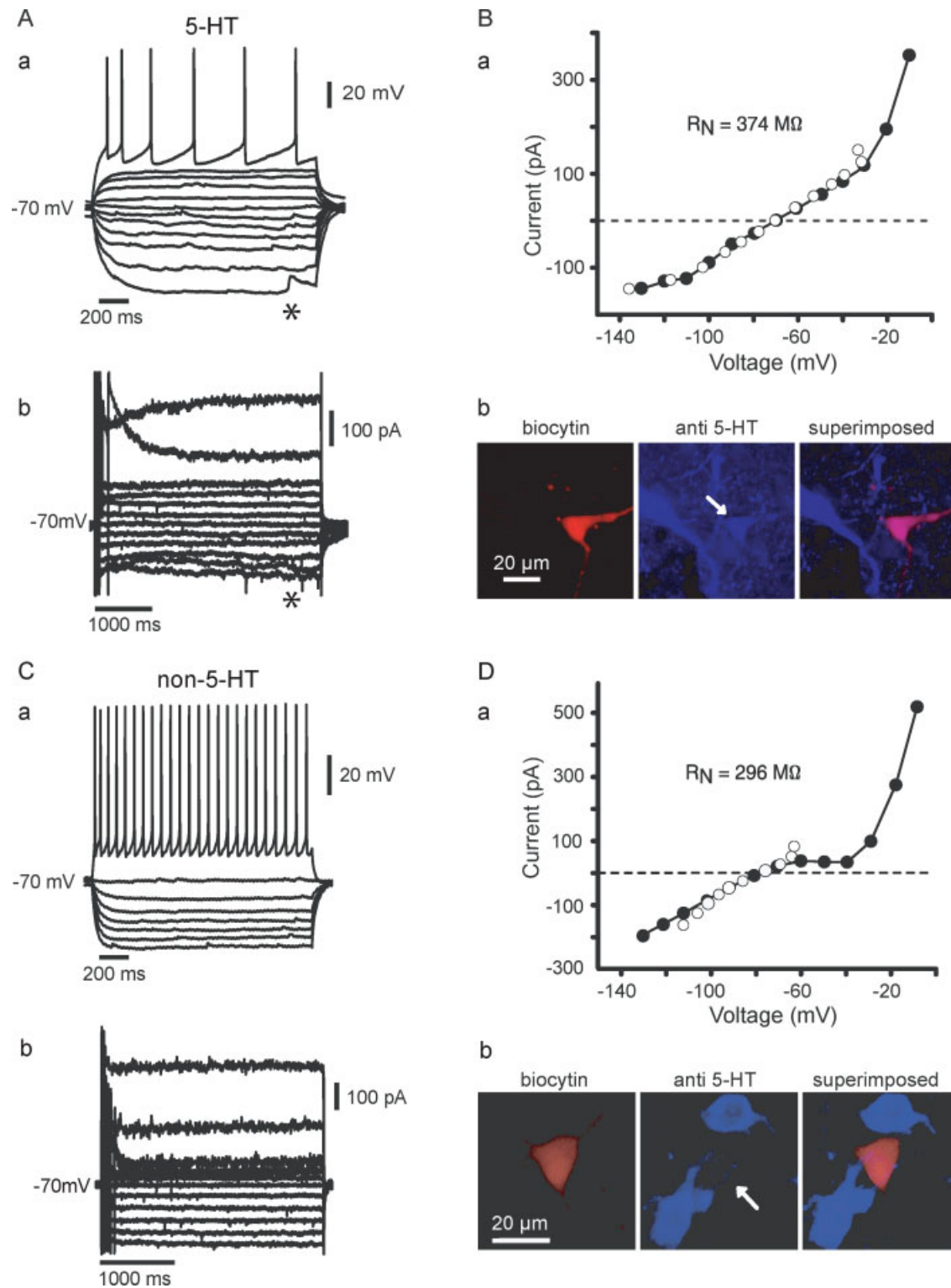


Fig. 1. Electrophysiological characteristics of serotonergic and nonserotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus. **(A)** Voltage traces (a) and current traces (b) in response to depolarizing and hyperpolarizing current steps or voltage commands (not shown), respectively, recorded from a serotonergic (5-HT) neuron. Holding potential =  $-70$  mV. **(B)** Current-voltage relationships (I-V plots) of the neuron in A (a). Traces were measured at the end of the traces as indicated (\*). Filled circles are measurements from current traces, and superimposed empty circles are measurements from voltage traces. A polynomial function was fitted to the data points and input resistance ( $R_N$ ) was obtained from its first derivative at zero current. Microphotographs (b) illustrating the recorded cell

after biocytin staining (left), 5-HT-immunoreactivity (middle), and merge (right). **(C)** Voltage traces (a) and current traces (b) in response to depolarizing and hyperpolarizing current steps or voltage commands (not shown), respectively, recorded from a nonserotonergic (non-5-HT) neuron. Holding potential =  $-70$  mV. **(D)** I-V plots of the neuron in C (a). Traces were measured at the end of the traces. Filled circles are measurements from current traces, and superimposed empty circles are measurements from voltage traces. Note a clear separation between inward and outward rectification in the I-V plot.  $R_N$  was obtained as in (B). Microphotographs (b) illustrating the recorded cell after biocytin staining (left), negative 5-HT-immunoreactivity (middle), and merge (right).

