



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**INFLUENCIA DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE CORTICOSTERONA
SOBRE LA RESPUESTA DE LAS NEURONAS SEROTONINÉRGICAS DEL NÚCLEO
DORSAL DEL RAPE A LA NICOTINA, EN RATAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

MARÍA DEL CARMEN FRÍAS DOMÍNGUEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. STEFAN MIHAILESCU LUCIAN
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA ELVIRA GALARRAGA PALACIO
INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR, UNAM
DR. JOSÉ JESÚS GARCÍA COLUNGA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, D.F. OCTUBRE, 2013.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**INFLUENCIA DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE CORTICOSTERONA
SOBRE LA RESPUESTA DE LAS NEURONAS SEROTONINÉRGICAS DEL NÚCLEO
DORSAL DEL RAPE A LA NICOTINA, EN RATAS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

MARÍA DEL CARMEN FRÍAS DOMÍNGUEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. STEFAN MIHAILESCU LUCIAN
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA ELVIRA GALARRAGA PALACIO
INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR, UNAM
DR. JOSÉ JESÚS GARCÍA COLUNGA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, D.F. OCTUBRE, 2013.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, en su sesión ordinaria del día 22 de abril de 2013, aprobó el jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **FRÍAS DOMÍNGUEZ MARÍA DEL CARMEN** con número de cuenta **85347735**, con la tesis titulada **"INFLUENCIA DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE CORTICOSTERONA SOBRE LA RESPUESTA DE LAS NEURONAS SEROTONINÉRGICAS DEL NÚCLEO DORSAL DEL RAFA A LA NICOTINA, EN RATAS"**, bajo la dirección del **DR. STEFAN MIHAILESCU LUCIAN**:

Presidente: DR. SALVADOR HERNÁNDEZ LÓPEZ
Vocal: DR. GABRIEL ROLDÁN ROLDÁN
Secretario: DR. JOSÉ JESÚS GARCÍA COLUNGA
Suplente: DRA. MARÍA DE LA LUZ NAVARRO ANGULO
Suplente: DRA. MARÍA ELVIRA GALARRAGA PALACIO

El Comité Académico, aprobó que la integración del jurado se realizara a solicitud de la alumna, **con cinco sinodales**, con base en lo establecido en el Artículo 31 y acogiéndose al artículo **QUINTO TRANSITORIO**, del Reglamento General de Estudios de Posgrado vigente.

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 20 de agosto de 2013



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por la formación recibida durante los estudios de Doctorado.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (DGAPA) por la beca otorgada mediante el Programa de Apoyos para la Superación del Personal Académico de la UNAM (PASPA), para la realización de los estudios de Doctorado.

A la Facultad de Medicina de la UNAM por el apoyo recibido para la realización de los estudios de Doctorado.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM por el apoyo recibido para la realización de los estudios de Doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo recibido para la realización del trabajo experimental mediante el Apoyo al Proyecto de investigación No. 45032M.

A la DGAPA por el apoyo recibido para la realización del trabajo experimental mediante el apoyo al Proyecto de investigación No. IN220112, asignado al Dr. Stefan Mihailescu, a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT).

A la DGAPA por el apoyo recibido para la realización del trabajo experimental mediante el apoyo al Proyecto de investigación No. IN212313, asignado al Dr. Salvador Hernández, a través del PAPIIT.

Un agradecimiento especial al Dr. Stefan Mihailescu por su invaluable apoyo académico en la dirección de este trabajo, por el soporte para la realización del trabajo experimental a través de los Proyectos de investigación No. 45032M del CONACYT y No. IN220112 del PAPIIT y su inmejorable disposición para apoyar siempre los trámites propios del doctorado.

A la Dra. María Elvira Galarraga Palacio por su valioso apoyo académico en la conducción de este trabajo y su disposición siempre expedita para apoyar la realización de los trámites propios del doctorado.

Al Dr. José Jesús García Colunga por su valioso apoyo académico en la conducción de este trabajo y su disposición siempre expedita para apoyar la realización de los trámites propios del doctorado.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A los **miembros del jurado** para el examen de grado de Doctorado:

Dr. Salvador Hernández López

Dr. Gabriel Roldán Roldán

Dr. José Jesús García Colunga

Dra. María Elvira Galarraga Palacio

Dra. María de la Luz Navarro Angulo

Por sus inestimables y prontas observaciones a esta tesis.

De manera especial agradezco al Dr. Salvador Hernández López su apreciable apoyo académico durante la realización de los estudios de doctorado y del trabajo de investigación y por el soporte para la realización del trabajo experimental a través del Proyecto de investigación No. IN212313 del PAPIIT.

A la Dra. Julieta Garduño por el apoyo académico y técnico otorgado durante el desarrollo de este trabajo y su estimable afecto.

A la Bióloga Alline Becerril Meléndez por el soporte técnico prestado.

A Dagoberto Tapia Ramírez por su instrucción en la técnica inmunohistoquímica utilizada en este trabajo y sus finas consideraciones.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A Nallely y Citlaly por ser una de las principales motivaciones para la realización de este trabajo. Gracias hijitas por acompañarme, alentarme, apoyarme y darme su amor y cariño.

A mis padres por todo su cariño, apoyo y los principios y valores que me transmitieron y por ser un ejemplo de perseverancia y fortaleza.

A mis hermanos que siempre, pero particularmente en estos momentos, me han dado tanto cariño y apoyo. Gracias Beni, Leonor, Ceci, Juanita, Martita y Rosita.

A toda mi familia por su apoyo y cariño.

A Alfredo que en su nombre lleva el amor, la amistad, el afecto, el apoyo, el aliento y la alegría, los cuales da y comparte sin reserva. Gracias cariño por el valiosísimo apoyo que sin límite me has dado desde que te conocí y en especial para el logro de este objetivo.

Un agradecimiento muy especial a la Doctora Maricela, por sus sabios consejos, por su invaluable apoyo moral e intelectual que queda plasmado en este trabajo, pero sobretodo en mi espíritu. Gracias Doctora, la vida no permita nunca olvidar su invaluable apoyo para la realización de este trabajo, pero sobretodo, para luchar día a día por vivir plenamente.

A mis amigos, por todo su amor, comprensión y aliento. Gracias Adri, Martin, Tere, Javier, Victor Manuel, Lucas, Genaro, Juan José.

A la Familia Ramos, quienes me han recibido en su seno con tantas muestras de afecto y solidaridad.

A Toñita quien sin reservas me ha dado su apoyo y cariño.

A todas las personas del Departamento de Fisiología y Farmacología de la FMVZ que han me apoyado y regalado con su amor y afecto. Gracias Sara, Dianina, Ricardo, Diego, Karlita, Jesús, Oscar, Javier, Yahel, Tania, Denise, Jennifer, Alfredo, Ángel, Liz, Carlos, Mirtha, Alan, Vanesa.

A todas las personas, amigos, compañeros de trabajo de las Facultades de Medicina y Medicina Veterinaria, que de diversas maneras me han apoyado para el logro de este trabajo.

A Doña Luci y Doña Margarita, que son un ejemplo de fortaleza y amor a la vida, quienes en cada momento alientan la confianza en que el esfuerzo de cada día dará frutos.

A la Dra. Gloria Pacheco por su apoyo profesional que de tanto valor ha sido en mi vida.

Este trabajo lo dedico a mis hijas:

Cítlaly y Nallely

*Los dos seres más importantes en mi vida,
la que han iluminado desde antes de nacer
y por quienes cualquier logro tiene doble
valor*

ÍNDICE

	Pag.
ABREVIATURAS	A
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES	7
2.1 EL NÚCLEO DORSAL DEL RAPE	7
2.1.1 Aferencias del NDR	8
2.1.2 Proyecciones del NDR	9
2.2 LA SEROTONINA	10
2.2.1 Síntesis de la serotonina	10
2.2.2 Almacenamiento de la serotonina	11
2.2.3 Secreción de la serotonina	11
2.2.4 Recaptura de la serotonina	11
2.2.5 Degradación de la serotonina	12
2.3 LOS RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS	13
2.3.1 Receptores 5-HT ₁	14
2.3.2 Receptores 5-HT ₂	16
2.3.3 Receptores 5-HT ₃	17
2.3.4 Receptores 5-HT ₄	17
2.3.5 Receptores 5-HT ₅	18
2.3.6 Receptores 5-HT ₆	18
2.3.7 Receptores 5-HT ₇	18
2.4 CARACTERÍSTICAS DE LAS NEURONAS DEL NÚCLEO DORSAL DEL RAPE	19
2.4.1 Características morfológicas de las neuronas del NDR	19
2.4.2 Características electrofisiológicas de las neuronas del NDR-registros extracelulares	19
2.4.3 Características electrofisiológicas de las neuronas del NDR-registros intracelulares	20
2.4.4 Características farmacológicas de las neuronas 5-HT y no 5-HT del NDR	21
2.5 LOS RECEPTORES NICOTINICOS NEURONALES	23
2.6. LA NICOTINA Y EL NÚCLEO DORSAL DEL RAPE	27
2.6.1 Receptores nicotínicos en el NDR	27
2.6.2 Efectos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de la nicotina sobre las neuronas del NDR	28
2.6.3 Efectos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de la nicotina sobre la liberación de serotonina	30
2.7 LOS GLUCOCORTICOIDES	31
2.7.1 El receptor para glucocorticoides	32

2.7.2 Mecanismo de acción de los glucocorticoides -----	33
2.7.3 Efectos no genómicos de los glucocorticoides -----	35
2.8. LOS GLUCOCORTICOIDES Y EL NÚCLEO DORSAL DEL RAPE-----	36
2.8.1 Efecto de los glucocorticoides sobre la actividad de la hidroxilasa de triptófano -----	36
2.8.2 Efecto de los glucocorticoides sobre los receptores 5-HT _{1A} -----	37
2.9. LOS GLUCOCORTICOIDES Y LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS -----	38
2.10. EL SISTEMA SEROTONINÉRGICO Y LA DEPRESIÓN -----	39
2.11. LOS GLUCOCORTICOIDES Y LA DEPRESIÓN -----	41
2.12. LA NICOTINA Y LA DEPRESIÓN -----	42
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA -----	45
4. HIPÓTESIS -----	45
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS -----	45
6. METODOLOGÍA -----	46
6.1 Grupos experimentales -----	46
6.2 Elaboración de las cápsulas de corticosterona y colesterol -----	46
6.3 Procedimiento quirúrgico y colocación de cápsulas -----	46
6.4 Registro del peso corporal -----	47
6.5 Medición de los niveles séricos de corticosterona -----	47
6.6 Obtención de rebanadas de cerebro -----	47
6.7 Soluciones -----	48
6.8 Perfusión de la solución -----	48
6.9 Estudios electrofisiológicos -----	48
6.9.1 Caracterización de las propiedades electrofisiológicas -----	49
6.9.2 Efecto de la nicotina sobre la frecuencia de disparo -----	49
6.9.3 Efecto de la nicotina y la serotonina sobre la corriente de potasio rectificadora entrante -----	49
6.10 Drogas -----	50
6.11 Estudio inmunohistoquímico -----	50
6.12 Análisis estadístico -----	51
7. RESULTADOS -----	52
7.1 Ganancia de peso corporal -----	52
7.2 Niveles plasmáticos de corticosterona -----	53
7.3 Características electrofisiológicas de las neuronas 5-HT ⁺ y 5-HT ⁻ del NDR identificadas mediante inmunohistoquímica -----	54
7.4 Características electrofisiológicas de las neuronas 5-HT ⁺ de los grupos control y Adx+CSR-----	56

7.5 Efecto de la nicotina sobre la frecuencia de disparo de las neuronas del grupo control ----	57
7.6 Efecto de la nicotina sobre la frecuencia de disparo de neuronas serotoninérgicas del NDR del grupo Adx+CSR -----	60
7.7 Efecto de la nicotina sobre la corriente rectificadora entrante-----	63
7.8 Participación de los receptores serotoninérgicos 5-HT _{1A} en el efecto de la nicotina sobre la frecuencia de disparo -----	64
7.9 Efecto de la serotonina sobre la corriente rectificadora entrante de potasio en neuronas 5-HT+ del NDR de los grupos control sham y Adx+CSR -----	67
7.10 Participación de los receptores nicotínicos tipo $\alpha 4\beta 2$ en el efecto inhibitor de la nicotina sobre la frecuencia de disparo neuronal -----	68
7.11 Participación de los receptores nicotínicos $\alpha 7$ en el efecto inhibitor de la nicotina sobre la frecuencia de disparo neuronal -----	69
8. DISCUSIÓN -----	70
8.1 Ganancia de peso corporal -----	70
8.2 Niveles plasmáticos de corticosterona -----	70
8.3 La exposición a concentraciones constantes moderadamente altas de corticosterona no provocó cambios en las propiedades electrofisiológicas intrínsecas de las neuronas serotoninérgicas del NDR -----	71
8.4 El efecto de la nicotina sobre la frecuencia de disparo de las neuronas 5-HT+ del NDR en animales control fue excitador -----	72
8.5 El efecto de la nicotina en las neuronas 5-HT+ de los animales Adx+CSR fue predominantemente inhibitor -----	73
8.6 La exposición a concentraciones moderadamente altas y constantes de corticosterona indujo incremento de la corriente rectificadora entrante causada por la nicotina -----	74
8.7 La corriente rectificadora entrante de potasio causada por la serotonina fue mayor en los animales expuestos experimentalmente a la corticosterona -----	74
8.8 El efecto inhibitor de la nicotina en los animales del grupo Adx+CSR fue mediado por los receptores serotoninérgicos 5-HT _{1A} -----	75
8.9 El efecto inhibitor de la nicotina en el grupo Adx+CSR fue mediado por los receptores nicotínicos tipo $\alpha 4\beta 2$ -----	76
8.10 Incremento de la sensibilidad a la serotonina en animales expuestos a concentraciones moderadamente altas y constantes de corticosterona -----	77
9. CONCLUSIONES -----	78
10. BIBLIOGRAFIA -----	79
11. APÉNDICE. Artículo científico requisito de graduación: <i>Flattening plasma corticosterone levels increases the prevalence of serotonergic dorsal raphe neurons inhibitory responses to nicotine in adrenalectomised rats</i> -----	97

ABREVIATURAS

ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Adx+CSR	Ratas adrenalectomizadas e implantadas con una cápsula de 75mg de corticosterona y 25mg de colesterol
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
DH β E	Dihidro- β -eritroidina
E.E.	Error estándar
GABA	Ácido γ aminobutírico
GR	Receptor de glucocorticoides
GIRK	Canal de potasio rectificador entrante dependiente de proteínas G
MAO	Monoaminoxidasa
nAChRs	Receptores colinérgicos nicotínicos
NDR	Núcleo dorsal del rafe
MLA	Metilcaconitina
SNC	Sistema nervioso central
TPH	Hidroxilasa de triptófano
5-HT	Serotonina

RESUMEN

Diversas alteraciones del sistema serotoninérgico encefálico y de la concentración plasmática de cortisol, principal hormona glucocorticoide en humanos, se consideran relacionadas con estados patológicos como la depresión. Así, por ejemplo, se ha planteado una relación causal entre la reducción del nivel cerebral de serotonina y dicha enfermedad. Por otra parte, se ha observado que individuos con enfermedad de Cushing, caracterizada por incremento del nivel plasmático de cortisol, presentan una mayor incidencia de depresión y que esta alteración se resuelve con la corrección del desorden hormonal; adicionalmente, en pacientes deprimidos se ha encontrado ausencia del patrón circádico de secreción de cortisol, presentándose en cambio, concentraciones plasmáticas relativamente constantes en el transcurso del día (aplanamiento del nivel plasmático de cortisol). En relación con el sistema serotoninérgico, el Núcleo dorsal del rafe (NDR) ha recibido particular atención, toda vez que es el área con mayor cantidad de neuronas serotoninérgicas del encéfalo y el principal origen de la inervación serotoninérgica de áreas cerebrales involucradas en la determinación del estado de ánimo. La nicotina mejora el estado de ánimo en pacientes con depresión mayor y en modelos animales de depresión, incrementando los niveles cerebrales de serotonina, noradrenalina y dopamina. Tales hallazgos enfatizan la necesidad de profundizar en el conocimiento de las relaciones existentes entre el sistema serotoninérgico, los receptores nicotínicos y la alteración del nivel plasmático de glucocorticoides, a fin de ampliar la comprensión de la depresión, entidad de relevante interés médico y social. En este sentido, el presente trabajo tuvo la finalidad de determinar si el aplanamiento e incremento moderado de los niveles plasmáticos de glucocorticoides, utilizado en este estudio como modelo de depresión, modifica los efectos ejercidos por la nicotina sobre las neuronas serotoninérgicas del NDR.