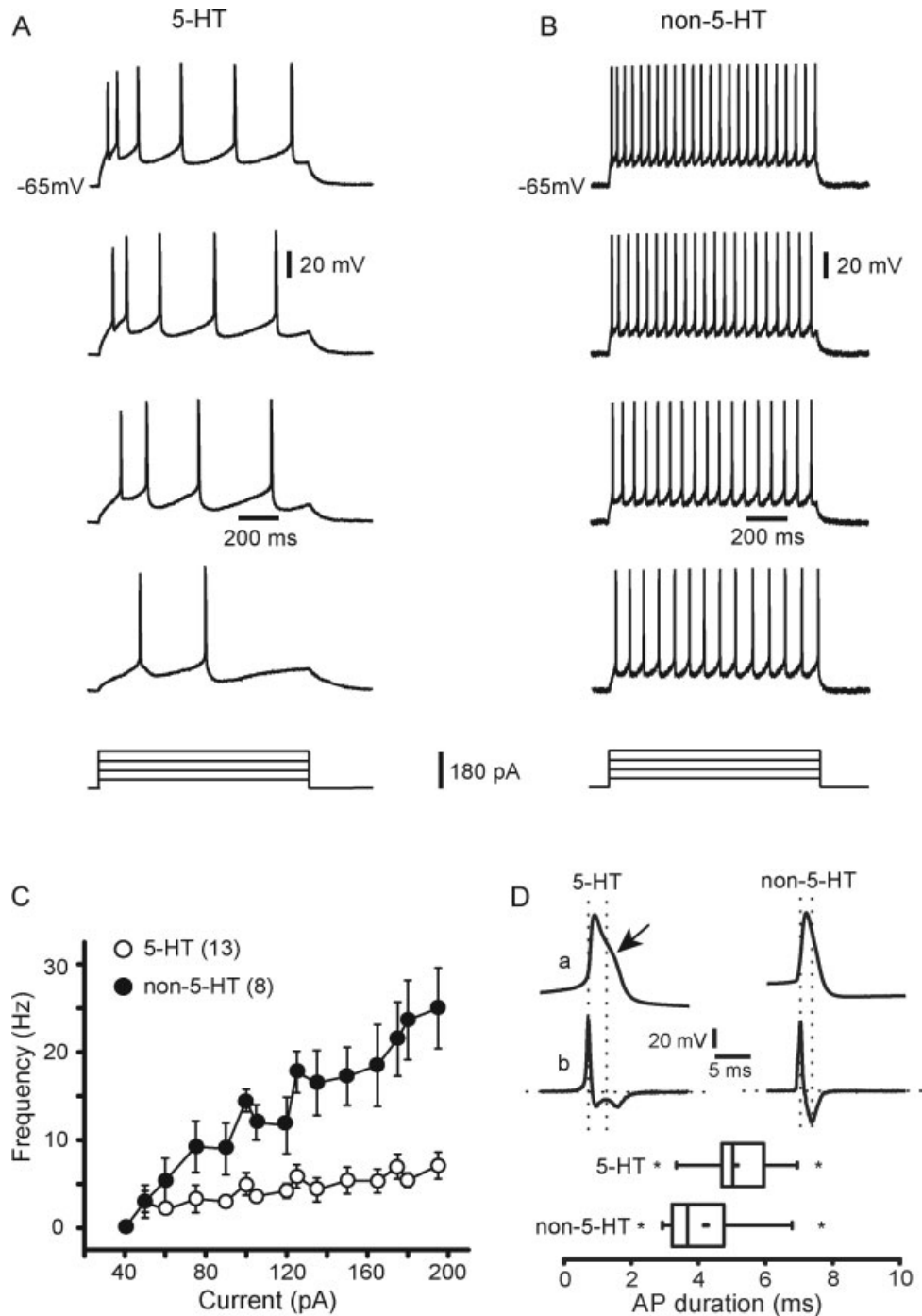


Fig. 2. Intensity-frequency relationship in 5-HT and non-5-HT neurons. (A) Sample records of repetitive firing in response to depolarizing current steps (showed below) of increasing strength (from bottom to top) in a 5-HT neuron. (B) Repetitive firing in response to depolarizing current steps (showed below) of increasing strength in a non-5-HT neuron. (C) Average intensity-frequency relationships (I-F plots) built with protocols similar to those shown in A and B and obtained from thirteen 5-HT (empty circles) and eight non-5-HT cells (filled circles). 5-HT neurons exhibited lower firing frequencies and could not surpass 10 Hz. In contrast, non-5-HT

neurons of the DRN can fire at higher frequencies. Each data point represents the mean  $\pm$  SEM. (D) Fast time scale recordings of action potentials (APs) elicited by small brief depolarizing current pulses (not shown) (a) recorded from 5-HT (left) and non-5-HT (right) neurons. Note slower AP repolarization for 5-HT neurons. First time derivatives of these APs (b) emphasize the difference in AP repolarization. Box plots comparing APs duration, measured at threshold level, in representative samples of 5-HT and non-5-HT neurons (bottom).

After reaffirming safe ways to identify 5-HT from non-5-HT neurons in the DRN, we wanted to see if a cholinergic pathway, impinging on these neurons, was preserved in coronal brain stem slices.

### The pedunclopontine-raphé pathway

Figures 3A and 3B illustrate the protocol for the orthodromic stimulation of the pedunclopontine (PPT)-raphe pathway (PPT → DRN orthodromic connection or synapse). Field stimulation was delivered at the pedunclopontine tegmental nucleus (PPT) (Fig. 3A) while recording was being performed on a neuron at the center of the DRN. A representative response is illustrated (Fig. 3B1). This synaptic response commonly had an inflection in its rising phase. After adding 10  $\mu$ M CNQX, 50  $\mu$ M AP5, and 10  $\mu$ M bicuculline to block all glutamatergic and GABAergic ionotropic currents (Pan and Williams, 1989), a smaller synaptic current remained (Fig. 3B2). It coincided with the inflection in the rising phase of the whole synaptic current. This smaller response was completely blocked by 10  $\mu$ M MEC (Fig. 3B3); indicating the presence of a cholinergic nicotinic response in the synaptic current, evoked from the PPT. Then, the location of recording and stimulation electrodes was switched (Fig. 3C): stimulus was delivered to the DRN while recording from a PPT neuron. Antidromic action potentials (APs) could be recorded from six of seven PPT neurons after DRN stimulation (Fig. 3D1 right). If antidromic APs were preceded by an AP evoked directly with a brief depolarizing current (Figs. 3D1), the interval between both APs could be reduced until they collided (Fig. 3D2). It was then concluded that a part of the PPT → DRN connection is preserved in these brain stem slices. This inference was further supported by anterograde tracing using biocytin (Fig. 3E) (see Methods section and Ibanez-Sandoval et al., 2006). From the site of biocytin injection in the PPT (Fig. 3F arrow), to the location of the DRN near the aqueduct (dashed rectangle in Fig. 3F), numerous and scattered stained fibers could be observed. A magnification of the DRN (Fig. 3G) clearly showed stained fibers arriving to the DRN. Therefore, the present experiments demonstrate the functionality of the PPT → DRN connection in a slice preparation. They also show that a cholinergic nicotinic component could be isolated by stimulating this connection and adding glutamate and GABA receptor blockers. These results suggest that DRN neurons have functional postsynaptic nicotinic cholinergic receptors (nAChRs).

### Postsynaptic nicotinic synaptic responses in DRN neurons

To further characterize the synaptic response evoked from the PPT, trains of PSCs (10–50 Hz) were evoked by stimulating the PPT → DRN connection.

Figure 4A shows that, in response to a 14 Hz train of stimuli, the short-term dynamics of the whole (composite) response is depression (short-term depression or STD). STD was present at all frequencies studied (not shown). The latency to the first PSC was  $7 \pm 0.1$  ms ( $n = 9$ ) and remained constant for all stimulation strengths (not shown); confirming a monosynaptic connection (see above). Black trace is the average of 80 consecutive trials and gray traces represent individual trials, showing quantal variability. After addition of CNQX, AP5, and bicuculline to the bath solution, the amplitude of the response decreased leaving the nicotinic component (Fig. 4B). This amplitude reduction was accompanied by a change in slope in the variance–mean relationship (V–M plot) from (slope  $\pm$  SE):  $14.6 \pm 1.35$  in the control versus  $3.8 \pm 0.5$  after blocking glutamatergic and GABAergic receptors (Fig. 4E;  $P < 0.001$ , Student's *t* test). However, STD still was the dominant short-term plasticity for the nicotinic response. The addition of 100 nM MLA, a selective antagonist of nAChRs having  $\alpha 7$  subunits, further decreased the amplitude of the synaptic currents (Fig. 4C), although it did not completely block the responses in some cells (see below). Slope of V–M plot after MLA action was:  $2.7 \pm 0.3$  (Fig. 4E;  $P < 0.001$  with respect to the control and  $P < 0.05$ —one tailed—with respect to MLA). After MLA, the short-term plasticity was still STD. The further addition of 100 nM DH $\beta$ E, a selective antagonist of nAChR having  $\alpha 4\beta 2$  subunits, in the continuous presence of the other blockers, abolished all synaptic responses (Fig. 4D), indicating that the two types of nicotinic receptors are involved in this response in some cells. Similar results were obtained if DH $\beta$ E preceded MLA (not shown), suggesting that both nicotinic receptors are postsynaptic. Because data points for the V–M plots (Ibanez-Sandoval et al., 2006) could only be fitted by straight lines, and it can be inferred that these terminals have a low release probability (Clements and Silver, 2000). Figure 4F illustrates that the cell from which the recordings were taken was a 5-HT neuron. A nicotinic component was detected in 9 of 13 of PPT → DRN connections evaluated in this way (70%). Three of these connections had 5-HT postsynaptic neurons and six had non-5-HT neurons as their target. MEC (10  $\mu$ M) was tested in two neurons, showing complete blockage in both cases. In five of nine cells, nicotinic EPSCs were completely blocked by DH $\beta$ E when it was first administered, indicating a strong expression of  $\alpha 4\beta 2$  nAChRs in DR neurons. In two of nine neurons (one 5-HT and the other non-5-HT), the EPSCs could only be completely blocked by administering both MLA and DH $\beta$ E, suggesting that some cells express both  $\alpha 7$  and  $\alpha 4\beta 2$  nAChRs.

A correlation of these results was then assessed by testing nAChRs antagonists against ACh adminis-

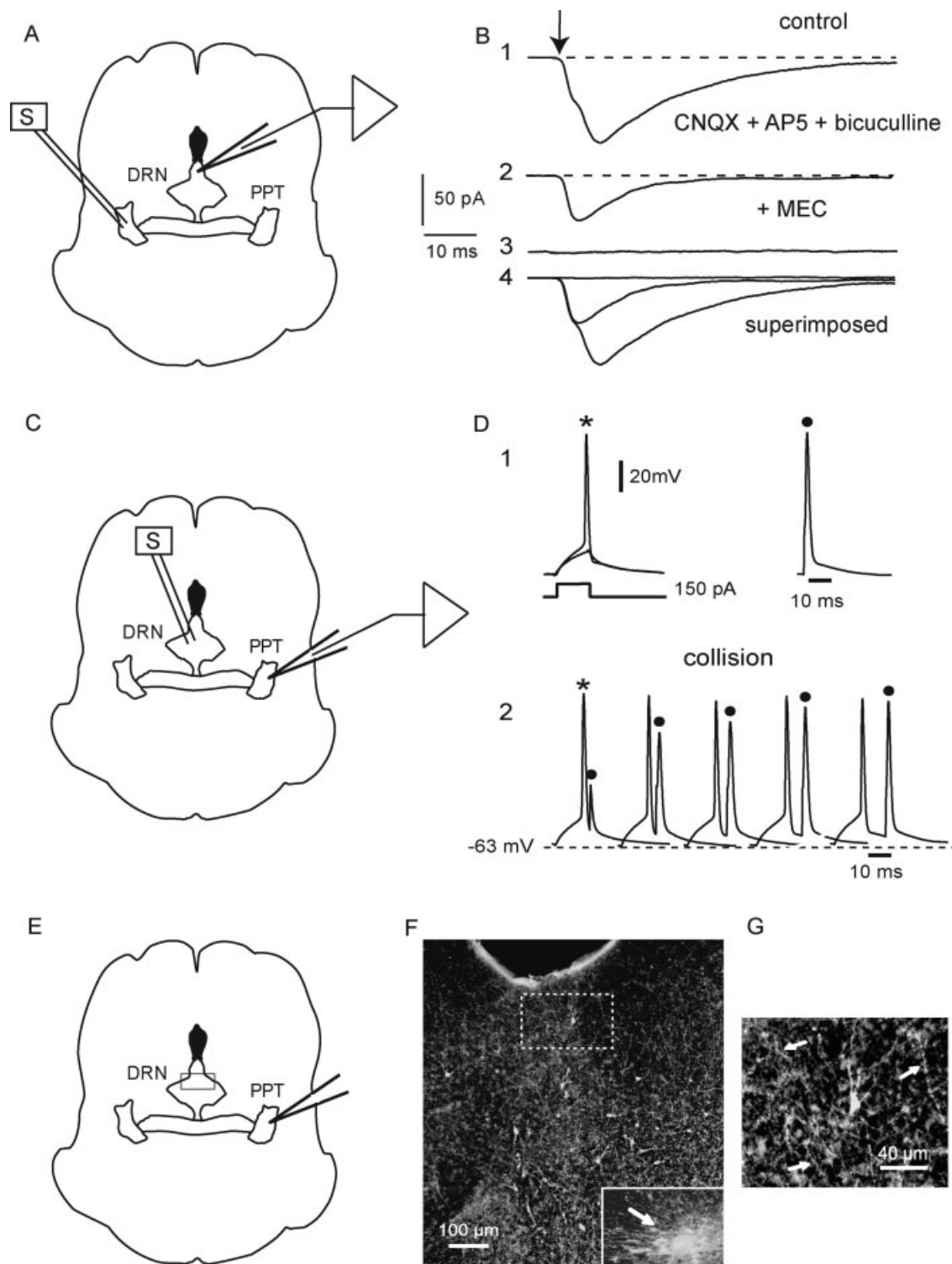


Fig. 3. The synaptic response has a nicotinic component. (A) Experimental arrangement used to evoke cholinergic EPSCs on DR neurons. Field stimulation electrode is located in the PPT while recording a DR neuron (PPT → DRN orthodromic connection). (B) Synaptic currents obtained during PPT stimulation in 5-HT- and non-5-HT neurons of the DRN. The synaptic response exhibits more than one component in its rising phase (1). After administering 10  $\mu$ M CNQX, 50  $\mu$ M AP5, and 10  $\mu$ M bicuculline into the bath saline (2), a remaining synaptic response was still observed. This response can be blocked by mecamylamine (+MEC), suggesting it is a current (EPSC) carried by cholinergic nicotinic receptors (nAChRs) (3). Superimposition of 1–3 (4). (C) Experimental arrangement used to evoke antidromic action potentials (APs) in PPT neurons after field

stimulation on the DRN. This shows viability of the pathway in coronal slices. (D) AP in a PPT neuron (PPT → DRN) evoked by a brief intracellular current pulse and antidromic AP (●) in the same neuron, evoked by stimulating in the DRN (1). A collision experiment of the direct and antidromic APs is illustrated. Antidromic AP is abolished when the time interval is  $\leq 2.5$  ms. (E) Experimental arrangement used to stain fibers of the pedunculo-pontine-raphé pathway. Electrode tip instilled biocytin in a living slice (see Methods section and Ibanez-Sandoval et al., 2006). (F) Stained fibers can be seen scattered between the site of injection (arrow) in the PPT, and the DRN (e.g., dashed rectangle). (G) Magnification of dashed rectangle in F shows abundance of stained pedunculo-pontine-raphé fibers (arrows).