Los experimentos se realizaron en rebanadas de cerebro de rata mediante registro de la actividad electrofisiológica de neuronas serotoninérgicas del NDR, identificadas por inmunohistoquímica. Las ratas del grupo experimental fueron adrenalectomizadas e implantadas subcutáneamente con una cápsula de 75 mg de corticosterona (grupo Adx+CSR), mientras que las ratas del grupo control fueron solamente implantadas con una cápsula de colesterol. En ambos casos, los animales fueron sacrificados 14 días después del procedimiento quirúrgico para la obtención de rebanadas de cerebro y de muestras de sangre, en las que se midió la concentración plasmática de corticosterona. Dicha concentración hormonal se midió, mediante radioinmunoanálisis, en muestras obtenidas

a las 7:00 de la mañana y 7:00 de la tarde en los animales del grupo control y a las 8:00 de la mañana en el grupo Adx+CSR; habiéndose encontrado en los animales del grupo control niveles circádicos normales, mientras que los animales del grupo Adx+CSR presentaron niveles 9% superiores al promedio del valor mínimo y máximo del grupo control. Basados en estudios realizados en modelos experimentales similares, se infiere que dichos valores fueron constantes durante el día. Además, el peso corporal alcanzado por los animales Adx+CSR fue significativamente menor que el de los animales control. Estos datos indican que los valores plasmáticos de corticosterona en el grupo Adx+CSR fueron moderadamente superiores a los del grupo control. Los registros electrofisiológicos se realizaron en fijación de voltaje y fijación de corriente, en configuración de célula completa (*whole cell*), con administración de las drogas en perfusión. En los animales control la nicotina (1 μ M) produjo efectos estimuladores sobre la frecuencia de potenciales de acción (frecuencia de disparo) en todas las neuronas serotoninérgicas estudiadas. Sin embargo, en las ratas del grupo Adx+CSR la nicotina tuvo efectos inhibidores sobre la frecuencia de disparo en el 78% de las neuronas serotoninérgicas del NDR. Adicionalmente, la corriente rectificadora entrante generada por la administración de nicotina, fue considerablemente mayor en el grupo Adx+CSR que en el grupo control. El efecto inhibitor de la nicotina en estas células fue dependiente de la liberación de serotonina dentro del NDR; ya que el bloqueo de los receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, con el antagonista selectivo WAY100635 (25nM), contrarrestó el efecto inhibitor de la nicotina y puso de manifiesto un efecto estimulador. En las neuronas de ratas del grupo Adx+CSR la serotonina produjo una corriente rectificadora entrante dependiente de potasio significativamente mayor que en el grupo control, lo que indica que en los animales implantados con corticosterona la función de los autorreceptores 5-HT_{1A} se encuentra incrementada. En estas neuronas, el efecto de la nicotina fue mediado principalmente por los receptores nicotínicos α 4 β 2, toda vez que el antagonista selectivo de estos receptores, dihidro- β -eritroidina (DH β E, 1 μ M), bloqueó el efecto inhibitor. Estos datos indican que la exposición a niveles moderadamente altos y constantes de glucocorticoides, como los presentados por las ratas en el modelo experimental utilizado, incrementa la función de los autorreceptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, lo cual resulta en disminución de la excitabilidad de estas neuronas y por consiguiente, disminución de la liberación de serotonina en áreas que reciben proyecciones serotoninérgicas del NDR; condición observada en individuos con depresión.

ABSTRACT

Diverse alterations of the brain serotonergic system and plasma concentrations of cortisol, main glucocorticoid hormone in humans, are considered to be related with pathological states such as depression. As an example, a causal relationship has been raised between the reduction of brain serotonin level and such disease. At the same time it has been observed that individuals with Cushing's disease, characterized by increased plasma cortisol levels, have a higher incidence of depression and that this alteration is solved with the correction of hormonal disorder; additionally, in depressed patients an absence of circadian pattern of cortisol secretion has been found, plasma levels remain relatively constant during the day (flattening the plasma level of cortisol). In the serotonergic system, the Dorsal raphe nucleus (DRN) has received particular attention, since it is the area with the greatest amount of serotonergic neurons in the brain and the main source of the innervation serotonergic in brain areas involved in the determination of mood. Nicotine improves mood in patients with major depression and in animal models of depression by increasing brain serotonin, norepinephrine and dopamine levels. These findings emphasize the need to deepen the understanding of the relationships between the serotonergic system, nicotinic receptors and the alteration of the plasma glucocorticoid levels, in order to expand the understanding of the depression, a disease of medical and social matter. The main purpose of this work was to determine if flattening and moderately increase of plasma glucocorticoid levels, used in this study as a model of depression, modifies the effects exerted by nicotine on the serotonergic DRN neurons.

The experiments were performed in rat brain slices by electrophysiological activity registration of serotonergic DRN neurons, identified by immunohistochemistry. The experimental rats were used on adrenalectomy circumstances and implanted subcutaneously with a pellet containing 75 mg of corticosterone (Adx+ CSR group), whereas the rats of the control group were implanted with a pellet of cholesterol. All the animals were sacrificed 14 days after the surgical procedure to obtain brain slices and blood samples, in which plasma concentrations of corticosterone were measured. The hormonal concentration was determined by radioimmunoassay, in samples taken at the 7:00 am and 7:00 pm in animals of the control group and at 8:00 am in the Adx+CSR group. Normal circadic levels were found in animals of the control group, while animals in the Adx+CSR group had levels 9% higher than the average of the minimum and maximum of the control group. Based on studies using similar experimental models, it can be inferred that these values were constants during the day. Moreover, body weight reached

by Adx+CSR animals was significantly lower than the one in controlled animals. This data indicates that corticosterone plasma levels of the Adx+CSR group were moderately higher than those in the control group. Electrophysiological recordings were performed in voltage and current clamp in whole cell configuration, with administration of drugs in perfusion. In control animals, nicotine (1 μ M) had stimulating effects on the frequency of action potentials (firing frequency) in all serotonergic neurons studied. However, in rats of group Adx+CSR nicotine had inhibitory effects on the firing frequency, in 78% of the serotonergic DRN neurons. Additionally, the inward rectifying current generated by nicotine administration, was considerably higher in the group Adx+CSR than in the control group. The inhibitory effect of nicotine in these cells depended on the release of serotonin within the DRN; since the blockade of the serotonergic receptors 5-HT_{1A}, using selective antagonist WAY100635 (25nM), countered the inhibitory effect and revealed a stimulating effect. In neurons of rats in the Adx+CSR group serotonin produced a potassium-dependent inward rectifying current significantly greater than in the control group; this indicates that in animals implanted with corticosterone the function of the autoreceptors 5-HT_{1A} is increased. In these neurons, the effect of nicotine was mainly mediated by nicotinic receptors α 4 β 2, since the selective antagonist of these receptors, dihydro- β -erythroidine (D β HE, 1 μ M), blocked the inhibitory effect. This data indicates that exposure to moderately high and constant glucocorticoids levels, like those in rats of the experimental model used, increase the function of the serotonergic autoreceptors 5-HT_{1A}, resulting in decrease in the excitability of these neurons and therefore decrease the release of serotonin in areas receiving serotonergic projections of DRN, condition observed in patients with depression.

1. INTRODUCCIÓN

La depresión se encuentra entre los desórdenes psiquiátricos de mayor prevalencia en el mundo. De acuerdo con la Organización mundial de la salud, esta enfermedad afecta a más de 350 millones de personas en el mundo y es una de las principales causas de discapacidad (Berenzon y col., 2013). En México, datos recientes indican una prevalencia de depresión de 10.4% en mujeres y del 5.4% en hombres (Rafful y col., 2012), mientras que en Estados Unidos se reportan valores cercanos al 20% de la población (Kessler y col., 2005). Las afectaciones de la depresión son extensas, incluyendo aspectos emocionales, motivacionales, cognitivos y psicológicos (Russo y Nestler, 2013); puede generar gran sufrimiento y alterar actividades laborales, escolares, familiares y en casos extremos, conducir al suicidio (Mann, 2013). Por tales razones se asocia con importantes costos personales y sociales (Hamilton y col., 2013) y se ha convertido en un objetivo prioritario de atención en todo el mundo (Berenzon y col., 2013).

A pesar de que se cuenta con vastos conocimientos sobre esta enfermedad, aún faltan múltiples aspectos por esclarecerse (Hamilton y col., 2013; Russo y Nestler, 2013). Asimismo, no obstante que en la actualidad se dispone de varios tratamientos antidepressivos, éstos presentan diversas limitaciones, como son: tiempo prolongado de tratamiento para la manifestación de mejoría clínica, diversos grados de ineffectividad (Lum y Stahl, 2012), efectos secundarios adversos (Vaswani y col., 2003) y, en algunos casos, altos costos. Estas situaciones hacen imperioso profundizar en el conocimiento de la depresión a fin de disponer de elementos que contribuyan a la identificación de sus causas, su fisiopatología, así como su adecuada prevención y tratamiento. En este contexto se realiza el presente trabajo experimental con la finalidad de contribuir al conocimiento de tan importante padecimiento.

La investigación experimental en este terreno puede tener diversos enfoques; desde el molecular, pasando por el nivel celular y de redes neuronales, hasta el conductual, pudiendo cada uno realizar valiosas aportaciones. Este trabajo se enmarca en el nivel celular, utilizando como base registros electrofisiológicos que permiten identificar alteraciones de la excitabilidad neuronal y de la transmisión sináptica, generadas por condiciones orgánicas relacionadas con la depresión. Para ello se apoya en el uso de un modelo animal de depresión que reproduce condiciones características de individuos con esta enfermedad, como es la exposición a niveles plasmáticos moderadamente altos y aplanados de glucocorticoides.

En este sentido, considerando la reconocida relación de la serotonina y la nicotina con la depresión, el trabajo se enfoca a la identificación de alteraciones causadas por la corticosterona sobre los efectos de la nicotina en las neuronas serotoninérgicas del Núcleo dorsal del rafe.

Este trabajo pretende contribuir al conocimiento de las alteraciones sufridas por el sistema serotoninérgico en condiciones que pueden desencadenar depresión y da pie a diversas preguntas cuyo abordaje experimental podrá seguir aportando a la comprensión de esta importante enfermedad.

2. ANTECEDENTES

2.1 EL NÚCLEO DORSAL DEL RAPE

El núcleo dorsal del rafe (NDR), mostrado en la figura 2.1, se ubica en la línea media del tallo cerebral entre el mesencéfalo y el puente, por debajo del acueducto cerebral y dorsal al fascículo longitudinal medial (Paxinos y Watson, 1982). Este núcleo contiene el mayor grupo de neuronas serotoninérgicas del cerebro (Dahlstrom y Fuxe, 1964, Jacobs y Azmitia, 1992) y es el principal origen de la inervación serotoninérgica del cerebro anterior (Monti, 2010, Vertes y Lindley, 2008).

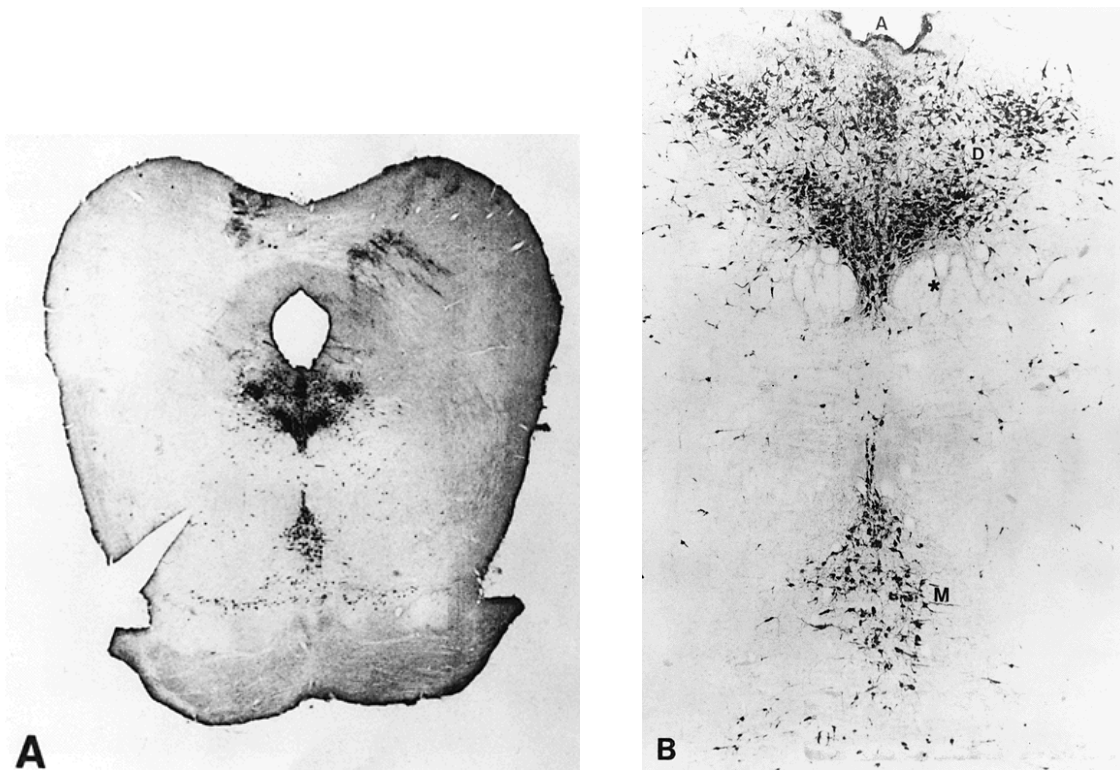


Figura 2.1 Cuerpos celulares serotoninérgicos en los núcleos del rafe del cerebro visualizados mediante inmunohistoquímica para serotonina. (A) Sección transversal del cerebro medio de la rata. Los grupos de somas celulares serotoninérgicos mostrados dan lugar a extensas proyecciones serotoninérgicas a la corteza cerebral y estructuras del cerebro anterior. (B) Imagen de alta resolución mostrando cuerpos celulares serotoninérgicos en los núcleos dorsal (NDR) y mediano del rafe (NMR). El NDR se encuentra en la materia gris debajo del acueducto cerebral; en el plano transversal se subdivide en un pequeño grupo dorsomedial, localizado debajo del acueducto, un grupo ventromedial, ubicado arriba del fascículo longitudinal medial (FLM); y grandes grupos celulares bilaterales. El NMR se ubica en el centro del cerebro medio por debajo del FLM. D, NDR; M, NMR; A, acueducto. (Tomado de: Hensler, 2006).