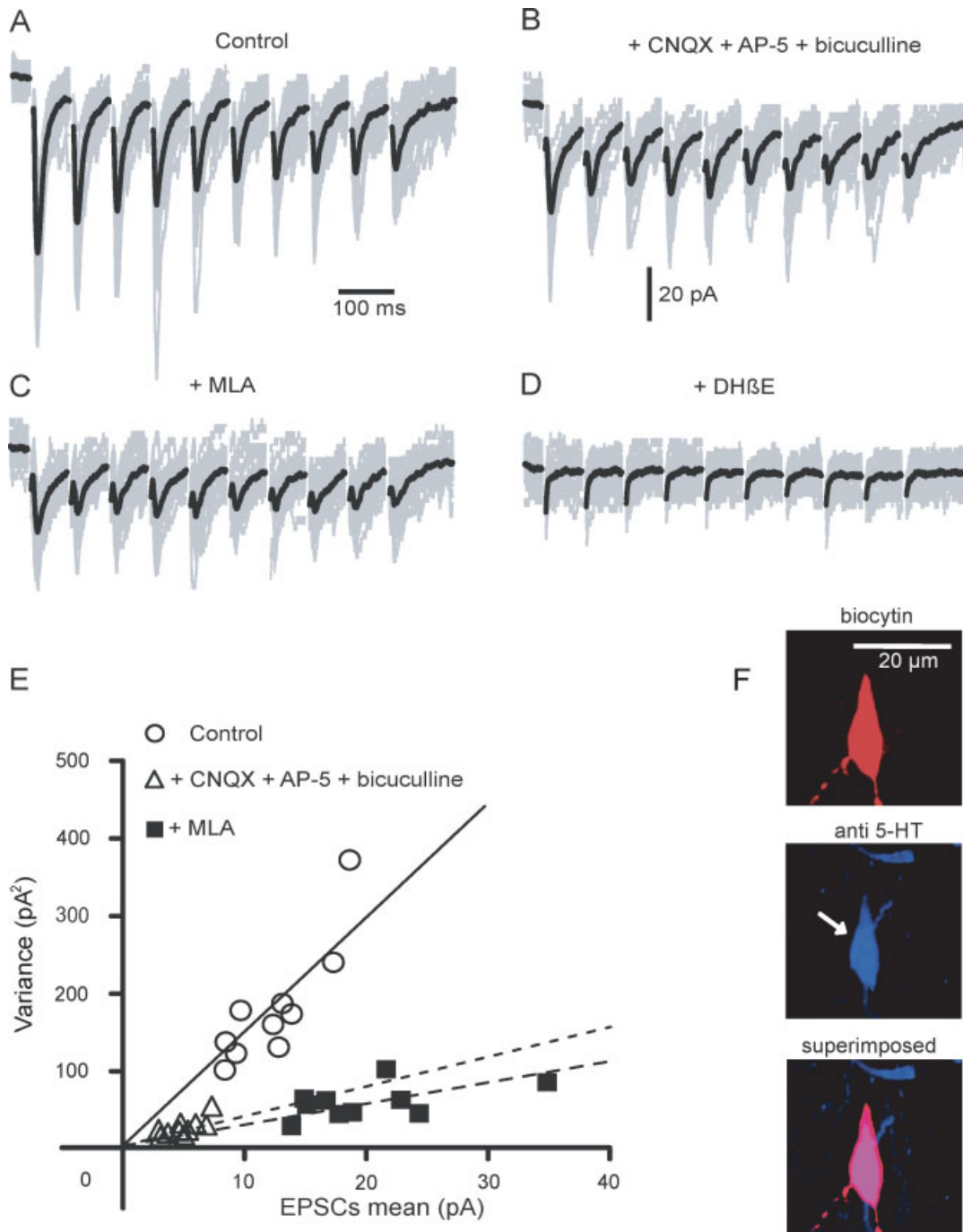


Fig. 4. EPSCs evoked in DRN neurons by PPT stimulation. (A) Trains of 10 EPSCs evoked at 14 Hz show synaptic depression as the short term dynamics of the PPT → DRN connection (control). Black trace is the average of 80 consecutive trials. Gray traces are individual traces showing quantal variation. (B) CNQX (10 μM), AP5 (50 μM), and bicuculline (10 μM) did not block, but only decreased, the amplitude of the EPSCs. (C) addition of the selective α7 nAChR antagonist, MLA (100 nM) further reduced the amplitude of EPSCs but did not block them completely. Synaptic depression still was the short term dynamics. (D) Addition of the selective

α4β2 nAChR antagonist dihydro-β-eritroidine (DHβE) (100 nM) in the continuous presence of the other blockers, abolished the remaining EPSCs. (E) Variance-mean plots at different conditions: mean EPSCs peak variances as a function of mean EPSCs peak amplitudes clearly disclosed three different clusters of data points that could only be fitted by three different straight lines, suggesting that all blockers acted postsynaptically and that these terminals possess a low release probability in all three conditions (straight lines had different slopes, see Methods section). (F) the cell whose recordings are shown in A–D was 5-HT immunoreactive (white arrow).

tered directly on DRN neurons. ACh (1 mM in the application pipette) was applied by pressure (“puffs,” see Methods section), using a micropipette located on

top of the recorded neuron. Thirty-six DRN neurons were tested in this way using the whole cell voltage clamp mode at a holding potential of −70 mV. In

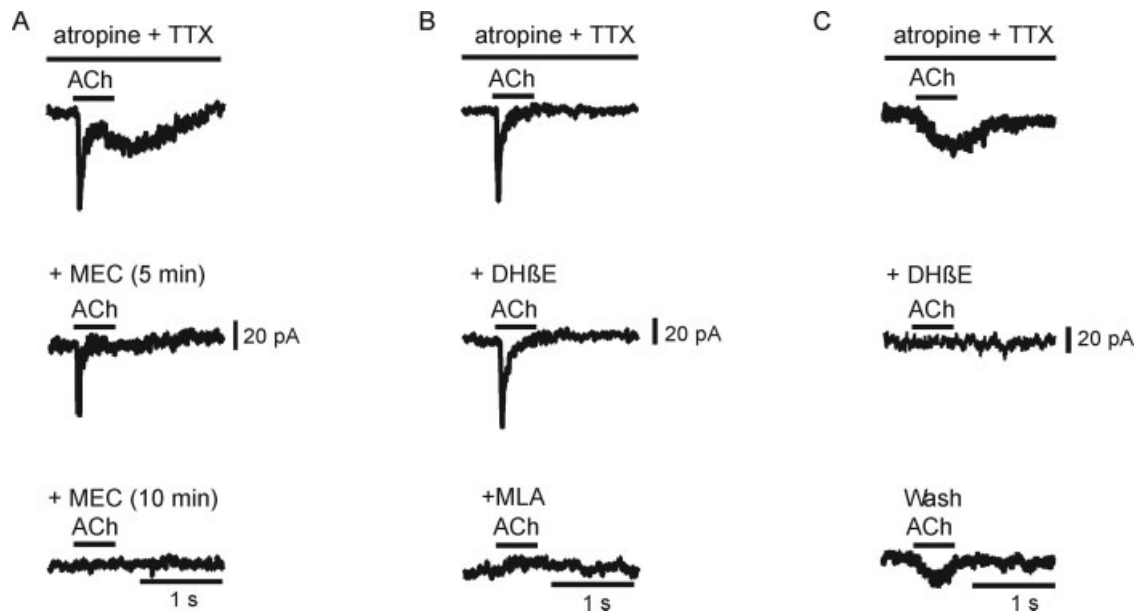


Fig. 5. Local administration of ACh evoked inward currents in 5-HT neurons. (A) From top to bottom: a “puff” of ACh (1 mM, 500 ms) on top of a 5-HT neuron evoked inward currents exhibiting fast and slow components (top trace). The slow component was completely blocked 5 min after the application of mecamylamine (10  $\mu$ M, middle trace), while the fast component was blocked subsequently, 10 min after the application of the drug (bottom trace). (B) Illustrates a cell that only exhibited the fast current after the “puff” of ACh (top trace). The fast current was insensitive to the  $\alpha$ 4 $\beta$ 2

nAChR selective antagonist DH $\beta$ E (100 nM, middle trace). However, it was blocked by the  $\alpha$ 7 nAChR selective antagonist, MLA (100 nM) (bottom trace). (C) Illustrates a cell that only showed the slow current after the “puff” of ACh (top trace). The slow current was sensitive to DH $\beta$ E (middle trace). The antagonist effect was reversible (bottom trace). All three cells shown were 5-HT immunoreactive (not shown). All recordings were performed in the presence of atropine (5  $\mu$ M) and TTX (1  $\mu$ M) to avoid muscarinic and indirect actions, respectively.

addition, 5  $\mu$ M atropine and 1  $\mu$ M TTX were added to the bath saline to block muscarinic receptors and indirect effects, respectively. Thus, the responses described below can be said to be direct, postsynaptic, and nicotinic. ACh evoked inward currents in 24 of 36 neurons tested. However, evoked inward currents could exhibit two different kinetic components: fast and slow. Figure 5 illustrates representative experiments for 5-HT neurons. But the results of these experiments, described below, were also observed in non-5-HT neurons (not shown). Figure 5A illustrates a case in which both fast and slow inward currents were elicited by the ACh “puffs.” Both components were blocked by the nonselective nAChR antagonist MEC (10  $\mu$ M). The slow current was blocked first, suggesting different sensitivities for MEC of the two currents, that is, different molecular targets. Figure 5B shows a neuron that only exhibited the fast inward current, which was unaffected by 100 nM of the selective  $\alpha$ 4 $\beta$ 2 nAChR antagonist, DH $\beta$ E. However, it was completely blocked by the selective  $\alpha$ 7 nAChR antagonist MLA (100 nM). This experiment supports the suggestion that fast and slow currents result from the actions of two different receptors. Finally, a neuron that exhibited only the slow inward current is shown in Figure 5C. This slow inward current was blocked by the selective  $\alpha$ 4 $\beta$ 2 nAChR antagonist DH $\beta$ E (100 nM). This experiment further sup-

ported the notion that postsynaptic nicotinic receptors in these cells belong to two different types and that both of them could be present in the same class of postsynaptic neuron. In fact, 15 of 24 (63%) neurons only showed the slow DH $\beta$ E-sensitive component. From these cells, five were identified as being 5-HT and 10 were non-5-HT neurons. On the other hand, 4 of 24 (17%) only exhibited the fast component. Three of them were 5-HT and one was non-5-HT neuron. Finally, 5 of 24 (21%) exhibited both components. Three were 5-HT and two were non-5-HT neurons. In 12 of 36 (33%) neurons, no response was observed after ACh administration. Average amplitudes for fast and slow nicotinic currents were  $156 \pm 52$  pA for the fast and  $33 \pm 5$  pA for the slow current. Rising times to 90% to the current peak were  $39 \pm 7$  ms for the fast and  $459 \pm 53$  ms for the slow current. The records in Figures 5A–5C were obtained from immunocytochemically identified 5-HT neurons (not shown).