El NDR posee neuronas serotoninérgicas, GABAérgicas, dopaminérgicas, glutamatérgicas, entre otras; las primeras constituyen aproximadamente un tercio de la población neuronal total (Descarries y col, 1982), mientras que las neuronas GABAérgicas representan aproximadamente una novena parte (Belin y col, 1983). El número total de neuronas serotoninérgicas del NDR en ratas es de aproximadamente 11500, mientras que las neuronas no serotoninérgicas, correspondientes a varias subpoblaciones, representan aproximadamente 23000 células (Descarries y col., 1982).

El NDR está involucrado en múltiples procesos fisiológicos como el ciclo sueño-vigilia, la actividad locomotora, el dolor, la ingestión de alimento, la atención, la memoria, la agresividad y el estado de ánimo (Hensler, 2006). Asimismo, este núcleo se considera involucrado en procesos patológicos como alteraciones del comportamiento relacionadas con el estrés crónico, la ansiedad y la depresión (Mann y col., 2006).

2.1.1 Aferencias del NDR

El NDR recibe múltiples aferencias (Peyron y col., 1998) que regulan su actividad y que explican, junto con sus abundantes proyecciones, la diversidad de procesos fisiológicos en los que se encuentra involucrado. Recibe aferencias glutamatérgicas principalmente de la corteza prefrontal medial (Soiza-Reilly y col., 2011), los núcleos hipotalámicos preforncial, lateral y arcuato y los núcleos parabraquiales lateral y medial y el núcleo laterodorsal tegmental. Además, recibe una pequeña cantidad de este tipo de aferencias, de la amígdala, el núcleo hipotalámico paraventricular, la habénula lateral, el núcleo paragigantocelular, el núcleo hipoglosal prepósito y el núcleo trigeminal espinal (Lee y col., 2003). De la región del tallo cerebral, el NDR recibe aferencias noradrenérgicas del locus coeruleus, el núcleo del tracto solitario y la región caudoventrolateral de la médula (Peyron y col., 1996); además de esta misma región recibe aferencias adrenérgicas de la médula dorsomedial y del núcleo paragigantocelular (Peyron y col., 1996). De los núcleos laterodorsal y pedúnculo pontino tegmentales llegan aferencias colinérgicas (Monti, 2010), las cuales están involucradas en la regulación del sueño y la vigilia.

Por otra parte este núcleo recibe aferencias GABAérgicas de las siguientes estructuras: área hipotalámica lateral, área preóptica lateral, área hipotalámica posterior, substantia nigra reticular, área tegmental ventral, materia gris periacueductal pontina ventral (incluyendo el NDR mismo) y núcleo reticular pontino oral rostral. Una cantidad moderada de aferencias GABAérgicas tienen su origen en los núcleos: pálido ventral, preóptico medial, parabraquial lateral y paragigantocelular dorsal. Además, en pequeña

cantidad llegan este tipo de aferencias del núcleo preóptico magnocelular, el núcleo hipotalámico paraventricular, la habénula lateral, el núcleo tuberomamilar, el núcleo rafe magno y el núcleo gigantocelular (Gervasoni y col., 2000). Aferencias dopaminérgicas llegan al NDR del área tegmental ventral (Kalén, 1988). Además recibe aferencias que contienen Sustancia P provenientes de la habénula lateral (Neckers y col., 1979, Vincent, 1980). Por otra parte, el NDR presenta una prominente entrada serotoninérgica derivada de neuronas del mismo núcleo, a través de conexiones intrínsecas y del núcleo mediano del rafe (Mosko y col., 1977). Adicionalmente, dentro del NDR existe una considerable liberación de serotonina de origen somato-dendrítico (Adell y col., 1993).

2.1.2 Proyecciones del NDR

El NDR emite múltiples proyecciones serotoninérgicas a diversas áreas encefálicas como las siguientes: cuerpo estriado (Steinbusch y col., 1981), sustancia nigra (Wirtshafter y col., 1987; Imai y col., 1986), área tegmental ventral (Van Bockstaele y col., 1994), habénula (Moore y col., 1978), hipocampo (Azmitia, 1981), amígdala, corteza piriforme y parieto-temporal, tálamo, hipotálamo, núcleo *accumbens* y septum (Azmitia y Segal 1978). En la sustancia nigra la serotonina ejerce principalmente efectos inhibidores sobre las neuronas dopaminérgicas, en neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral ejerce principalmente efectos excitadores (Gervais y Rouillard, 2000). Las proyecciones serotoninérgicas al núcleo *accumbens* estimulan la liberación de dopamina (De Deurwaerdere y col., 1998); mientras que neuronas serotoninérgicas que proyectan al hipocampo ejercen efectos inhibidores (Segal, 1975); de manera opuesta, a nivel del cuerpo estriado, la serotonina ejerce efectos excitadores (Park y col., 1982).

En la región pedunculopontina tegmental las proyecciones serotoninérgicas del NDR establecen sinapsis con neuronas colinérgicas y no colinérgicas (Steininger y col., 1997). También se envían proyecciones serotoninérgicas a segmentos superiores de la médula torácica las cuales pueden estar involucradas en la analgesia provocada por estimulación de este núcleo (Kazakov y col., 1992).

Adicionalmente, la serotonina producida en el NDR actúa sobre neuronas serotoninérgicas del mismo núcleo, donde ejerce efectos inhibidores mediante la estimulación de autorreceptores somatodendríticos (Sprouse y Aghajanian, 1987).

Además de proyecciones serotoninérgicas el NDR envía neuronas de carácter químico distinto, así el núcleo *accumbens* recibe una cantidad considerable de aferencias dopaminérgicas provenientes de este núcleo; este mismo tipo de proyecciones son

enviadas, aunque en menor cantidad, al septo lateral, la corteza prefrontal medial y el estriado dorsal (Stratford y Wirsthafer, 1990). Proyecciones no-serotoninérgicas llegan a la amígdala, el núcleo septal lateral, el núcleo septo hipocampal (Halberstadt, 2008) y el núcleo vestibular (Halberstadt, 2006), mientras que al complejo sensorial trigeminal se emiten proyecciones que pueden estar involucradas en la analgesia resultante de la estimulación del NDR (Li y col., 1993).

Proyecciones peptidérgicas, con origen en este núcleo, son enviadas a diversas áreas cerebrales; el lecho de la estría terminal recibe proyecciones inmunorreactivas al péptido intestinal vasoactivo (Petit y coll, 1995), el tálamo medial recibe neuronas productoras de galanina y colecistocinina; el tálamo lateral proyecciones de neuronas productoras de sustancia P, neuropéptido Y, neurotensina, galanina, péptido relacionado con el gen de calcitonina y colecistocinina y la zona incerta recibe principalmente proyecciones de neuronas productoras de galanina y colecistocinina (Lechner y col., 1993).

La principal fuente de serotonina en áreas que se consideran implicadas en la depresión son las neuronas serotoninérgicas del NDR, el cual emite proyecciones al hipocampo, el septum (Azmitia, 1981; Penington y Reiffenstein, 1986), la corteza frontal (O'Hearn y Molliver, 1994), el área tegmental ventral, el núcleo *accumbens* y la amígdala (Wang y Aghajanian, 1977; Ma y col., 1991).

2.2 LA SEROTONINA

2.2.1 Síntesis de la serotonina

La serotonina, también denominada 5-hidroxitriptamina (5-HT), es un indol sintetizado a partir del L-triptófano. Para su síntesis se requiere de la enzima hidroxilasa de triptófano, que transforma el triptófano en 5-hidroxitriptófano, el cual, por acción de la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos, es convertido en 5-hidroxitriptamina (Boadle-Biber, 1993; Hensler, 2006).

2.2.2 Almacenamiento de la serotonina

Las células serotoninérgicas almacenan 5-HT en vesículas membranales que presentan algunas similitudes con las vesículas donde se almacenan las catecolaminas, por ejemplo, el transporte de las moléculas neurotransmisoras al interior de las mismas es inhibido por la reserpina, la cual interfiere con la función del transportador localizado en la membrana vesicular. Por tal razón, la administración de reserpina puede agotar el almacenamiento de estos neurotransmisores en el cerebro. El almacenamiento de la serotonina involucra la participación de una ATPasa de hidrogeniones que genera un gradiente electroquímico que favorece la entrada de 5-HT a las vesículas (Hensler, 2006).

2.2.3 Secreción de la serotonina

La 5-HT es secretada al espacio extracelular mediante exocitosis dependiente de calcio; el incremento citoplasmático de este ion, sea o no acompañado de despolarización de la célula, favorece la fusión de la membrana vesicular a la membrana plasmática, lo que provoca la exocitosis (Hensler, 2006). Por tal razón, el disparo de las neuronas serotoninérgicas afecta la secreción de 5-HT, de tal manera que, el aumento de la frecuencia de disparo, incrementa la secreción de este neurotransmisor y viceversa (Boadle-Biber, 1993). Así, la 5-HT y otros agonistas de los autorreceptores somatodendríticos 5-HT_{1A}, que disminuyen la frecuencia de disparo de las neuronas serotoninérgicas, disminuyen la secreción de este neurotransmisor (Sprouse y Aghajanian, 1987).

2.2.4 Recaptura de la serotonina

Una vez liberada al espacio sináptico, la 5-HT es recapturada a las terminales sinápticas por una proteína membranal específica, el transportador de serotonina (SERT, de: *serotonin transporter*). La actividad de este transportador es dependiente del Na⁺ y Cl⁻ extracelulares y de ATP, si bien, al parecer, la energía no es directamente utilizada por esta proteína, sino que es necesaria para el mantenimiento del gradiente transmembranal de Na⁺, requerido para el transporte de este neurotransmisor (Zahniser y Doolen, 2001). Presuntamente el SERT presenta 12 dominios transmembranales, con las terminales amino y carboxilo ubicadas intracelularmente y un gran lazo extracelular que contiene sitios de glucosilación entre los dominios transmembranales 3 y 4.

El SERT presenta una homología absoluta de cerca del 50% con los transportadores de noradrenalina (NET, de: *norepinephrine transporter*) y dopamina (DAT, de: *dopamine transporter*) y hay evidencias de una falta de selectividad estricta de sustrato entre estos transportadores, particularmente en situaciones en las que la función de un transportador está comprometida (Hensler, 2006). No obstante hay diversos fármacos que muestran gran selectividad por algunos de estos transportadores. Así, por ejemplo, la reboxetina inhibe la actividad del NET y por tanto, la recaptura de noradrenalina, con una potencia 150 veces mayor que con la que inhibe al SERT. Por su parte la fluoxetina, sertralina y paroxetina, inhibidores selectivos del SERT, presentan una potencia entre 25 y 100 veces mayor para inhibir la recaptura de 5-HT que la de noradrenalina. Sin embargo, hay inhibidores no selectivos, como la cocaína, que inhiben la recaptura de los tres neurotransmisores. Otros compuestos que inhiben la recaptura de noradrenalina y serotonina con diversos grados de potencia son algunos antidepresivos tricíclicos, como la imipramina y amitriptilina, los cuales son potentes inhibidores de la recaptura de ambos neurotransmisores y la desipramina, la cual inhibe con mucha mayor potencia la recaptura de noradrenalina que la de serotonina (Hensler, 2006).

2.2.5 Degradación de la serotonina

La degradación de la 5-HT involucra la acción de la enzima monoaminoxidasa (MAO), que da lugar a la formación del 5-hidroxi-indolacetaldehído, el cual, es oxidado, por una aldehído deshidrogenasa dependiente de NAD^+ , dando como consecuencia la formación del ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) (Hensler, 2006, Wang y col., 2013). En el cerebro de ratas y humanos se han identificado dos isoformas de la MAO, el tipo A y tipo B; estas enzimas son flavo-proteínas de la membrana externa de las mitocondrias y se encuentran presentes en neuronas, células gliales y otros tipos celulares. La actividad de la MAO puede ser inhibida selectivamente por diversos fármacos; el tipo A es inhibido por la clorgilina y moclobemida, mientras que el deprenil inhibe el tipo B (Wang y col., 2013). Diversos estudios han puesto de manifiesto que la serotonina es metabolizada preferentemente por la MAO A (Wang y col., 2013), así el tratamiento de ratas con clorgilina, incrementa el contenido cerebral de serotonina y reduce la formación del 5-HIAA en el cerebro. Adicionalmente, en estudios realizados en ratones genéticamente modificados, se observó que los animales que no expresan MAO B no presentan alteración del metabolismo cerebral de la 5-HT, mientras que, en ausencia de MAO A, el metabolismo cerebral de la 5-HT se redujo significativamente durante algunos días, alcanzando valores comparables a los normales después de algunos meses, lo que

refuerza que la MAO A es el principal tipo involucrado en el metabolismo de 5-HT e indica que en caso de ausencia prolongada de acción de MAO A, la MAO B puede metabolizar la 5-HT (Shih y col., 1999).

En diversos estudios que incluyen técnicas histoquímicas, inmunohistoquímicas, de hibridización *in situ* y autorradiografía, se ha encontrado que en el cerebro de rata hay mayor cantidad del tipo A de la MAO que del tipo B; mientras que el cerebro de humanos contiene más MAO B que MAO A (Hensler, 2006). De particular relevancia es que las neuronas serotoninérgicas del NDR, contienen predominantemente MAO B (Jahng y col., 1997; Westlund y col., 1988; Saura y col., 1996) en lugar del tipo A, que es el que preferentemente metaboliza la 5-HT. Al respecto se ha planteado la hipótesis de que la presencia de MAO B favorece la degradación de neurotransmisores como la dopamina, previniendo su acumulación en estas células, la cual podría interferir el almacenamiento, liberación y recaptura de la 5-HT (Hensler, 2006).

2.3 LOS RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS

Los receptores serotoninérgicos se distribuyen ampliamente en el encéfalo y tejidos periféricos, para su denominación se utiliza la abreviatura 5-HT y a continuación la familia y el subtipo de receptor. Actualmente se reconocen siete familias, de la 5-HT₁ a 5-HT₇, con varios subtipos, habiéndose identificado y clonado, por lo menos, 20 tipos de receptores serotoninérgicos (Pytliak y col, 2011). La agrupación en dichas familias obedece al origen genético, la homología en la secuencia de aminoácidos y las cascadas intracelulares de señalización que afectan (Hoyer y col., 2002).

Los receptores 5-HT están acoplados a proteínas G (salvo los miembros de la familia 5-HT₃) y sus vías de señalización incluyen al monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), el trifosfato de inositol (IP₃) y el diacilglicerol (DAG). Los miembros de las familias 5-HT₁ y 5-HT₅ están acoplados a proteínas Gi/Go y su estimulación provoca inhibición de la adenilciclase y como consecuencia, disminución de la concentración intracelular de AMPC, con efectos inhibidores sobre la actividad celular. Los miembros de la familia 5-HT₂ están acoplados a una proteína Gq y su activación resulta en incremento de las concentraciones intracelulares de IP₃ y DAG lo que deriva en acciones de carácter excitatorio. Por otra parte, los miembros de las familias 5-HT₄, 5-HT₆ y 5-HT₇ están acoplados a proteínas Gs y su estimulación provoca activación de la adenilciclase y el subsecuente incremento de la concentración intracelular de AMPC, lo que determina acciones excitatorias sobre la

actividad celular. Por último, los subtipos de la familia 5-HT₃ son canales de cationes dependientes de ligando cuya estimulación favorece su apertura y la despolarización de la membrana celular (Hoyer y col., 1994; Raymond y col., 2001; Hannon y Hoyer, 2002).

2.3.1 Receptores 5-HT₁

Los receptores 5-HT₁ comprenden 5 subtipos, 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} y 5-HT_{1F}. No hay receptores 5-HT_{1C} debido a que los receptores inicialmente así nombrados han sido reclasificados como receptores 5-HT_{2C}, ya que su estructura y mecanismo de transducción intracelular son similares a los de la familia 5-HT₂ (Pytliak y col., 2011).

El subtipo **5-HT_{1A}** es el más ampliamente distribuido, está presente en alta densidad en la corteza cerebral, hipocampo, septum, amígdala y núcleos del rafe y en menor cantidad, en los ganglios basales y el tálamo (el Mestikawy y col., 1991). Diversos estudios avalan su participación en la regulación de la secreción de ACTH, la ingestión de alimento, el comportamiento sexual, la termorregulación, funciones cognitivas y en alteraciones como la ansiedad y la depresión (Wang y col., 2009, Hensler, 2006). En áreas de proyección estos receptores se localizan postsinápticamente, mientras que en los núcleos del rafe funcionan como autorreceptores, localizados, en alta densidad, en el soma y dendritas de las neuronas serotoninérgicas. En áreas de proyección, como el hipocampo, los receptores 5-HT_{1A} están acoplados a una proteína G_{i/o} y su estimulación provoca inhibición de la adenilciclase y apertura del canal para potasio rectificador entrante (GIRK), lo que resulta en hiperpolarización e inhibición de la descarga neuronal. De manera similar, la estimulación de los autorreceptores 5-HT_{1A} en el NDR provoca apertura de canales GIRK, hiperpolarización e inhibición del disparo neuronal (Aghajanian y Sanders-Bush, 2002), sin embargo, en este caso, tales efectos parecen no depender de la inhibición de la adenilciclase (Clarke y col., 1996). Debido a su influencia sobre el disparo neuronal, estos autorreceptores tienen un importante papel modulador de la actividad serotoninérgica y por lo tanto, de la liberación de serotonina en áreas de proyección (Hervás y Artigas, 1998).

La sensibilidad y función de los autorreceptores 5-HT_{1A} disminuye después de la administración crónica de diversos antidepresivos y agonistas de este receptor (Blier y col., 1990, Blier y de Montigny, 1994), lo que resulta de gran interés clínico en relación con patologías como la ansiedad y la depresión. Adicionalmente los agonistas 5-HT_{1A} son de interés en el tratamiento de la esquizofrenia, la impulsividad y la agresión (Hensler, 2006).

Los receptores **5-HT_{1B}**, localizados principalmente en terminales axónicas, inducen inhibición presináptica y efectos sobre el comportamiento; se encuentran en altas concentraciones en los ganglios basales, el estriado y la corteza frontal, en ésta última su estimulación inhibe la liberación de dopamina, mientras que en el estriado y los ganglios basales, donde actúan como autorreceptores, inhiben la liberación de serotonina. Como heterorreceptores controlan la secreción de neurotransmisores como acetilcolina, glutamato, dopamina, noradrenalina y GABA. En cepas de ratones que carecen de este receptor se ha observado agresión incrementada y alta preferencia por la ingestión de alcohol (Groenink y col., 2006). Por otra parte, ciertos agonistas no selectivos de los receptores 5-HT_{1D-1B} han mostrado propiedades terapéuticas en el tratamiento de la migraña.

Los receptores **5-HT_{1D}** exhiben una homología estructural del 63% con los receptores 5-HT_{1B} y se expresan en menor cantidad que estos últimos. El receptor 5-HT_{1D} actúa como autorreceptor en el NDR pero también se ha encontrado en el corazón, donde modula la liberación de serotonina (Pular y Col., 2007). Estos receptores se han encontrado involucrados en la locomoción y la ansiedad. Aunque su significado clínico permanece aún desconocido se especula que pueden estar involucrados en la ansiedad, depresión y otros desórdenes neuropsiquiátricos (Pytliak y col., 2011).

La función del receptor **5-HT_{1E}** se desconoce debido a la falta de herramientas farmacológicas selectivas, sin embargo, debido a su alta abundancia en la corteza frontal, hipocampo y bulbo olfatorio, se ha hipotetizado que están involucrados en la regulación de la memoria en humanos (Shimron-Abarbanell y col., 1995).

El receptor **5-HT_{1F}** presenta gran homología con el receptor 5-HT_{1E}. En la rata, el receptor 5-HT_{1F} se ha localizado en la corteza cerebral, bulbo olfatorio, núcleo accumbens, putamen, núcleo parafascicular del tálamo, núcleo mamilar medial, hipocampo, amígdala (Lucaites y col., 2005) y el ganglio del nervio trigémino (Ma, 2001; Classey y col., 2010); en cerdos se ha identificado en ciertas áreas corticales, el hipocampo, el claustro y el ganglio del nervio trigémino (Bhalla y col., 2002). Su ubicación en esta última estructura se ha relacionado con la eficacia de agonistas 5-HT_{1F} en el tratamiento de la migraña en humanos (Classey y col., 2010; Ferrari y col., 2010; Olesen, 2010). También se han localizado en el útero y arterias coronarias por lo que se ha sugerido un posible papel en la contracción del músculo liso vascular (Nilsson y col., 1999).

2.3.2 Receptores 5-HT₂

Los receptores 5-HT₂ comprenden tres subtipos 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C}, los cuales muestran una homología estructural del 45-50%; se encuentran preferentemente acoplados a una proteína G_{q/11} y su estimulación resulta en incremento del DAG, IP₃ y de la concentración intracelular de Ca⁺⁺. Aunque son los principales receptores serotoninérgicos excitadores, el receptor 5-HT_{2A} puede también tener un efecto inhibitor en ciertas áreas cerebrales, como la corteza visual y la corteza orbitofrontal (Hannon and Hoyer, 2002). Se piensa que estos receptores están involucrados en los efectos alucinógenos de agonistas serotoninérgicos como el LSD (Hensler, 2006).

Los receptores **5-HT_{2A}** se expresan en el sistema nervioso central (SNC) y en muchos tejidos periféricos, median la respuesta contráctil en el músculo liso e incrementan la agregación plaquetaria y la permeabilidad capilar. En el SNC están presentes en la corteza, el claustró y los ganglios basales; su activación provoca estimulación de la secreción de ACTH, corticosterona, oxitocina, renina y prolactina (Bortolozzi y col., 2005; Feng y col., 2001). Se consideran involucrados en el comportamiento motor (Bishop y col., 2004) e impulsivo (Nomura y Nomura, 2006) y algunos antagonistas de estos receptores son usados para el tratamiento de la esquizofrenia (Kim y col., 2009) y la depresión (Marek y col., 2003; Berg y col., 2008).

El subtipo **5-HT_{2B}** se ha detectado en el cerebelo, septum lateral, hipotálamo y la parte medial de la amígdala (Cox y Cohen, 1995; Schmuck y col., 1994). En ratas se le han identificado efectos ansiolíticos (Kennett y col., 1998). Están involucrados en la contracción del músculo liso del fondo del estómago y también median la relajación dependiente del endotelio en ratas y la contracción del músculo longitudinal del intestino en humanos (Ellis y col., 1995; Borman y col., 2002). En fibroblastos de ratón tiene efectos mitogénicos a través de la activación de MAP cinasas (Nebigil y col., 2000). Algunos antagonistas de estos receptores tienen aplicaciones clínicas en el tratamiento de la migraña (Kennett y col., 1994). Al parecer este subtipo de receptor se expresa en válvulas cardiacas y parecen ser responsables de valvulopatías identificadas en pacientes tratados con preparaciones para reducir el apetito que contienen fenfluramina (Berger y col., 2009; Bhattacharyya y col., 2009).

Los receptores **5-HT_{2C}** están presentes en las células epiteliales del plexo coroideo y se ha propuesto que su estimulación podría regular la composición del líquido cerebrospinal. También se han localizado, aunque en concentraciones mucho más bajas, en áreas del sistema límbico como el hipotálamo, hipocampo, septum y neocorteza y en

áreas asociadas con el comportamiento motor como la sustancia nigra y el globo pálido. Parecen estar involucrados en la regulación del apetito, el estado de ánimo, el comportamiento afectivo y la memoria (Jensen y col., 2010), por lo que la modulación de estos receptores ha adquirido gran interés en el tratamiento de patologías como la depresión (Goodwin y col., 2009), ansiedad (Buhot, 1997), esquizofrenia y la obesidad (Jensen y col., 2010).

2.3.3 Receptores 5-HT₃

Los receptores 5-HT₃ son canales iónicos constituidos por cinco subunidades, dispuestas alrededor de un poro central permeable a iones sodio, potasio y calcio; su estimulación favorece la apertura del canal lo que genera una corriente iónica que despolariza la membrana y por tanto, incrementa la excitabilidad neuronal. Se encuentran en neuronas centrales y periféricas; se ubican a nivel presináptico en las terminaciones nerviosas, donde median o modulan la liberación de neurotransmisores. Se ha confirmado la efectividad clínica de algunos antagonistas de estos receptores en el tratamiento de la náusea y el vómito inducida por quimioterapia y radioterapia (Gyermek 1995). Además diversos datos confirman su efectividad en el tratamiento de la migraña o del dolor asociado a la migraña. También se ha sugerido que los antagonistas 5-HT₃ pueden incrementar la memoria y ser benéficos en el tratamiento de la ansiedad, depresión, dolor y demencia (Thompson y Lummis, 2007). Asimismo, los antagonistas 5-HT₃ han mostrado cierta eficacia para reducir la ingestión de morfina (Hui y col., 1993) y alcohol, en este último caso, posiblemente mediante alteración de la modulación de la liberación de dopamina (Thompson y Lummis, 2007; Machu, 2011).

2.3.4 Receptores 5-HT₄

De los receptores 5-HT₄ se han identificado siete variantes con similitudes farmacológicas; se encuentran en alta densidad en el cuerpo estriado, sustancia nigra, tubérculo olfatorio e hipocampo (Hensler, 2006). En el SNC se localizan postsinápticamente y modulan la liberación de neurotransmisores como acetilcolina, dopamina, serotonina y GABA e incrementan la transmisión sináptica involucrada en el desarrollo de la memoria. En este sentido estos receptores se han encontrado significativamente disminuidos en pacientes con enfermedad de Alzheimer (Reynolds y col., 1995). Debido a su alta densidad en el núcleo *accumbens* se considera que pueden estar involucrados en el sistema de recompensa (Reynolds y col., 1995). Por otra parte, su activación favorece la liberación de

acetilcolina en el íleon y la contracción del esófago y colon en cerdos. Además participan en la modulación de la motilidad gastrointestinal, la actividad secretora de la mucosa intestinal (Hansen y col., 2008) e incrementan la fuerza de contracción del corazón (Mialet y col., 2000).

2.3.5 Receptores 5-HT₅

En roedores se han identificado dos subtipos funcionales del receptor 5-HT₅, sin embargo en humanos sólo se expresa el subtipo 5-HT_{5A} (Grailhe y col., 2001). Se ha especulado que este tipo de receptores está involucrado en el control motor, alimentación, ansiedad, depresión, aprendizaje, consolidación de la memoria, comportamiento adaptativo y el desarrollo cerebral (Thomas, 2006).

2.3.6 Receptores 5-HT₆

Los receptores 5-HT₆ se localizan predominantemente en áreas límbicas, zonas cerebrales extrapiramidales, núcleo caudado y sustancia nigra (Kohen y col., 1996). Su significancia clínica es poco clara, si bien se sugiere una posible conexión con algunos desórdenes psiquiátricos (Johnson y col., 2008).

2.3.7 Receptores 5-HT₇

Los receptores 5-HT₇ incrementan la actividad de la adenilciclase a través de la vía de las proteínas Gs, además activan la vía de las MAP cinasas. Se han identificado cinco subtipos con propiedades farmacológicas similares. Se expresan en bajas densidades en la corteza, septum, tálamo, hipotálamo, amígdala e hipocampo (Bonaventure y col., 2002) y ampliamente en vasos sanguíneos y músculo liso del tracto gastrointestinal (Ruat y col., 1993). Estos receptores se consideran implicados en la regulación de ritmos circadianos, lo que se corresponde con su presencia en el núcleo supraquiasmático (Hensler, 2006). Adicionalmente existen evidencias que los relacionan con alteraciones psiquiátricas como la depresión y con desórdenes del sueño (Mnie-Filali y col., 2007).

2.4 CARACTERÍSTICAS DE LAS NEURONAS DEL NÚCLEO DORSAL DEL RAPE

2.4.1 Características morfológicas de las neuronas del NDR

En el NDR las neuronas serotoninérgicas están en aposición con oligodendrocitos (Azmitia, 1978) y sus dendritas se extienden a través de la capa ependimal en el fluido cerebroespinal (Jacobs y Azmitia, 1992). Las neuronas serotoninérgicas están frecuentemente asociadas con vasos sanguíneos grandes, con su cuerpo celular o prolongaciones en la vecindad de las células endoteliales (Azmitia, 1978; Descarries y col., 1982).

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

Las neuronas serotoninérgicas del NDR emiten colaterales axónicas que hacen sinapsis a nivel somatodendrítico con ellas mismas o con neuronas vecinas (Wang y Aghajanian, 1977).

Dentro de las técnicas de estudio de estas neuronas se ha utilizado inmunohistoquímica para serotonina y para la enzima hidroxilasa de triptófano, así como, su destrucción selectiva con 5,7-dihidroxitriptamina inyectada dentro del ventrículo lateral (Baumgarten y col., 1972; Bjorklund y col., 1975).

2.4.2 Características electrofisiológicas de las neuronas del NDR-registros extracelulares

En estudios *in vivo* Aghajanian y col. (1978) mostraron que de acuerdo con su patrón de descarga, hay tres tipos de neuronas en el NDR: las neuronas tipo I que descargan lentamente (0.25-2.0 Hz), de manera regular y espontánea; las neuronas tipo II que son células con disparo muy lento o silentes y las neuronas tipo III que son células rápidas (>2.0 Hz) y con un patrón de descarga frecuentemente irregular. Estudios histoquímicos y electrofisiológicos prueban que las neuronas tipo I son serotoninérgicas (Aghajanian y col., 1974; Wang y col., 1977).

En rebanadas de cerebro, Mosko y Jacobs (1976) encontraron que las neuronas del NDR presuntamente serotoninérgicas exhiben propiedades electrofisiológicas similares a las observadas *in vivo*. Así, encontraron sólo neuronas con disparo espontáneo, de las cuales, la mayoría presentaron frecuencias de 0.8-2.5 Hz, muy similares a las de las células tipo I de los experimentos *in vivo*. Los mismos autores describen una población de neuronas rápidas (3.0-11.6 Hz) correspondientes a las neuronas tipo III de los estudios *in vivo*; estas neuronas disparan de manera irregular y frecuentemente en ráfagas. Mosko y Jacobs también describieron un patrón oscilatorio (on-off) de descarga de las neuronas del NDR, con periodos de alta frecuencia alternados con periodos de baja frecuencia y una duración de un rango de 10 a 50 segundos. Un patrón similar fue observado en neuronas del NDR *in vivo* (Mosko y Jacobs, 1974). Sin embargo, a diferencia del trabajo de Mosko y Jacobs, en estudios *in vitro* Vandermaelen y Aghajanian (1983) encontraron que la mayoría de las neuronas no mostraron actividad espontánea. Estos autores atribuyen tal diferencia a posibles dificultades técnicas en el estudio de Mosko y Jacobs, que no hayan permitido identificar y registrar neuronas sin actividad espontánea. Tal ausencia de actividad espontánea *in vitro* ha sido atribuida a la falta de aferentes excitadoras intactas en rebanadas de cerebro, toda vez que la administración de glutamato, epinefrina o fenilefrina provocó su disparo.