### Nicotinic spontaneous postsynaptic currents

The final evidence supporting the postsynaptic origin of these nicotinic events came from sPSCs recorded from DRN neurons in the whole cell voltage clamp mode. A subpopulation of sPSCs sensitive to nAChRs antagonists was detected in 12 of 18 or 66%

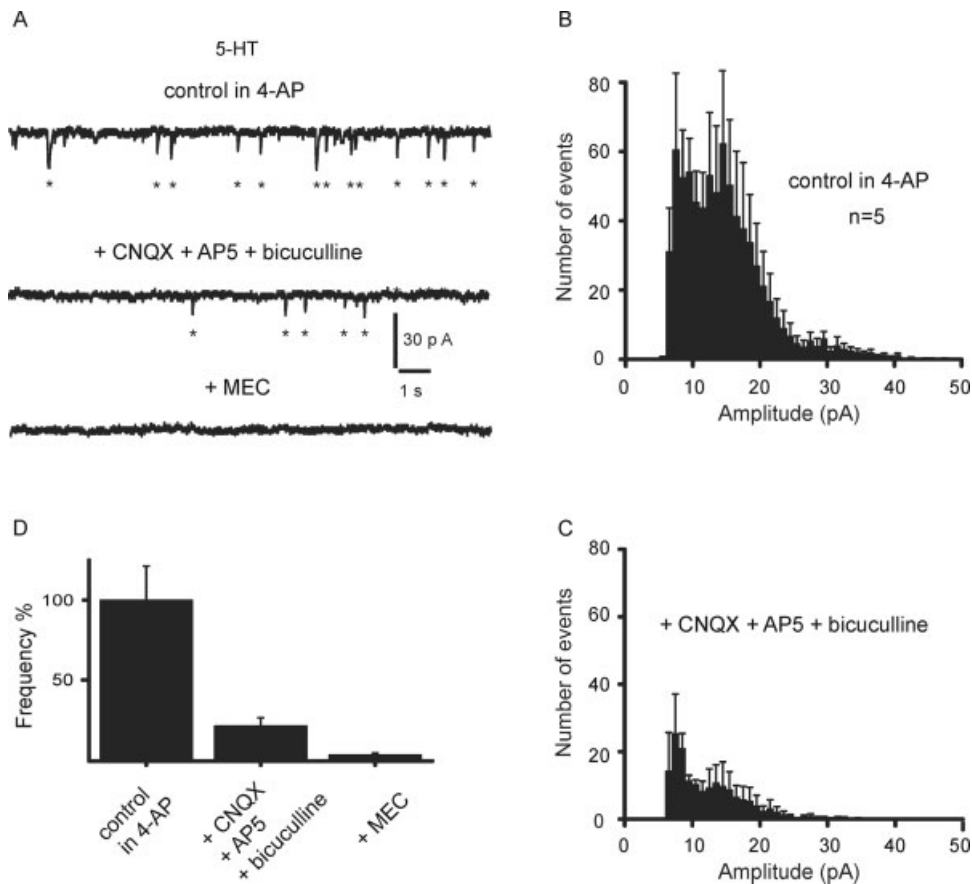


Fig. 6. Mecamylamine blocks spontaneous EPSCs in 5-HT neurons. (A) From top to bottom: spontaneous postsynaptic currents (sPSCs) induced by 100  $\mu$ M 4-aminopyridine (4-AP) (top trace) recorded at a holding potential of  $-70$ mV. Note that frequency of sPSCs is only reduced by the addition of CNQX (10  $\mu$ M), AP5 (50  $\mu$ M), and bicuculline (10  $\mu$ M) (middle trace). Remaining sEPSCs were blocked by 10  $\mu$ M mecamylamine. (B) Amplitude histogram of sEPSCs obtained from a sample of 5-HT neurons. (C) Amplitude

histogram of sEPSCs obtained from the same sample of 5-HT neurons after adding the glutamatergic and GABAergic blockers (middle trace in A). Note that a decrease in the number of events does not change amplitude range. (D) Histogram summarizes the results from a sample of neurons under the three different conditions. The cells represented in A–D, were immunoreactive for the 5-HT antibody (not shown).

of the cells, from which five neurons were 5-HT immunoreactive (42%) (Fig. 6), and the rest was not (Fig. 7). In control conditions, the frequency of sPSCs was low ( $0.26 \pm 0.03$  Hz) in both neuron classes. However, after adding 100  $\mu$ M 4-AP into the bath saline, the frequency of sPSCs increased (Figs. 6A and 7A, top) (Flores-Hernandez et al., 1994, 1997; Tibbs et al., 1989). In the presence of 4-AP, the frequency of the sPSCs increased to (mean  $\pm$  SEM)  $2.8 \pm 0.5$  Hz for 5-HT and  $1.6 \pm 0.4$  Hz for non-5-HT neurons ( $P < 0.01$ ). Amplitude histograms were constructed from 15-min recordings before and after adding glutamate and GABA receptor antagonists in samples of neurons identified with post hoc immunocytochemistry (see Methods section). Control histograms were skewed to the right. Median amplitude of sEPSCs was  $9.9 \pm 3.6$  pA for 5-HT neurons; the histogram clearly showing a first mode around 10 pA (Fig. 6B). Median amplitude for non-5-HT neurons was  $12.03 \pm 2.5$  pA (Fig. 7B). After adding antagonists of glutamatergic and

GABAergic ionotropic receptors (10  $\mu$ M CNQX, plus 50  $\mu$ M AP5, plus 10  $\mu$ M bicuculline), the nicotinic sEPSCs were isolated in both cell classes (cf., Figs. 6A and 7A top and middle traces). By itself, this maneuver decreased sPSCs mean frequency to  $0.39 \pm 0.09$  Hz in 5-HT neurons ( $P < 0.01$ ) and to  $0.37 \pm 0.08$  Hz in non-5-HT neurons ( $P < 0.01$ ), giving a similar (low) release probability for all inputs (Fig. 4E). This finding means that nicotinic events constitute about 13% of functional postsynaptic inputs in 5-HT neurons and about 23% in non-5-HT neurons. Note that, although sEPSCs frequency (see above) is significantly different in the controls (all ionotropic responses together), it is not significantly different when the nicotinic component is isolated; suggesting that both cell classes received inputs from the same afferents. In spite of a change in sEPSCs frequency after glutamate and GABA receptor blockers (see Figs. 6C, 6D, 7C, and 7D), median amplitude of sEPSCs did not change significantly. It was  $9.6 \pm 3.1$

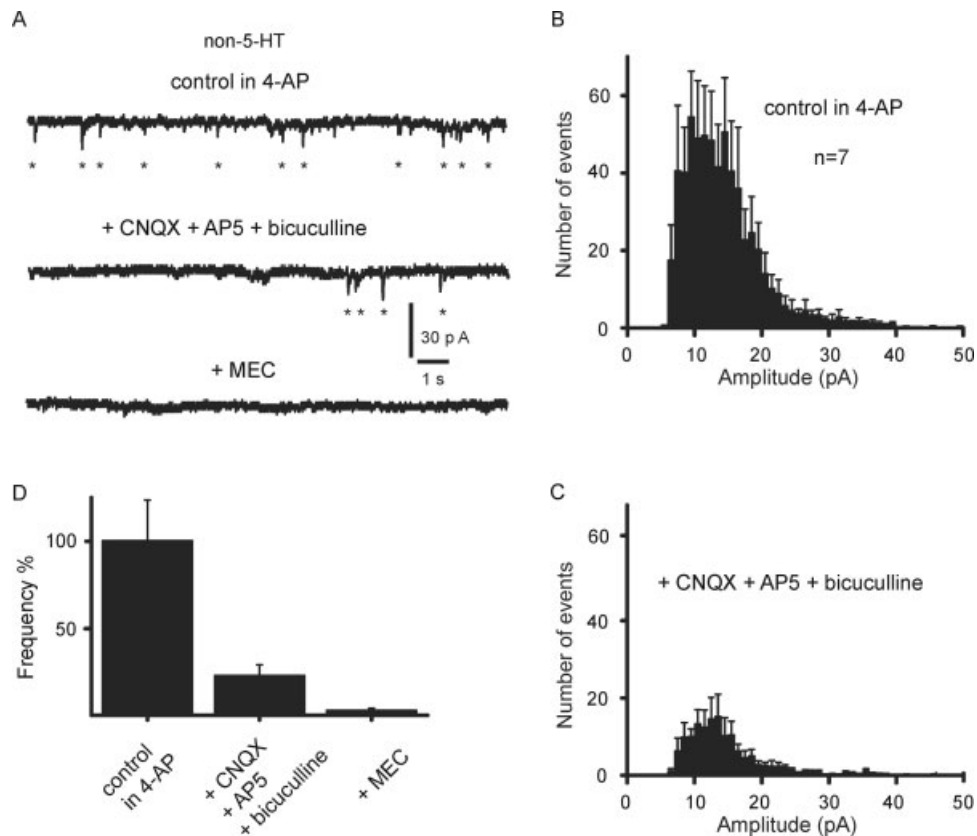


Fig. 7. Mecamylamine blocks spontaneous EPSCs in non-5-HT neurons. (A) From top to bottom: spontaneous postsynaptic currents (sPSCs) induced by 100  $\mu$ M 4-aminopyridine (4-AP) (top trace) recorded at a holding potential of  $-70$  mV. Frequency of sPSCs is reduced by the addition of CNQX (10  $\mu$ M), AP5 (50  $\mu$ M), and bicuculline (10  $\mu$ M) (middle trace). Remaining sEPSCs were blocked by 10  $\mu$ M mecamylamine. (B) Amplitude histogram of sEPSCs obtained

from a sample of non-5-HT neurons. (C) Amplitude histogram of sEPSCs obtained from the same sample of non-5-HT neurons after adding the glutamatergic and GABAergic blockers [middle trace in (A)]. Note decrease in the number of events does not change amplitude range. (D) Histogram summarizes the results from a sample of neurons under the three different conditions. The cells represented in (A–D) were not immunoreactive for the 5-HT antibody.

pA for 5-HT neurons and  $13.01 \pm 3.5$  pA for non-5-HT neurons, respectively. That is, amplitudes of the nicotinic responses were basically the same as that of composite (glutamate, GABA, and nicotinic) responses. Nicotinic sEPSCs were completely abolished by the nAChRs antagonist MEC (10  $\mu$ M; Figs. 6A and 7A, bottom traces). Neurons represented in Figure 6A–6D were immunoreactive while those represented in Figures 7A–7D were not immunoreactive for the 5-HT antibody (not shown).

## DISCUSSION

The main finding of this study was that identified neurons in the DRN (both serotonergic and nonserotonergic) possess functional postsynaptic nAChRs of  $\alpha 7$  and  $\alpha 4\beta 2$  subtypes. Additional evidence demonstrating one pathway (PPT  $\rightarrow$  DRN) that uses these postsynaptic nAChRs receptors was advanced.

Functionality of nAChRs was demonstrated with orthodromic stimulation, recordings of spontaneous postsynaptic events and direct ACh applications.

These physiological experiments correlate with previous studies showing the presence of  $\alpha 4$ ,  $\beta 2$ , and  $\alpha 7$  nAChRs subunits in DRN neurons (Bitner et al., 2000; Bitner and Nikkel, 2002; Cucchiario and Commons, 2003; Seguela et al., 1993; Wada et al., 1989). In addition, it has been shown that subcutaneous administration of epibatidine, a potent agonist of  $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 3\beta 2$ , and  $\alpha 3\beta 4$  nAChRs (Gerzanich et al., 1995), increased c-fos expression in DRN neurons (Cucchiario and Commons, 2003). Moreover, anatomical evidence suggests that cholinergic projections to the DRN originate from the LDT and PPT areas (Wolf and Butcher, 1989).

Although a functional demonstration of postsynaptic nAChRs in DR neurons was lacking, extracellular recordings performed in midbrain slices indicated that nicotine increased the firing rate of 5-HT DRN neurons (Mihailescu et al., 1998, 2002), and whole cell voltage clamp studies have shown that nAChRs agonists generate slow inward currents in 5-HT DRN neurons. However, these effects were attributed to a presynaptic release of noradrenaline via the activa-

tion of  $\alpha 7$  nAChRs (Li et al., 1998). Because nAChRs agonists were applied into the bath saline, desensitization of nAChRs and/or contamination with indirect effects could have taken place (Gray et al., 1996; Pidoplichko et al., 1997; Wu et al., 2004). Therefore, in this work, we applied ACh (1 mM) locally and directly via a pressure ejection system ("puffs") and performed the experiments in the presence of TTX and atropine to avoid indirect and muscarinic effects. In these conditions, ACh application induced inward currents blocked by selective nAChR antagonists. The results obtained with these directly evoked nicotinic currents matched those obtained with the orthodromic activation of the PPT  $\rightarrow$  DRN connection. Field stimulation within the PPT evoked nicotinic EPSCs. Both protocols demonstrated the presence of MLA and DH $\beta$ E sensitive PSC indicating the presence of  $\alpha 7$  and  $\alpha 4\beta 2$  nAChRs. The PPT  $\rightarrow$  DRN connection was monosynaptic because changes in stimulation strength did not change latency to first eEPSC. Taken together, the experiments demonstrated the functionality of postsynaptic nAChRs in biocytin injected and immunocytochemically identified 5-HT and non-5-HT neurons of the DRN.

Evoked nicotinic EPSCs also demonstrated that one pathway using these postsynaptic receptors is the PPT  $\rightarrow$  DRN connection. The viability of this connection was demonstrated with the generation of antidromic action potentials in PPT neurons after field stimulation in the DRN. These antidromic APs could be seen to collide with direct APs induced in PPT cells. In addition, diffuse anterograde labeling of fibers reaching the DRN, after localized biocytin injections in the PPT, was also demonstrated (see Ibanez-Sandoval et al., 2006).

Locally and directly applied ACh generated two types of inward currents in identified 5-HT DRN neurons. The first current exhibited the electrophysiological and pharmacological profile of  $\alpha 7$  nAChRs-mediated currents: high amplitude, fast rising time, short decay time, and sensitivity to MLA (Klink et al., 2001; Pidoplichko et al., 1997; Wooltorton et al., 2003; Wu et al., 2004). The second current exhibited a relatively smaller amplitude, slower kinetics, and sensitivity to DH $\beta$ E; all of them are characteristics of  $\alpha 4\beta 2$  nAChR-mediated currents (Pidoplichko et al., 2004; Wooltorton et al., 2003; Wu et al., 2004). In some neurons, both  $\alpha 7$  and  $\alpha 4\beta 2$  currents were observed. Evoked eEPSCs also showed separate sensitivity to both MLA and DH $\beta$ E. The results therefore indicate that both  $\alpha 7$  and  $\alpha 4\beta 2$  nAChRs subunits can form functional postsynaptic nAChRs in 5-HT DRN neurons. Further research is needed to find what factors regulate the expression of these receptors and the differences in the cells getting either class of receptor. In the present conditions,  $\alpha 7$  nAChRs are more seldom expressed by 5-HT DRN neurons than  $\alpha 4\beta 2$  ones.