2.4.3 Características electrofisiológicas de las neuronas del NDR-registros intracelulares

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

2.4.4 Características farmacológicas de las neuronas 5-HT y no 5-HT del NDR

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

Las neuronas serotoninérgicas del NDR son inhibidas por el GABA (Pan y col., 1989; Pan y Williams, 1989; Baraban y Aghajanian, 1980) el cual se libera de terminales nerviosas que se originan tanto fuera (sustancia nigra y habénula) como dentro de este núcleo; en el último caso el GABA es producido por neuronas serotoninérgicas y no serotoninérgicas (Harandi y col., 1987). Los receptores para GABA expresados por las neuronas serotoninérgicas del NDR son de 2 tipos: "A", estimulados por muscimol y bloqueados por bicuculina y picrotoxina y "B" (Tao y col., 1996), los cuales son estimulados por baclofen e inhibidos por flaclofen.

La serotonina y el LSD aplicados en el NDR inhiben la actividad de las neuronas serotoninérgicas de este núcleo (Aghajanian y col., 1972; Aghajanian y col., 1982), una acción similar ejercen los inhibidores de la monoaminoxidasa (MAO) administrados en la circulación sistémica (Aghajanian y col., 1970) y los inhibidores de la recaptura de serotonina (Sheard y col., 1972). La acción inhibitoria de la 5-HT sobre la frecuencia de disparo de las neuronas serotoninérgicas del NDR se debe principalmente a la estimulación de los autorreceptores somatodendríticos, de tipo 5-HT_{1A} (Sprouse y Aghajanian, 1987), la cual produce hiperpolarización por incremento de la conductancia de la membrana al potasio (Aghajanian y col., 1987; Innis y col., 1988; Williams y col., 1988). Tal estimulación produce además disminución de la síntesis (Hjorth y Magnusson, 1988) y liberación de serotonina (Davidson y Stamford, 1995). Las neuronas del NDR también poseen, en el área somatodendrítica y en sus terminales axónicas, receptores 5-HT_{1B} y 5HT_{1D}, cuya estimulación disminuye la liberación de serotonina (Davidson y Stamford, 1995; Sprouse y Aghajanian, 1987).

Estudios electrofisiológicos e inmunohistoquímicos recientes, han puesto de manifiesto que las neuronas no serotoninérgicas del NDR, pueden ser también hiperpolarizadas por estimulación de los receptores 5-HT_{1A} y que un número significativo

de éstas expresa dichos receptores, si bien, se han encontrado neuronas no serotoninérgicas que no los expresan (Kirby y col., 2003). Adicionalmente, se ha observado que la estimulación de los receptores α_1 adrenérgicos con fenilefrina, provoca la descarga de neuronas silentes, tanto serotoninérgicas como no serotoninérgicas, con un patrón de disparo similar entre ellas y una frecuencia ligeramente por debajo del rango previamente reportado para las neuronas serotoninérgicas (Kirby y col., 2003).

Las neuronas del NDR presentan múltiples tipos de receptores para neurotransmisores, tanto a nivel somatodendrítico (receptores postsinápticos) como en sus terminaciones axónicas (receptores presinápticos). Muestran una actividad de disparo dependiente del estado fisiológico (sueño o vigilia) y son estimuladas por la noradrenalina a través de receptores α adrenérgicos (Baraban y Aghajanian, 1980a y 1980b; Marwaha y Aghajanian, 1982; Menkes y col., 1981) y por el glutamato (Pan y Williams, 1989; Celada y col., 2001).

Estudios electrofisiológicos e inmunohistoquímicos demuestran la presencia de receptores colinérgicos de tipo nicotínico y muscarínico en las neuronas del NDR (Klamt y Prado, 1991; Key y Krzywoski, 1977); en ratas, las neuronas serotoninérgicas y no serotoninérgicas presentan receptores nicotínicos de tipo $\alpha_4\beta_2$ y α_7 (Bitner y col. 2000; Bitner y Nikkel 2002; Galindo-Charles y col., 2008). La estimulación de receptores colinérgicos en el NDR, además de asociarse fuertemente con la regulación del ciclo sueño vigilia, se considera involucrada en la antinocicepción y el estado de ánimo. En este sentido se ha descrito que la estimulación de receptores nicotínicos incrementa la frecuencia de disparo de las neuronas serotoninérgicas (Mihailescu y col., 1998; 2001; 2002) y la secreción de serotonina en áreas cerebrales de proyección, como la corteza cerebral, estriado, hipocampo e hipotálamo (Seth y col., 2002). Además, dentro del NDR la nicotina aumenta la liberación de noradrenalina por estimulación de receptores α_7 (Li y col., 1998) y la liberación de glutamato mediante estimulación de receptores $\alpha_4\beta_2$ (Garduño y col., 2012).

2.5 LOS RECEPTORES NICOTINICOS NEURONALES

Con base en la acción de los compuestos naturales muscarina y nicotina los receptores para acetilcolina han sido clasificados en muscarínicos (mAChR, de: *muscarinic acetylcholine receptors*) y nicotínicos (nAChRs, de: *nicotinic acetylcholine receptors*) (Lorens y Van De Kar, 1987). Los nAChRs pertenecen a la familia de canales iónicos dependientes de ligando junto con los receptores de tipo AMPA-kainato, NMDA, GABA_A, 5-HT₃ y glicinérgicos. Los nAChRs son canales iónicos para cationes, permeables a los iones monovalentes sodio y potasio y al catión divalente, calcio (Gotti y col., 2009). Los diferentes subtipos de receptores exhiben diferente permeabilidad para el calcio, sin embargo, aún los nAChRs del músculo esquelético adulto, que se han considerado con baja permeabilidad para el calcio, presentan una importante permeabilidad para estos iones (Fucile, 2004).

Los nAChRs son pentámeros, con un peso molecular de aproximadamente 300, formados por cinco subunidades idénticas de tipo α (nAChRs homooligoméricos) o por subunidades α y subunidades no- α , conocidas también como subunidades β .

Los péptidos que conforman los sitios de anclaje forman un dominio extracelular amino terminal hidrofílico, seguido por tres dominios transmembranales hidrofóbicos (M1 - M3), un dominio intracelular largo y un cuarto dominio transmembranal (M4) (Gilbert y col., 1988; Chaouloff, 1993). De manera similar a otros canales catiónicos dependientes de ligando, los nAChRs presentan en el primer dominio extracelular una presilla de cisteína (Cys-loop), la cual contiene dos cisteínas separadas por 13 aminoácidos. El par Cys-Cys es necesario para el acoplamiento del nAChRs con sus agonistas (McEwen y col., 1986) y sólo existe en las subunidades α de los nAChRs (Aronsson y col., 1988).

Hasta la fecha se han clonado del tejido neuronal ocho subunidades de tipo α denominadas $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$, así como tres subunidades no- α (denominadas $\beta 2$, $\beta 3$, and $\beta 4$). La subunidad $\alpha 8$ ha sido identificada en tejidos neuronales aviares pero no en mamíferos (Dahlström y Fuxe, 1964; Koenig y col., 1987). Los subtipos de nAChRs se denominan según su composición en subunidades y utilizando un "*" para indicar la posible adición de otras subunidades complementarias (Aronsson y col., 1988).

Los nAChRs homooligoméricos contienen cinco subunidades $\alpha 7$, $\alpha 8$ o $\alpha 9$ y presentan cinco sitios de fijación para los agonistas. Los nAChRs homooligoméricos $\alpha 7$ son los más antiguos desde el punto de vista filogenético, representan el nAChRs fijador de alfa-bungarotoxina más frecuente del cerebro (Owens et al., 1990) y es el tipo de receptor que presenta la mayor permeabilidad para el calcio (Fucile, 2004).

Los nAChRs heteroligoméricos contienen subunidades $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ o $\alpha 6$ acopladas con subunidades $\beta 2$ o $\beta 4$ ($\alpha 2\beta 2$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, etc.). Las subunidades $\beta 3$ y $\alpha 5$ pueden formar nAChRs funcionales sólo si están asociadas con por lo menos otros dos tipos de subunidades (por ejemplo: $\alpha 4\beta 2\alpha 5$ -, $\alpha 3\beta 4\alpha 5$ -, $\alpha 4\alpha 6\beta 2\beta 3$ - o $\alpha 3\beta 2\beta 4\alpha 5$ -) (Owens y col., 1990). Los nAChRs que contienen subunidades $\alpha 4$ y $\beta 2$ ($\alpha 4\beta 2^*$ nAChRs) representan aproximadamente el 90 % de los sitios de fijación de alta afinidad para nicotina del cerebro (Seckl y col., 1990).

Los agonistas de los receptores nicotínicos (por ejemplo la nicotina o la acetilcolina) se fijan a una bolsa hidrofóbica que se forma en la interfase entre una subunidad α , que posee una presilla Cys-Cys y la cara complementaria de una subunidad adyacente, representada por tres aminoácidos que pertenecen a las subunidades $\alpha 10$, $\beta 2$ o $\beta 4$ (Azmitia y McEwen, 1974). Es importante mencionar que las subunidades $\alpha 5$ y $\beta 3$ no participan directamente en la formación de un sitio de fijación para el agonista. Asimismo, las subunidades $\alpha 5$ y $\alpha 10$ no fijan agonistas a pesar de su inclusión en la categoría de las subunidades alfa, debido a que los residuos de aminoácidos necesarios para la fijación de los agonistas están ausentes.

Las diferencias en la composición de los diversos subtipos de nAChRs les confieren propiedades electrofisiológicas y farmacológicas distintas. Así, tipos diferentes de nAChRs recombinantes presentan perfiles diferentes de potencia y eficacia para los agonistas y antagonistas, dependientes tanto de las subunidades α como de las subunidades β (De Kloet y col. 1982; Joels y De Kloet, 1990; Joels y De Kloet, 1992; Koenig y col., 1987; Owens y col., 1990; Lesch y col., 1990; Burnet y col., 1992). Otra consecuencia importante de la composición heterogénea de los nAChRs es su permeabilidad para calcio. Los nAChRs homoligoméricos formados por subunidades $\alpha 7$ o $\alpha 8$ presentan una alta permeabilidad para calcio ($pCa^{2+}/pNa^{+}>15$), mientras que las subunidades $\alpha 2$ a $\alpha 6$, en combinación con subunidades $\beta 2$ - $\beta 4$, generan heteroligómeros con una permeabilidad para calcio menor ($pCa^{2+}/pNa^{+}=1.1-1.5$) (McGehee y Role, 1995; Role y Berg, 1996).

La desensibilización es un término general que describe la disminución o la pérdida de una respuesta biológica como consecuencia de una estimulación prolongada o repetitiva (Ochoa y col., 1989). A nivel molecular, el estado de desensibilización refleja una acumulación de receptores en estado inactivado (Colquhoun y Ogden, 1988). Los nAChRs purificados y expresados en bicapas lipídicas pueden ser desensibilizados, lo que indica que la desensibilización depende de proteínas que pertenecen al receptor nicotínico mismo (Ochoa y col., 1989). Después de remover el agonista, el receptor puede recuperarse, pero, frecuentemente, la recuperación es incompleta (Katz y Thesleff, 1957).

La recuperación incompleta puede reflejar una acumulación duradera de receptores en uno o varios estados desensibilizados o la pérdida permanente de canales funcionales (Lukas, 1991; Buisson y Bertrand, 2002).

La composición en subunidades de los nAChRs tiene consecuencias importantes sobre la desensibilización. Los nAChRs homoligoméricos tipo $\alpha 7$ se desensibilizan rápidamente en presencia de concentraciones altas de acetilcolina o nicotina, lo que indica que la presencia de las subunidades $\alpha 7$ es suficiente para producir desensibilización (McGehee y Role, 1995). Los nAChRs homoligoméricos se desensibilizan a concentraciones submicromolares de nicotina (IC50 para desensibilización = 500 nM) y en el estado desensibilizado presentan menor afinidad por los agonistas que los receptores heteroligoméricos.

Existen diferencias importantes entre varios tipos de nAChRs heteroligoméricos desde el punto de vista de la velocidad de desensibilización. Por ejemplo los nAChRs $\alpha 4\beta 2$ se desensibilizan más rápido que los $\alpha 3\beta 4^*$. Cuando la composición en subunidades β se mantiene constante, la presencia de la subunidad $\alpha 3$ acelera la desensibilización, mientras que la presencia de la subunidad $\alpha 4$ desacelera la desensibilización (Chávez-Noriega LE, 2000). Las subunidades β de los nAChRs heteroligoméricos controlan especialmente la velocidad de desensibilización. Así, los nAChRs que contienen subunidades $\beta 2$ se desensibilizan más rápido que los nAChRs que contienen la subunidad $\beta 4$ (Bohler 2001). Los nAChRs heteroligoméricos se pueden ordenar según sus cinéticas de desensibilización, de la más rápida a la más lenta de la siguiente manera: $\alpha 3\beta 2 > \alpha 4\beta 2 > \alpha 3\beta 4 > \alpha 4\beta 4$ (Fenster y col., 1997). En presencia continua de nicotina, tal como ocurre en los fumadores, prácticamente todos los nAChRs están desensibilizados. Sin embargo, después de quitar la nicotina, la mayoría de los nAChRs expresados se vuelven funcionales.

La función más importante de la desensibilización es probablemente impedir la estimulación excesiva de la célula (Ochoa y col., 1989), debido a que todos los nAChRs son permeables para calcio y como consecuencia potencialmente tóxicos para las células (McGehee y Role, 1995). La mutación de la leucina 247 en subunidades $\alpha 7$ disminuye la desensibilización de los nAChRs homoligoméricos $\alpha 7$ (Revah y col., 1991), y es letal cuando se introduce genéticamente en ratones (Orr-Urtreger y col., 1997).

La nicotina produce aumento del número de receptores nicotínicos (Peng y col., 1994), especialmente de los nAChRs que contienen subunidades $\beta 2$ como los nAChRs de tipo $\alpha 3\beta 2$ y particularmente $\alpha 4\beta 2$. Es importante mencionar que los nAChRs de tipo $\alpha 4\beta 2$ presentan dos estequiometrías: $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ y $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$; siendo la conformación $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$

más sensible a la estimulación y a la regulación a la alza inducidas por la nicotina. Además, la nicotina aumenta el tiempo de vida de los receptores nicotínicos ya expresados en la membrana de la célula.