Finally, recordings of spontaneous events (sPSCs), whose frequency was enhanced by 4-AP (Flores-Hernandez et al., 1994, 1997), confirmed that 5-HT DRN neurons are the target of cholinergic afferents. Although most sEPSCs were blocked by a mixture of GABA and glutamate ionotropic receptor antagonists, in several neurons, remaining sEPSCs were observed. They could be suppressed by the nAChR antagonist MEC (10  $\mu$ M) (Pidoplichko et al., 1997), that is, they were nicotinic. Besides, the PPT  $\rightarrow$  DRN connection, these sEPSPs may also come from the LDT nuclei, which send projections to the DRN (Woolf and Butcher, 1989). Interestingly, nicotinic eEPSCs exhibited STD, suggesting that this synapse is capable of responding quickly to salient environmental stimuli (Abbott and Nelson, 2000).

### Functional implications of the presence of postsynaptic nAChRs on 5-HT DRN neurons

Wakefulness is maintained by multiple neuronal systems that use various neurotransmitters such as: glutamate, noradrenaline, dopamine (DA), serotonin, histamine, orexin, and ACh (Jones, 2005a). Common characteristics of these neurotransmitter systems are: widespread projections to the cerebral cortex, connections with subcortical areas, and mutual excitatory influences (Jones, 2005b). The activity of both 5-HT DRN neurons (Jacobs and Fornal, 1991; Lydic et al., 1987; McGinty and Harper, 1976) and noradrenergic locus coeruleus neurons (Foote et al., 1983) is the highest during wakefulness, decreases during slow wave sleep, and virtually ceases during rapid eye movement (REM) sleep. During the wake state, 5-HT DRN neurons and noradrenergic locus coeruleus neurons tonically inhibit the activity of a reduced group of cholinergic LDT and PPT neurons via inhibitory 5-HT<sub>1A</sub> and  $\alpha 2$ -noradrenergic postsynaptic receptors. These so-called REM-on neurons (Williams and Reiner, 1993) are highly active during REM sleep only (Leonard and Llinas, 1994; Luebke et al., 1992). In contrast, the majority (50%–75%) of LDT and PPT cholinergic neurons are highly active during both wakefulness and REM sleep (Steriade et al., 1990a,b), in which they are insensitive to the inhibitory actions of the specific 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-hydroxy-2-(di-*n*-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT) (Thakkar et al., 1998). These neurons, referred as Wake/REM-on neurons, are thought to contribute to the maintenance of wakefulness via projections to the thalamus (El Mansari et al., 1990; Steriade et al., 1990a,b). It is our working hypothesis that cholinergic Wake/REM-on neurons send projections to 5-HT DRN neurons, and therefore, are responsible for the nicotinic postsynaptic responses we observe in 5-HT neurons. That is, Wake/REM-on cells may contribute in maintaining the waking state via direct stimulation of postsynaptic

nAChRs located on 5-HT DRN neurons. This mechanism would add to the activation of  $\alpha 7$  presynaptic nAChRs located at noradrenergic terminals facilitating the release of noradrenaline (Berridge and Foote, 1991; Bitner and Nikkel, 2002; Li et al., 1998; Pan et al., 1994; Yoshimura et al., 1985). The existence of this excitatory cholinergic input to 5-HT DRN neurons was predicted by Hobson et al. (2000) as a part of a reciprocal interaction between aminergic and cholinergic neurons at the mesopontine level.

The systemic administration of nicotine increases serotonin levels in various areas of the brain: cortex, striatum, hippocampus, DRN, and hypothalamus (Seth et al., 2002). Therefore, another working hypothesis could be that the connection demonstrated in this work is a natural candidate for the rising of 5-HT levels physiologically. In support of this hypothesis, stimulation of putative postsynaptic nAChRs can generate intracellular calcium transients in DR neurons (Dajas-Bailador and Wonnacott, 2004). If corroborated, this connection may explain behavioral actions of 5-HT release that link salient stimuli with behavioral global responses as anxiolysis, anxiogenesis, increased locomotor activity, startle response, memory, and learning facilitation (Seth et al., 2002).

#### ACKNOWLEDGMENT

We thank Lorena Becerril-Melendez for technical support.