Los nAChRs son modulados alostéricamente por diversos agentes como el calcio, la fisostigmina, la serotonina, entre otros. El aumento de la concentración extracelular de calcio potencia las respuestas de los nAChRs, debido a la fijación del calcio a un sitio modulador extracelular, que aumenta la frecuencia de apertura de los nAChRs activados (Corringer y col., 1998; Changeux y col., 1984). La fisostigmina, un inhibidor de la acetilcolinesterasa, activa los nAChRs expresados en fibroblastos a través de un sitio de fijación diferente al de acetilcolina (Pereira y col., 1994). La serotonina y los bloqueadores de receptores para serotonina (metilsergida, espiperona, ketanserina) actúan como bloqueadores no competitivos de los nAChRs de tipo $\alpha 2\beta 4$ y $\alpha 4\beta 2$ expresados en ovocitos de *Xenopus* y aumentan la tasa de desensibilización de estos receptores (García-Colunga y Miledi, 1995), se cree que la serotonina y los bloqueadores de sus receptores se fijan a un sitio ubicado al interior del canal nicotínico.

2.6 LA NICOTINA Y EL NÚCLEO DORSAL DEL RAPE

2.6.1 Receptores nicotínicos en el NDR

La presencia de los receptores nicotínicos en neuronas del NDR ha sido confirmada en humanos (Benwell y col., 1988). Por otra parte, en el año 2000, Bitner y col., utilizando técnicas inmunohistoquímicas, identificaron la subunidad $\alpha 4$ de los nAChRs en neuronas serotoninérgicas del NDR de ratas (Figura 2.2). La expresión de tal subunidad se encuentra asociada con aumento de la analgesia en comparación con las ratas que presentan disminución de la expresión de dicho subtipo de receptor.

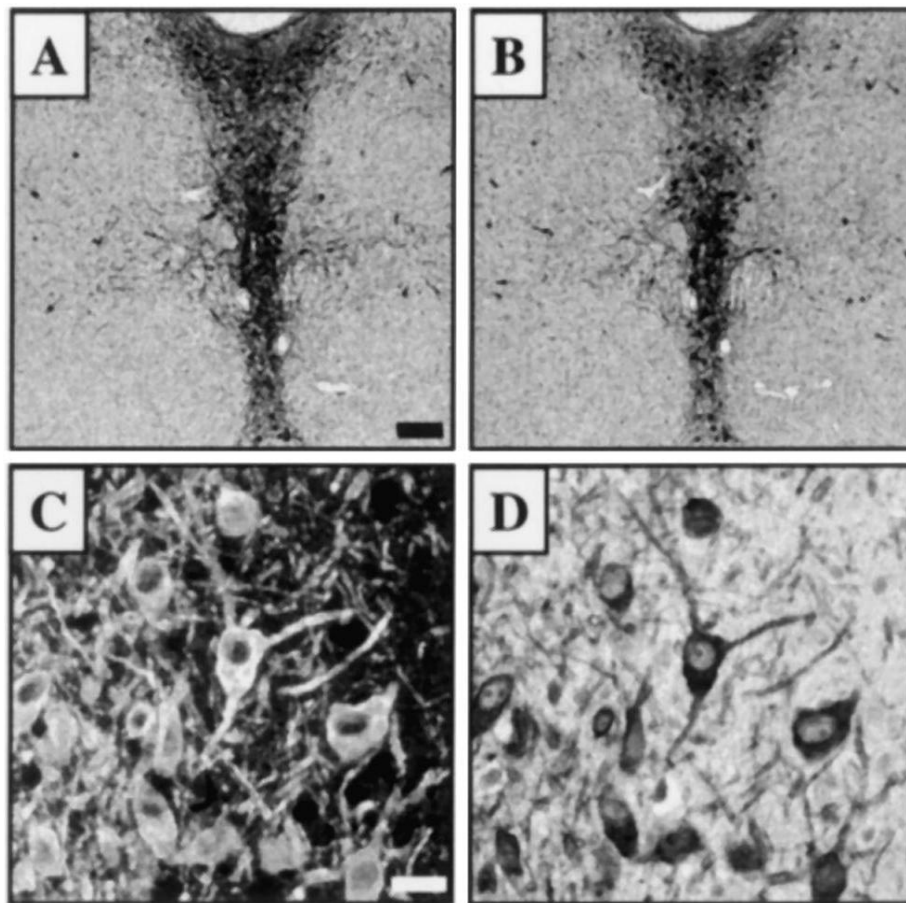


Figura 2.2 Estudio inmunohistoquímico de expresión de la enzima hidroxilasa de triptófano y la subunidad $\alpha 4$ en el NDR de rata. Un patrón similar de inmunotinción fue observado en secciones adyacentes del NDR usando anticuerpos contra el marcador de la hidroxilasa de triptófano (A) y la subunidad $\alpha 4$ de los nAChRs (B). La inmunotinción de la hidroxilasa de triptófano (C) mostró casi completa superposición con la inmunotinción de las neuronas que presentaron la subunidad $\alpha 4$ (D). Barra de calibración negra 100 μm . Barra de calibración blanca 20 μm . (Tomado de Bitner y col., 2000).

Adicionalmente, en 2002, Bitner y Nikkel identificaron la expresión de la subunidad $\alpha 7$ de los nAChRs en células serotoninérgicas y no serotoninérgicas del NDR (Figura 2.3).

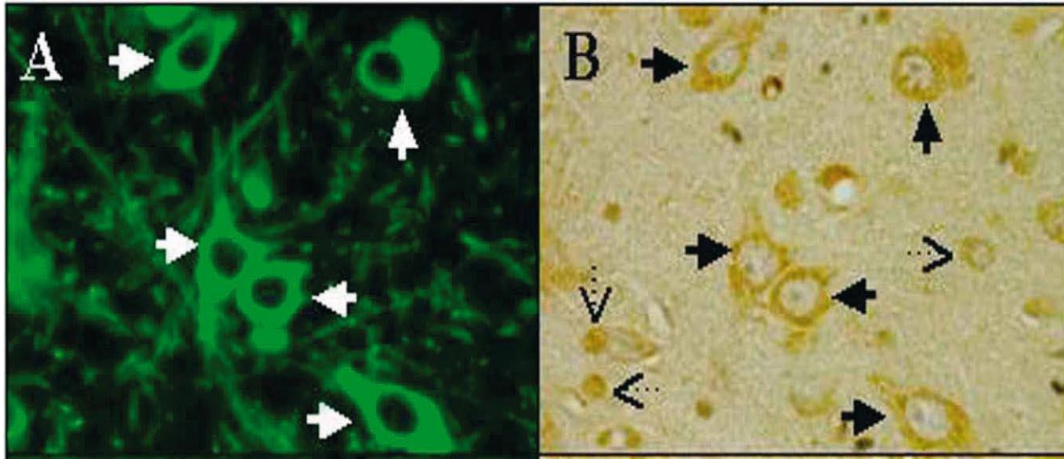


Figura 2.3 Doble marcado inmunocitoquímico de la enzima hidroxilasa de triptófano (A) y la subunidad $\alpha 7$ de los nAChRs (B) en las neuronas del NDR. Las flechas sólidas en B, indican neuronas con somas de tamaño grande; no obstante, las células pequeñas también muestran una inmunorreacción al anticuerpo 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 incremento de la expresión de c-Fos en diversos núcleos del tallo cerebral, incluyendo el NDR (Cucchiari y Commons, 2003). Además, con técnicas de inmunocitoquímica y microscopía electrónica, se ha confirmado la presencia de la subunidad $\alpha 4$ de los nAChRs en neuronas positivas y negativas a la hidroxilasa de triptófano en el NDR (Commons, 2008).

2.6.2 Efectos *in vivo* e *in vitro* de la nicotina sobre las neuronas del NDR

Diversos estudios han reportado efectos estimuladores e inhibidores de la nicotina en células presuntamente serotoninérgicas del NDR. En el estudio de Li y col. (1998), realizado con la técnica de *whole cell patch clamp*, se encontró que la estimulación de receptores nicotínicos provocó despolarización en el 60% de las neuronas e hiperpolarización en el 40% restante. A diferencia de este reporte, Engberg y col. (2000), encontraron que la nicotina (50-400 $\mu\text{g}/\text{kg}$, iv.) indujo una inhibición transitoria (1-3 min), de corta latencia (30 s) del 84.4% de las neuronas serotoninérgicas, en ratas anestesiadas. Este efecto fue bloqueado por el antagonista de receptores nicotínicos, mecamilamina

(4mg/Kg, iv.) y por el antagonista específico de los receptores 5-HT_{1A}, WAY 100635 (0.1 mg/Kg, iv.). Sin embargo, en el mismo estudio, la aplicación iontoforética de nicotina dentro de NDR, no produjo inhibición de las neuronas serotoninérgicas, lo que sugiere la participación de vías aferentes en este efecto de la nicotina.

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

Por otra parte, en el trabajo de Mihailescu y col. (2002), realizado en rebanadas de cerebro, la aplicación de nicotina, a una concentración de 2.15 μ M, provocó aumento de la frecuencia de disparo en el 70% de las neuronas serotoninérgicas del NDR y disminución de la frecuencia en el 30%; ambos efectos se muestran en la figura 2.4.

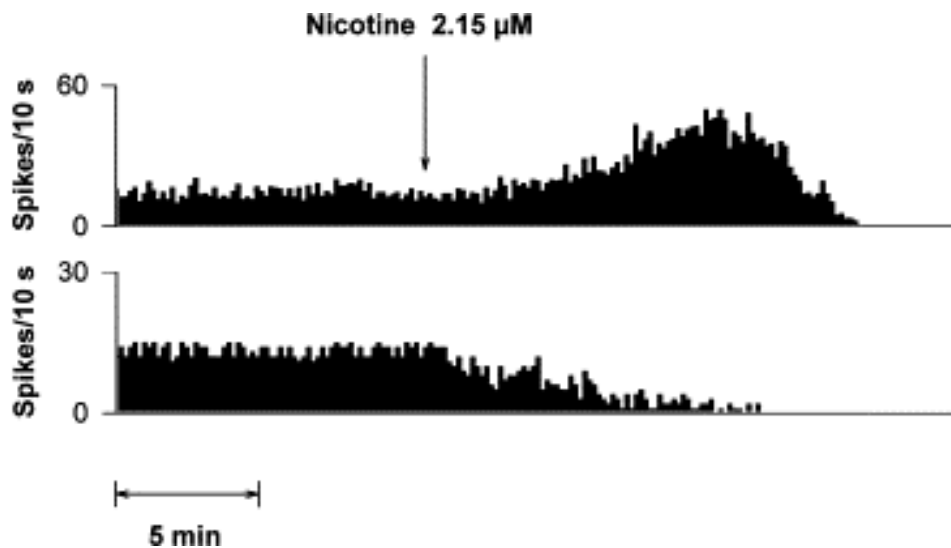


Figura 2.4 Histogramas de frecuencia de disparo de dos neuronas serotoninérgicas del NDR registradas simultáneamente. La nicotina (2.15 μ M) produjo cambios opuestos en la tasa de disparo de estas neuronas. (Tomado de Mihailescu y col., 2002).

Diversas evidencias avalan que los efectos de la nicotina sobre las neuronas serotoninérgicas del NDR involucran tanto acciones presinápticas como postsinápticas. Así, en el estudio de Li y col. (1998) antes señalado, se encontró que el efecto despolarizante de la nicotina fue dependiente de la liberación de noradrenalina inducida por la estimulación de receptores nicotínicos presinápticos de tipo $\alpha 7$; mientras que el efecto hiperpolarizante fue dependiente de la liberación de serotonina, muy probablemente de origen somatodendrítico, toda vez que fue insensible a la tetrodotoxina, esto es, fue independiente del disparo neuronal. Adicionalmente, en el estudio de Garduño y col. (2012) se identificó que la nicotina incrementó las corrientes postsinápticas excitatorias (EPSC, de: *excitatory postsynaptic currents*) glutamatérgicas en neuronas serotoninérgicas del NDR, a través de la activación de receptores nicotínicos presinápticos tipo $\alpha 4\beta 2$, efecto que fue insensible al bloqueo de receptores tipo $\alpha 7$. Las acciones presinápticas de la nicotina sobre neuronas del NDR tienen sustento morfológico en la presencia de subunidades $\alpha 4$ del receptor nicotínico en axones del NDR (Commons y col., 2008). Sin embargo, en este estudio se encontró una escasa presencia de dicha subunidad, lo que hace suponer la participación adicional de otros subtipos de receptores, idea apoyada por el trabajo de Li y col. quienes encontraron que el efecto despolarizante de la nicotina fue dependiente de receptores presinápticos tipo $\alpha 7$.

Por otra parte, Galindo-Charles y col. (2008) abordaron el estudio de las acciones postsinápticas de la nicotina mediante el análisis de las corrientes evocadas por la administración de acetilcolina en presencia de atropina y TTX, a fin de bloquear los efectos muscarínicos e indirectos. En estas condiciones la acetilcolina generó corrientes entrantes con dos cinéticas diferentes, una rápida y otra lenta, tanto en neuronas serotoninérgicas como no serotoninérgicas. Dichas corrientes fueron bloqueadas de manera selectiva por antagonistas específicos de los receptores nicotínicos $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$, respectivamente. Tales resultados coinciden con los hallazgos anatómicos que señalan la presencia de estos tipos de receptores en neuronas serotoninérgicas y no serotoninérgicas del NDR (Commons, 2008; Bitner y Nikkel, 2002; Bitner y col., 2000).

2.6.3 Efectos *in vivo* e *in vitro* de la nicotina sobre la liberación de serotonina

La nicotina, además de modificar la frecuencia de disparo de las neuronas del NDR, afecta la liberación de serotonina dentro de este núcleo y en áreas de proyección. Así, en estudios realizados en rebanadas de cerebro, la administración de nicotina en perfusión (Mihailescu y col., 1998, 2001) o mediante microinyección en el NDR (Mihailescu y col.,

2002), incrementó la liberación de serotonina medida en la solución de salida de la cámara de perfusión. La proposición de que la nicotina provoca incremento de la liberación de serotonina en áreas de proyección, como el núcleo laterodorsal tegmental (NLDT), se basa en que el efecto inhibitor de la administración de nicotina en el NDR, sobre las células del NLDT, fue bloqueado por el antagonista selectivo de los receptores 5-HT_{1A}, WAY 100635 (Mihailescu y col., 2001). De manera similar, en el NDR, el bloqueo de los receptores 5-HT_{1A} evitó el efecto inhibitor de la nicotina sobre las neuronas serotoninérgicas, lo que demuestra que la nicotina incrementa la liberación de serotonina dentro de este núcleo (Mihailescu y col., 2002).

Adicionalmente, estudios *in vivo* han demostrado que la administración de nicotina incrementa la liberación de serotonina en diversas áreas cerebrales. Al respecto la administración sistémica de nicotina (0.2 mg/kg) o del agonista nicotínico RJR-2430 (3.6 µM/kg), aumentó los niveles extracelulares corticales de serotonina (Summers y Giacobini, 1995; Summers y cols., 1996); mientras que la administración aguda y subaguda de nicotina incrementó los niveles de serotonina y del 5-HIAA, en el hipotálamo (Dominiak y col., 1984). Asimismo, la administración crónica de nicotina en ratas en libre movimiento, incrementó los niveles de serotonina en el hipotálamo, hipocampo y cerebelo (Takada y col., 1995).