#### REFERENCES

- Abbott LF, Nelson SB. 2000. Synaptic plasticity: Taming the beast. *Nat Neurosci* 3:1178–1183.
- Aghajanian GK, Vandermaelen CP. 1982. Intracellular identification of central noradrenergic and serotonergic neurons by a new double labeling procedure. *J Neurosci* 2:1786–1792.
- Beck SG, Pan YZ, Akanwa AC, Kirby LG. 2004. Median and dorsal raphe neurons are not electrophysiologically identical. *J Neurophysiol* 91:994–1005.
- Berridge CW, Foote SL. 1991. Effects of locus coeruleus activation on electroencephalographic activity in neocortex and hippocampus. *J Neurosci* 11:3135–3145.
- Bitner RS, Nikkel AL. 2002. Alpha-7 nicotinic receptor expression by two distinct cell types in the dorsal raphe nucleus and locus coeruleus of rat. *Brain Res* 938:45–54.
- Bitner RS, Nikkel AL, Curzon P, Donnelly-Roberts DL, Puttfarcken PS, Namovic M, Jacobs IC, Meyer MD, Decker MW. 2000. Reduced nicotinic receptor-mediated antinociception following *in vivo* antisense knock-down in rat. *Brain Res* 871:66–74.
- Clements JD, Silver RA. 2000. Unveiling synaptic plasticity: A new graphical and analytical approach. *Trends Neurosci* 23:105–113.
- Cucchiari G, Commons KG. 2003. Alpha 4 nicotinic acetylcholine receptor subunit links cholinergic to brainstem monoaminergic neurotransmission. *Synapse* 49:195–205.
- Dajas-Bailador F, Wonnacott S. 2004. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci* 25:317–324.
- El Mansari M, Sakai K, Jouvét M. 1990. Responses of presumed cholinergic mesopontine tegmental neurons to carbachol microinjections in freely moving cats. *Exp Brain Res* 83:115–123.
- Flores CM, Rogers SW, Pabreza LA, Wolfe BB, Kellar KJ. 1992. A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of  $\alpha 4$  and  $\beta 2$  subunits and is up-regulated by chronic nicotine treatment. *Mol Pharmacol* 41:31–37.
- Flores-Hernandez J, Galarraga E, Pineda JC, Bargas J. 1994. Patterns of excitatory and inhibitory synaptic transmission in the rat neostriatum as revealed by 4-AP. *J Neurophysiol* 72:2246–2256.
- Flores-Hernandez J, Galarraga E, Bargas J. 1997. Dopamine selects glutamatergic inputs to neostriatal neurons. *Synapse* 25:185–195.
- Foote SL, Bloom FE, Aston-Jones G. 1983. Nucleus locus ceruleus: New evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol Rev* 63:844–914.
- Gerzanich V, Peng X, Wang F, Wells G, Anand R, Fletcher S, Lindstrom J. 1995. Comparative pharmacology of epibatidine: A potent agonist for neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 48:774–782.
- Gotti C, Fornasari D, Clementi F. 1997. Human neuronal nicotinic receptors. *Prog Neurobiol* 53:199–237.
- Gray R, Rajan AS, Radcliffe KA, Yakehiro M, Dani JA. 1996. Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature* 383:713–716.
- Hobson JA, Stickgold R, Pace-Schott EF. 1998. The neuropsychology of REM sleep dreaming. *Neuroreport* 9:R1–14.
- Hobson JA, Pace-Schott EF, Stickgold R. 2000. Dreaming and the brain: Toward a cognitive neuroscience of conscious states. *Behav Brain Sci* 23:793–842.
- Hogg RC, Raggensbass M, Bertrand D. 2003. Nicotinic acetylcholine receptors: From structure to brain function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 147:1–46.
- Ibanez-Sandoval O, Hernandez A, Floran B, Galarraga E, Tapia D, Valdiosera R, Erlij D, Aceves J, Bargas J. 2006. Control of the subthalamic innervation of substantia nigra pars reticulata by D1 and D2 dopamine receptors. *J Neurophysiol* 95:1800–1811.
- Jacobs BL, Fornal CA. 1991. Activity of brain serotonergic neurons in the behaving animal. *Pharmacol Rev* 43:563–578.
- Jensen AA, Frolund B, Liljefors T, Krogsgaard-Larsen P. 2005. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: Structural revelations, target identifications, and therapeutic inspirations. *J Med Chem* 48:4705–4745.
- Jones BE. 2005a. Basic mechanisms of sleep-wake states. In: Kryger MH, Roth T, Dement WC, editors. *Principles and practice of sleep medicine*. Philadelphia, Elsevier Saunders. p 136–153.
- Jones BE. 2005b. From waking to sleeping: Neuronal and chemical substrates. *Trends Pharmacol Sci* 27:578–586.
- Klink R, de Kerchove d'Exaerde A, Zoli M, Changeux JP. 2001. Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. *J Neurosci* 21:1452–1463.
- Léna C, de Kerchove D'Exaerde A, Cordero-Erausquin M, Le Novère N, del Mar Arroyo-Jimenez M, Changues JP. 1999. Diversity and distribution of nicotinic acetylcholine receptors in the locus coeruleus neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:12126–12131.
- Leonard CS, Llinas R. 1994. Serotonergic and cholinergic inhibition of mesopontine cholinergic neurons controlling REM sleep: An *in vitro* electrophysiological study. *Neuroscience* 59:309–330.
- Li X, Rainnie DG, McCarley RW, Greene RW. 1998. Presynaptic nicotinic receptors facilitate monoaminergic transmission. *J Neurosci* 18:1904–1912.
- Li YQ, Li H, Kaneko T, Mizuno N. 2001. 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* 900:110–118.
- Liu RJ, van den Pol AN, Aghajanian GK. 2002. Hypocretins (orexins) regulate serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus by excitatory direct and inhibitory indirect actions. *J Neurosci* 22:9453–9464.
- Lucki I. 1998. The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol Psychiatry* 44:151–162.
- Luebke JI, Greene RW, Semba K, Kamondi A, McCarley RW, Reiner PB. 1992. Serotonin hyperpolarizes cholinergic low-threshold burst neurons in the rat laterodorsal tegmental nucleus *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci* 89:743–747.
- Lydic R, McCarley RW, Hobson JA. 1987. Serotonin neurons and sleep. I. Long term recordings of dorsal raphe discharge frequency and PGO waves. *Arch Ital Biol* 125:317–343.
- Marinelli S, Schnell SA, Hack SP, Christie MJ, Wessendorf MW, Vaughan CW. 2004. Serotonergic and nonserotonergic dorsal raphe neurons are pharmacologically and electrophysiologically heterogeneous. *J Neurophysiol* 92:3532–3537.
- McGinty DJ, Harper RM. 1976. Dorsal raphe neurons: Depression of firing during sleep in cats. *Brain Res* 101:569–575.
- Mihailescu S, Palomero-Rivero M, Meade-Huerta P, Maza-Flores A, Drucker-Colin R. 1998. Effects of nicotine and mecamylamine on rat dorsal raphe neurons. *Eur J Pharmacol* 360:31–36.
- Mihailescu S, Guzman-Marin R, Dominguez Mdel C, Drucker-Colin R. 2002. Mechanisms of nicotine actions on dorsal raphe serotonergic neurons. *Eur J Pharmacol* 452:77–82.

- Pan ZZ, Williams JT. 1989. GABA- and glutamate-mediated synaptic potentials in rat dorsal raphe neurons in vitro. *J Neurophysiol* 61:719–726.
- Pan ZZ, Grudt TJ, Williams JT. 1994. Alpha 1-adrenoceptors in rat dorsal raphe neurons: Regulation of two potassium conductances. *J Physiol* 478:437–447.
- Piccio MR. 2003. Nicotine as a modulator of behavior: Beyond the inverted U. *Trends Pharmacol Sci* 24:493–499.
- Pidoplichko VI, DeBiasi M, Williams JT, Dani JA. 1997. Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. *Nature* 390:401–404.
- Pidoplichko VI, Noguchi J, Areola OO, Liang Y, Peterson J, Zhang T, Dani JA. 2004. Nicotinic cholinergic synaptic mechanisms in the ventral tegmental area contribute to nicotine addiction. *Learn Mem* 11:60–69.
- Seguela P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, Patrick JW. 1993. Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: A nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci* 13:596–604.
- Seth P, Cheeta S, Tucci S, File SE. 2002. Nicotinic-serotonergic interactions in brain and behaviour. *Pharmacol Biochem Behav* 71:795–805.
- Sher E, Chen Y, Sharples TJ, Broad LM, Benedetti G, Zwart R, McPhie GI, Pearson KH, Baldwinson T, De Filippi G. 2004. Physiological roles of neuronal nicotinic receptor subtypes: New insights on the nicotinic modulation of neurotransmitter release, synaptic transmission and plasticity. *Curr Top Med Chem* 4:283–297.
- Steriade M, Datta S, Pare D, Oakson G, Curro Dossi RC. 1990a. Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems. *J Neurosci* 10:2541–2559.
- Steriade M, Pare D, Datta S, Oakson G, Curro Dossi R. 1990b. Different cellular types in mesopontine cholinergic nuclei related to ponto-geniculo-occipital waves. *J Neurosci* 10:2560–2579.
- Thakkar MM, Strecker RE, McCarley RW. 1998. Behavioral state control through differential serotonergic inhibition in the mesopontine cholinergic nuclei: A simultaneous unit recording and microdialysis study. *J Neurosci* 18:5490–5497.
- Tibbs GR, Barrie AP, Van Mieghem FJ, McMahon HT, Nicholls DG. 1989. Repetitive action potentials in isolated nerve terminals in the presence of 4-aminopyridine: Effects on cytosolic free  $Ca^{2+}$  and glutamate release. *J Neurochem* 53:1693–1699.
- Vandermaelen CP, Aghajanian GK. 1983. Electrophysiological and pharmacological characterization of serotonergic dorsal raphe neurons recorded extracellularly and intracellularly in rat brain slices. *Brain Res* 289:109–119.
- Wada E, Wada K, Boulter J, Deneris E, Heinemann S, Patrick J, Swanson LW. 1989. 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* 284:314–335.
- Whiting PJ, Liu R, Morley BJ, Lindstrom JM. 1987. Structurally different neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes purified and characterized using monoclonal antibodies. *J Neurosci* 7:4005–4016.
- Williams JA, Reiner PB. 1993. Noradrenaline hyperpolarizes identified rat mesopontine cholinergic neurons in vitro. *J Neurosci* 13:3878–3883.
- Wonnacott S. 1997. Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci* 20:92–98.
- Woolf NJ, Butcher LL. 1989. Cholinergic systems in the rat brain. IV. Descending projections of the pontomesencephalic tegmentum. *Brain Res Bull* 23:519–540.
- Wooltorton JR, Pidoplichko VI, Broide RS, Dani JA. 2003. Differential desensitization and distribution of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in midbrain dopamine areas. *J Neurosci* 23:3176–3185.
- Wu J, George AA, Schroeder KM, Xu L, Marxer-Miller S, Lucero L, Lukas RJ. 2004. Electrophysiological, pharmacological, and molecular evidence for  $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors in rat midbrain dopamine neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 311:80–91.
- Yoshimura M, Higashi H, Nishi S. 1985. Noradrenaline mediates slow excitatory synaptic potentials in rat dorsal raphe neurons in vitro. *Neurosci Lett* 61:305–310.