2.7. LOS GLUCOCORTICOIDES

Los glucocorticoides son hormonas esteroides producidas por la corteza de las glándulas adrenales; el principal glucocorticoide producido en humanos es el cortisol, mientras que en roedores es la corticosterona. Su síntesis y liberación es estimulada por la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) producida por las células corticotrofas de la hipófisis anterior; a su vez, la síntesis y secreción de ACTH es estimulada por la hormona liberadora de corticotropina (CRH) producida por neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo. Los glucocorticoides participan en la regulación de su concentración plasmática a través de un mecanismo de retroalimentación negativa. Estas hormonas inhiben la síntesis de ACTH por la hipófisis y en concentraciones elevadas, pueden inhibir también la secreción de ACTH preformada, almacenada en vesículas; además los glucocorticoides inhiben la síntesis y secreción de CRH de manera directa e indirecta, actuando a nivel del hipotálamo e hipocampo, respectivamente (Nestler y col., 2002).

Los glucocorticoides participan en múltiples procesos fisiológicos; mediante la estimulación de receptores específicos, afectan el crecimiento y desarrollo de diversas estructuras como los pulmones y el encéfalo, así mismo, ejercen efectos metabólicos, cardiovasculares, renales, óseos, inmunológicos, anti-inflamatorios y nerviosos. Específicamente, en el SNC, los glucocorticoides afectan la expresión de receptores para neurotransmisores y otros mediadores químicos, la síntesis y secreción de neurotransmisores, hormonas y factores de crecimiento, la expresión de canales iónicos y diversos componentes de vías intracelulares de señalización, además de afectar el crecimiento y diferenciación neuronal. Por otra parte, el exceso de estas hormonas, como el observado durante la exposición crónica a agentes estresantes, se asocia con diversas alteraciones, como el incremento de la susceptibilidad a infecciones y otras enfermedades, alteraciones conductuales, metabólicas e intelectuales.

De manera clásica se ha considerado que las hormonas glucocorticoides ejercen sus efectos mediante la modificación de la transcripción génica y por lo tanto, de la síntesis de proteínas (efectos genómicos); estos efectos involucran la participación de receptores específicos ubicados intracelularmente. Sin embargo, diversas evidencias muestran que, además de efectos genómicos, los glucocorticoides ejercen efectos no genómicos, los cuales dependen, en algunos casos, de receptores distintos del receptor intracelular clásico y en general, se expresan en periodos cortos de tiempo, no compatibles con los tiempos requeridos para la síntesis de nuevas proteínas o la manifestación de efectos resultantes de la inhibición de la síntesis proteica.

2.7.1 El receptor para glucocorticoides

El receptor clásico para glucocorticoides (GR, de: *glucocorticoid receptor*), es miembro de la superfamilia de factores de transcripción inducidos por ligando. En humanos el gen del GR se localiza en el cromosoma 5 y está compuesto por 10 exones, lo que permite la síntesis de diferentes isoformas del receptor. Así, mediante *splicing* alternativo se generan las dos isoformas más ampliamente conocidas, la GR α y la GR β (Encio y Detera-Wadleigh, 1991). La isoforma predominante es la GR α , la cual está constituida por 777 residuos de aminoácidos (Revollo y Cidlowski, 2009).

El GR es una proteína modular constituida por tres dominios; un dominio de unión al ADN (DBD, de: *DNA binding domain*), un dominio carboxilo terminal de unión a la hormona (LBD, de: *ligand binding domain*) y un dominio amino terminal (NTD, de: *amino terminal domain*) (Heitzer y col., 2007). A nivel del NTD se encuentra una región con

función activadora conocida como AF-1 (de: *activation function-1*), la cual participa en la regulación de la transcripción. Esta región interactúa directamente con la maquinaria basal de transcripción y con muchos cofactores que participan en la regulación de este proceso (McEwan y col., 1993). El LBD ayuda a la dimerización del receptor y contiene secuencias para la interacción con otras proteínas. En el LBD está presente un segundo dominio con función activadora, el AF-2; tras la unión de la hormona al receptor, este dominio sufre un cambio en su conformación que permite la interacción con factores accesorios que favorecen la activación de la transcripción (co-activadores) o su represión (co-represores). El AF-2 actúa sinérgicamente con el AF-1 para mediar la actividad de transcripción (Beato y Klug, 2000).

El GR no unido a la hormona se localiza predominantemente en el citoplasma, donde interactúa con un complejo de proteínas chaperonas que lo mantienen en su estado inactivo y receptivo a la hormona. Este complejo comprende proteínas de choque calórico como la HSP90 (de: *heat-shock proteins 90*), proteínas p23 y p60 (Schoneveld y col., 2004) y proteínas de repeticiones tetratricopeptídicas (TPR, de: *tetratricopeptide repeat*). La HSP90 oculta una secuencia de localización nuclear, denominada NL-2, con lo que previene la unión del receptor al ADN en ausencia de la hormona; tras la unión de la hormona, la HSP90 es liberada permitiendo que la secuencia NL-2 ayude al ingreso del receptor al núcleo, a través de los poros nucleares (Savory y col., 1999). Por su parte, las proteínas TPR pueden incrementar o atenuar la actividad del receptor afectando su afinidad por la hormona y su desplazamiento al núcleo. La organización del receptor no unido a la hormona y estas proteínas chaperonas constituyen un complejo receptor maduro que es receptivo a la hormona (Heitzer y col., 2007). En general, la unión de la hormona provoca la activación del receptor y la disociación del complejo proteínico.

2.7.2 Mecanismo de acción de los glucocorticoides

Los glucocorticoides ingresan a la célula blanco y se unen al receptor citoplasmático, tras su unión, el complejo hormona-receptor se desplaza rápidamente al interior del núcleo (Heitzer y col., 2007). El DBD del GR confiere al receptor la capacidad de unirse al ADN; en el núcleo, el GR activo se une a un sitio del ADN asociado a genes regulados por hormonas. Este sitio se denomina “Elemento de respuesta a glucocorticoides” (GRE, de: *glucocorticoid response element*) y consiste en una secuencia consenso, palíndroma imperfecta del ADN, constituida por dos secuencias de seis pares de bases separadas por un espaciador de tres pares de bases. La interacción de un GR activo con la mitad de la

secuencia GRE favorece la unión de un segundo GR, dando lugar a la formación de un dímero (Schoneveld y col., 2004). La unión del homodímero al GRE sirve como andamio para la unión de distintos complejos macromoleculares que incluyen proteínas co-activadoras, factores de remodelación de la cromatina y otros factores que directa o indirectamente enlazan la maquinaria de transcripción (Bamberger y col., 1996). Asimismo puede favorecerse la interacción con co-represores, que contribuyen de diversas maneras a reprimir el proceso de transcripción, así, por ejemplo, se pueden activar desacetilasas de histonas que provocan que la cromatina adquiera una configuración cerrada, lo que reprime la transcripción (Heitzer y col., 2007).

Activación de la transcripción

Se han identificado diversos mecanismos mediante los cuales el GR activo incrementa la transcripción génica. En algunos casos, la unión del GR al ADN induce cambios en la conformación del receptor que favorecen la incorporación de la maquinaria basal de transcripción a la caja TATA, lo que promueve directamente la transcripción génica. En otros casos, como se ha señalado, el GR puede asociarse con co-activadores que sirven como puentes para la incorporación de la maquinaria basal de transcripción. Además, la unión del GR puede resultar en la incorporación de co-activadores que remodelan la cromatina alterando la estructura nucleosomal del ADN, lo que crea un ambiente más favorable para la expresión génica (Revollo y Cidlowski, 2009).

El GR también puede regular la actividad génica sin unirse directamente al ADN; estas acciones dependen de interacciones proteína-proteína con otros factores de transcripción, como las proteínas transductoras de señal y activadoras de la transcripción (STATs, de: *signal transducers and activators of transcription*), las cuales están involucradas en la vía de señalización de la cinasa Janus (JAK, de: *Janus kinase*). En este caso, el GR activo se asocia a STAT quien se une directamente al ADN; tal asociación conduce a la activación de la transcripción del gen involucrado (Revollo y Cidlowski, 2009).

Un mecanismo adicional es mediante la modificación de la síntesis de ciertas proteínas, como factores de transcripción y co-activadores, lo que da lugar a la modificación de la transcripción génica mediada por tales proteínas (Schoneveld y col., 2004; Revollo y Cidlowski, 2009).

Represión de la transcripción

Múltiples efectos de los glucocorticoides implican la represión de la transcripción de ciertos genes; los mecanismos involucrados son diversos y de manera similar a sus

acciones de activación génica, incluyen la unión del GR a secuencias específicas del ADN o la interacción con otros factores de transcripción. En el primer caso, el GR se une a elementos de respuesta a glucocorticoides de carácter negativo (nGRES), lo que da como consecuencia represión de la transcripción del gen asociado (Beato, 1989). Un ejemplo de este mecanismo de acción es la represión de la transcripción del gen de la proopiomelanocortina (Drouin y col., 1993), que resulta en disminución de la síntesis de ACTH.

En otros casos, la represión génica involucra interacciones proteína-proteína con algunos factores de transcripción, como la proteína-activadora 1 (AP-1, de: *activator protein-1*) y el factor nuclear κ B (NF- κ B, de: *nuclear factor κ B*), implicados en respuestas inflamatorias (Revollo y Cidlowski, 2009; Adcock y Caramori, 2001); mediante diversas acciones el GR interfiere la actividad de tales factores lo que reduce o evita la transcripción génica mediada por ellos.

2.7.3 Efectos no genómicos de los glucocorticoides

Diversas evidencias indican que los glucocorticoides provocan efectos no genómicos. Estos efectos se expresan en segundos o minutos tras la llegada de la hormona a la célula y en algunos casos, son mediados por receptores ubicados en la membrana plasmática (Norman y col., 2004; Chen y Qiu, 1999). Es probable que estos receptores se encuentren acoplados a diferentes vías intracelulares de señalización, a través de la participación de proteínas G y diversas cinasas. Además, algunas cinasas y fosfatasa asociadas al complejo GR/HSP90, que son liberadas tras la unión de la hormona al GR, pueden ser responsables de acciones no genómicas de los glucocorticoides, como la rápida inducción de la cinasa de tirosina observada en algunos tipos celulares (Hayashi y col., 2004). A pesar de que en la actualidad se cuenta con amplia información respecto de los efectos no genómicos de estas hormonas, se requiere mayor investigación que permita esclarecer los mecanismos celulares implicados, así como, la relevancia fisiológica de los mismos (Revollo y Cidlowski, 2009).

2.8 LOS GLUCOCORTICOIDES Y EL NÚCLEO DORSAL DEL RAJE

Estudios anatómicos, bioquímicos, electrofisiológicos y conductuales han establecido la existencia de interacciones funcionales entre las neuronas serotoninérgicas del encéfalo y el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Lorens y Van de Kar, 1987, Gilbert y col., 1988, Chaouloff, 1993). En la rata, se han encontrado receptores para hormonas corticoadrenales en varias regiones del cerebro que presentan una densa inervación serotoninérgica (McEwen y col., 1986, Aronsson y col., 1988). Específicamente, Härfstrand y col. (1986) han demostrado, mediante inmunohistoquímica, la presencia del receptor para glucocorticoides en neuronas serotoninérgicas del NDR.

Por otra parte, la influencia del sistema serotoninérgico sobre el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal involucra un efecto estimulador de la serotonina, mediado por varios tipos de receptores (Fuller, 1992), sobre la secreción de ACTH, corticosterona y cortisol en varias especies, incluyendo el humano (Koenig y col., 1987; Owens y col., 1990). Por ejemplo, se ha comprobado que la activación de receptores postsinápticos tipo 5-HT_{1A} por agonistas selectivos (8-OH-DPAT, buspirona, gepirona, isapirona) produce un aumento de la secreción de ACTH y corticosterona en ratas (Koenig y col. 1987; Lesch y col. 1990; Owens y col. 1990). Adicionalmente, existen reportes de que la serotonina regula la expresión de receptores para glucocorticoides y mineralocorticoides en el hipocampo y en la corteza cerebral de la rata (Seckl y col., 1990).

De manera recíproca, las hormonas glucocorticoides ejercen numerosos efectos sobre el sistema serotoninérgico. Estos efectos se ejercen sobre: 1) la actividad de la enzima hidroxilasa de triptófano; 2) la sensibilidad de los receptores 5HT_{1A}; 3) la entrada glutamatérgica de las neuronas serotoninérgicas del NDR; 4) la expresión, afinidad y sensibilidad de los receptores α_1 -adrenérgicos.

2.8.1 Efecto de los glucocorticoides sobre la actividad de la hidroxilasa de triptófano

La exposición crónica a concentraciones altas de glucocorticoides aumenta la expresión de la enzima limitante de la síntesis de serotonina, la hidroxilasa de triptófano (Azmitia y McEwen, 1974). Las neuronas serotoninérgicas del NDR expresan dos variantes de esta enzima, la hidroxilasa de triptófano tipo 1 (TPH₁) y la tipo 2 (TPH₂), siendo mayor la expresión de TPH₂ que de TPH₁. Estudios recientes han señalado que la corticosterona aumenta la actividad de la TPH₁, pero no influye la actividad de la TPH₂ (Abumaria y col., 2008). Sin embargo, en otros estudios, se ha demostrado que la expresión del gen *tph2* y

la síntesis de la TPH₂ son dependientes de la secreción rítmica circádica de glucocorticoides. Así, en ratas normales, la TPH₂ y su RNAm están aumentados en las primeras horas de su fase activa (Malek y col., 2005), cuando la secreción de glucocorticoides presenta sus mayores valores. La adrenalectomía bilateral suprime el ritmo circádico de expresión del *tph2* y este fenómeno es revertido por la administración, durante el periodo activo, de glucocorticoides en el agua de bebida (Malek y col., 2007). Sin embargo en animales adrenalectomizados, la liberación continua de esta hormona desde implantes subcutáneos, no restaura el patrón circádico de síntesis y liberación de TPH₂ (Malek y col., 2007).

Adicionalmente, se ha observado que la administración oral de concentraciones altas de glucocorticoides induce aumento de la expresión del gen *tph2*, mismo que se asocia con fenómenos de ansiedad y depresión en modelos animales (Donner y col., 2012). Otro argumento a favor del incremento de la actividad de la hidroxilasa de triptófano por los glucocorticoides, es que la adrenalectomía disminuye la acumulación de serotonina en el hipocampo, efecto revertido por administración de corticosterona (De Kloet y col., 1982).

2.8.2 Efecto de los glucocorticoides sobre los receptores 5-HT_{1A}

En registros extracelulares de neuronas serotoninérgicas del NDR llevados a cabo en rebanadas de cerebro de ratas adrenalectomizadas, Laaris y col. (1995) encontraron que la administración en perfusión de corticosterona (30-100 nM) disminuyó la sensibilidad de las neuronas serotoninérgicas al 8-OH-DPAT (agonista específico de los receptores 5-HT_{1A}), efecto mimetizado por el agonista de los receptores de glucocorticoides, RU 28362 y antagonizado por el bloqueador de tales receptores, RU38486. Resultados similares encontraron Fairchild y col. (2003); utilizando ratas normales y adrenalectomizadas, analizaron los efectos de la administración crónica (25-31 días) de corticosterona vía oral, sobre la función de los autoreceptores 5-HT_{1A} mediante el análisis del efecto de la 5-HT sobre la frecuencia de disparo de neuronas serotoninérgicas del NDR. En su estudio encontraron disminución significativa de la función de los autoreceptores 5-HT_{1A}, sin embargo, no se encontró cambio en la expresión del ARNm que codifica para el receptor 5-HT_{1A} pero sí, disminución de la expresión del ARNm que codifica para canales de potasio rectificadores entrantes tipo 2 (GIRK2), lo que podría explicar la disminución de la función de dichos receptores. Adicionalmente, Leitch y col. (2003) en un estudio de microdiálisis, llevado a cabo en ratas implantadas, durante 14 días con una cápsula de 75 mg de

corticosterona, observaron disminución de la magnitud del efecto del 8-OH-DPAT (30 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$), indicando que la corticosterona produjo desensibilización funcional de los autorreceptores 5-HT_{1A}.

De manera contraria, en el estudio de Judge y col. (2004), llevado a cabo en rebanadas de cerebro de ratas adrenalectomizadas e implantadas con una cápsula de 2 mg o 70 mg de corticosterona, se encontró que la magnitud del efecto de la 5-HT (10-50 μM) sobre la frecuencia de disparo de neuronas serotoninérgicas del NDR, fue significativamente mayor en los animales implantados con la dosis alta de corticosterona que en los expuestos a la dosis baja; los autores atribuyen tal resultado a un incremento de la activación funcional de los autorreceptores 5-HT_{1A}, causado por la corticosterona. La discrepancia entre estos estudios puede ser explicada por la duración de la administración de corticosterona y/o las concentraciones alcanzadas en cada caso.

El aumento de la función de los autorreceptores puede ser explicado por aumento de la densidad o afinidad de los mismos o alteración de los elementos intracelulares involucrados en su vía de señalización. Al respecto, si bien existen reportes controversiales, se ha reportado que la administración de corticosterona a ratas adrenalectomizadas, incrementa fuertemente la afinidad de los receptores 5HT_{1A} en el NDR (Bellido y col., 2004). Adicionalmente, en neuronas de hipocampo, se ha comprobado que los glucocorticoides alteran la estructura de los canales de K⁺ activados por la estimulación de los receptores 5-HT_{1A} (GIRK₁ y GIRK₂), aumentando de manera selectiva la expresión de las subunidades 1 y 2 de estos canales (Muma y Beck, 1999).

2.9 LOS GLUCOCORTICOIDES Y LOS RECEPTORES NICOTÍNICOS

Los glucocorticoides afectan el estado de ánimo y las actividades intelectuales; un mecanismo probable de estas acciones es por interacción con los receptores nicotínicos. En este sentido se ha encontrado que los esteroides inhiben los nAChRs musculares (Gillo y col., 1984; Bouzat y Barantes, 1996) y neuronales (Valera y col., 1992; Uki y col., 1999; Paradiso y col., 2000). Específicamente la administración crónica de glucocorticoides induce disminución del número de receptores nicotínicos neuronales tipo α_7 , aunque no se ha identificado alteración significativa del número de receptores $\alpha_4\beta_2$ (Pauly y col., 1990).

Además, en el estudio de Shi y col. (2002), la administración aguda de corticosterona a células tipo PC12 produjo un efecto inhibitorio rápido, reversible, sobre la

amplitud de la corriente entrante inducida por la acetilcolina, sin afectar la desensibilización del receptor nicotínico involucrado en la generación de esta corriente.

2.10 EL SISTEMA SEROTONINÉRGICO Y LA DEPRESIÓN

De acuerdo con múltiples estudios biológicos y clínicos la fisiopatología de la depresión está estrechamente asociada con alteración del funcionamiento de los sistemas serotoninérgico, noradrenérgico y dopaminérgico cerebrales (teoría monoaminérgica de la depresión) (Blier y Montigny, 1994; Heninger y col., 1996). Más recientemente se han reconocido diversas alteraciones del circuito de recompensa, relacionadas con esta enfermedad, que involucran al sistema serotoninérgico (Russo y Nestler, 2013) y se ha avanzado en el estudio a nivel de redes neuronales (Hamilton y col., 2013) reconociendo la participación del sistema serotoninérgico en esta enfermedad.

Diversas áreas cerebrales, que se consideran implicadas en la depresión, tales como el hipocampo, septum, corteza frontal, área ventral tegmental, núcleo *accumbens* y la amígdala, tienen como principal fuente de 5-HT neuronas del NDR. Actuando sobre diversos tipos de receptores, la 5-HT ejerce efectos complejos sobre dichas áreas (Frazer y Hensler, 1999). En las neuronas piramidales corticales, por ejemplo, ejerce efectos inhibidores directos, mediados por receptores 5-HT_{1A} y efectos inhibidores indirectos mediados por receptores 5-HT_{2A} y GABA, además ejerce efectos excitadores directos mediados por el receptor 5-HT_{2A}; sin embargo, a pesar de la elevada densidad de receptores 5-HT_{2A} en estas células, los efectos dominantes son inhibidores (Celada y col., 2004).

El receptor 5-HT_{1A} ha sido ampliamente involucrado en la fisiopatología de la depresión (Bhagwagar y col., 2002). Este tipo de receptor, además de ubicarse en alta densidad en el NDR, se expresa de manera abundante en áreas límbicas, como el hipocampo y el hipotálamo (Verge y col., 1986), donde tiene una ubicación postsináptica.

Entre las alteraciones del sistema serotoninérgico, relacionadas con la depresión, han sido identificadas las siguientes: disminución del número de receptores 5-HT_{1A} en el hipocampo de víctimas suicidas (Cheetham y col., 1990), disminución del ARNm del receptor 5-HT_{1A} en el hipocampo de pacientes con depresión mayor (López-Figueroa y col., 2004), disminución (Drevets y col., 1999; Sargent y col., 2000) y aumento (Parsey y col., 2010) de la potencia de unión al receptor 5-HT_{1A} en el NDR, aumento de los niveles

cerebrales del receptor 5-HT_{2A} y de su ARNm, en víctimas suicidas adolescentes (Pandey y col., 2002).

La mayoría de los fármacos antidepresivos actuales actúan incrementando el nivel extracelular de 5-HT en diversas áreas cerebrales, ya sea a través de inhibir su recaptura (inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina [ISRS]) (Vaswani y col., 2003), inhibiendo su recaptura y la de noradrenalina o inhibiendo su degradación enzimática (inhibidores de la monoaminooxidasa) (Lum y Stahl, 2012). Algunos más ejercen sus acciones bloqueando receptores serotoninérgicos tales como el receptor 5-HT_{2A} (Celada y col., 2004).

De relevante importancia es el hecho de que los efectos clínicos de los fármacos antidepresivos se manifiestan sólo después de un tiempo prolongado de administración, lo cual indica que el incremento del nivel extracelular de serotonina o noradrenalina *per se* no es el responsable directo de las acciones clínicas de estos fármacos, sino, que dichas acciones dependen de cambios neurobiológicos adaptativos secundarios a la activación de los blancos farmacológicos iniciales. En este sentido se ha identificado que el tratamiento antidepresivo prolongado provoca cambios presinápticos en las neuronas serotoninérgicas y postsinápticos en neuronas de áreas corticolímbicas, los cuales incluyen alteraciones en la sensibilidad y expresión génica, de diversos tipos de receptores serotoninérgicos (Celada y col., 2004; Nestler y col., 2002).

El cambio presináptico más relevante, que resulta del tratamiento antidepresivo prolongado, es la desensibilización de los autorreceptores somatodendríticos 5-HT_{1A} de las neuronas serotoninérgicas del NDR. Como se ha indicado previamente, la estimulación de estos receptores provoca disminución de la frecuencia de disparo de dichas neuronas y por consiguiente, disminución de la liberación de serotonina. Por lo que la desensibilización de tales receptores reduce el efecto inhibitorio de la serotonina a nivel del NDR y genera que el incremento del nivel extracelular de serotonina en áreas corticolímbicas sea mayor, después del tratamiento antidepresivo prolongado, que con la administración única de los fármacos (Bel y Artigas, 1993; Blier y de Montigny, 1994).

Considerando la premisa anterior, se ha propuesto que los antagonistas de los receptores 5-HT_{1A} podrían acelerar e incrementar los efectos clínicos de los fármacos antidepresivos (Artigas, 1993). Esta hipótesis ha sido abordada utilizando pindolol, antagonista de los receptores 5-HT_{1A} y de los receptores β-adrenérgicos, habiéndose encontrado que la adición de este compuesto al tratamiento con ISRS, efectivamente

acelera las respuestas antidepresivas (Artigas y col., 1994; Artigas y col., 2001; Rasanen y col., 1999).

Entre los cambios postsinápticos que resultan del tratamiento antidepresivo y que pueden subyacer a sus acciones clínicas, están la alteración de la sensibilidad y disponibilidad, de distintos receptores serotoninérgicos, a través de regulación a la baja y a la alta. Además se ha observado alteración de la expresión génica de diversos factores neurotróficos, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el cual ha recibido la mayor atención. Al respecto se ha encontrado que la administración crónica de prácticamente todas las clases de tratamientos antidepresivos aumenta la expresión de BDNF en el hipocampo de roedores (Nibuya y col., 1995) y humanos (Chen y col., 2001). Es posible que tales efectos dependan, al menos en parte, de la 5-HT, ya que varios de sus receptores están acoplados a la vía de señalización del AMPc, de la que depende la expresión del BDNF (Duman, 1998).

En conclusión la terapia antidepresiva es fundamental para restablecer los niveles extracelulares normales de serotonina, la sensibilidad de los receptores serotoninérgicos, así como, la expresión de diversos factores neurotróficos; condiciones necesarias para el adecuado funcionamiento de diversos circuitos neuronales, lo cual lleva al alivio de los síntomas de la depresión.

2.11 LOS GLUCOCORTICOIDES Y LA DEPRESIÓN

La depresión se asocia con aumento de la secreción de glucocorticoides (Weber y col., 2000; Wong y col., 2000). Los pacientes con depresión mayor tienen niveles elevados del cortisol plasmático, probablemente debido a alteraciones del control por retroalimentación negativa en los distintos niveles del eje hipotalámico-hipofisario-adrenocortical (Holsboer y col., 1995). Se ha demostrado que la liberación de cortisol se encuentra aumentada en pacientes deprimidos, especialmente en la tarde y sólo marginalmente en la mañana, lo que da como resultado la aparición de una curva plana de la liberación diaria de esta hormona (Deuschle y col., 1997; Wong y col., 2000). La hipótesis de participación de la elevación plasmática de cortisol en la patogénesis de la depresión, recibe soporte de estudios clínicos que indican una gran incidencia de este padecimiento en pacientes con síndrome de Cushing (Cohen, 1980; Kelly y col., 1983), en los cuales, el tratamiento del desorden endocrino primario, resuelve los síntomas de depresión (Cohen, 1980; Kelly y col., 1983, Sonino y Fava, 2001).

Otro elemento que da soporte a la relación entre los glucocorticoides y la depresión, es que la exposición a ciertos paradigmas experimentales de estrés crónico, induce en los animales alteraciones que se consideran equiparables a las de los pacientes deprimidos. El uso de este tipo de paradigmas ha permitido el desarrollo de modelos animales de depresión (Willner, 1995 y 1997), los cuales han sido validados y ampliamente utilizados en el estudio de este padecimiento. Más recientemente ha sido creado un modelo de depresión en roedores basado en la exposición crónica a corticosterona (Gourley y Taylor, 2009), en el cual se han encontrado alteraciones conductuales y moleculares características de la depresión, mismas que han sido revertidas con el tratamiento antidepresivo crónico.

2.12 LA NICOTINA Y LA DEPRESIÓN

Múltiples estudios avalan que la nicotina puede ejercer efectos antidepresivos. En estudios clínicos se ha observado mayor incidencia y prevalencia de fumadores entre las personas con depresión que en la población en general (Flanagan y Maany, 1982; Hughes y col., 1986; Glassman y col., 1990). Además, las personas con historia clínica de depresión tienen una mayor dificultad para dejar de fumar e incremento en la probabilidad de recaída y en el riesgo de sufrir estados de depresión, durante el tratamiento para dejar de fumar (Covey y col., 1990; Glassman y col., 1990). Estos datos apoyan la hipótesis de que el hábito de fumar es un acto de automedicación en personas con depresión mayor.

Datos clínicos y experimentales dan soporte al potencial terapéutico antidepresivo atribuido a la nicotina. Por ejemplo, se ha observado que la administración de este compuesto, mediante parches transdérmicos, ejerce acciones antidepresivas en individuos no fumadores (Salín-Pascual y col., 1995; Salín-Pascual y Drucker-Colín, 1998). Asimismo, la infusión constante de nicotina a ratas experimentales atenúa el comportamiento de desesperanza aprendida, característico de este modelo de depresión (Semba, 1998), mientras que la nicotina potencia los efectos antidepresivos del citalopram (Andreasen y Redrobe, 2009).

No obstante, se ha sugerido que las acciones antidepresivas de la nicotina en fumadores y en individuos con parches de nicotina, pueden ser debidas, además de su acción agonista, a la desensibilización de larga duración de los nAChRs o a su antagonismo funcional, provocados por la exposición crónica a la nicotina (Picciotto y Mineur, 2013, para revisión). Inclusive se ha reportado que el uso regular de tabaco precipita síntomas

depresivos (Boden y col., 2010); lo cual convierte la clásica relación unidireccional entre el hábito de fumar y la depresión, en una relación bidireccional.

Las áreas cerebrales de participación de la nicotina en la depresión pueden ser múltiples, toda vez que los receptores nicotínicos cerebrales participan en diversas funciones superiores, como la atención, memoria y cognición, procesos que se encuentran alterados en individuos con este padecimiento. Además, estos receptores cumplen un importante papel en la regulación de la liberación de diversos neurotransmisores en múltiples áreas del cerebro donde se ubican, sobre todo, a nivel presináptico, en las terminales axónicas (Vizi y Lendvai, 1999).

En modelos experimentales, el efecto antidepresivo de la nicotina se asocia con aumento de la liberación de 5-HT (Vázquez-Palacios y col., 2005), noradrenalina (Mitchell, 1993; Benwell y Balfour, 1997) y dopamina, en varias áreas del cerebro, como el hipocampo (Czubak y col., 2010) y el núcleo *accumbens* (Fowler y col., 2008, para revisión). Al respecto, uno de los posibles mecanismos involucrados es la estimulación colinérgica nicotínica de las neuronas serotoninérgicas del NDR, que da por resultado incremento de la liberación de 5-HT en áreas de proyección, como la corteza cerebral. Además, la nicotina puede estimular neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral lo que resulta en aumento de la liberación de dopamina en el núcleo *accumbens* (Pidoplichko y col., 1997), principal centro de recompensa implicado en la depresión (Nestler y Carlezon, Jr., 2005, Russo y Nestler, 2013).

Adicionalmente, se han atribuido a la nicotina modificaciones en la expresión de los receptores serotoninérgicos. Así, se ha reportado que la administración aguda de nicotina incrementa significativamente los niveles del RNAm del receptor 5-HT_{1A} en las regiones CA3 y CA1 del hipocampo dorsal (Kenny y col., 2001); mientras que cambios equiparables han sido encontrados en cerebros de fumadores (Benwell y col., 1990).

Debido, entre otras razones, a las acciones antidepresivas atribuidas a la nicotina, el interés por el estudio de su potencial terapéutico ha crecido considerablemente, habiendo surgido la necesidad apremiante de generar nuevos agonistas, con mayor selectividad para receptores nicotínicos específicos, que puedan ser utilizados clínicamente (Vázquez-Palacios y Bonilla-Jaime, 2004).

Los antecedentes expuestos enfatizan la necesidad de profundizar en el conocimiento de las relaciones existentes entre el sistema serotoninérgico, los receptores nicotínicos y las alteraciones del nivel plasmático de glucocorticoides, a fin de acrecentar

los conocimientos sobre la fisiología de estos intrincados sistemas, así como, disponer de más elementos que contribuyan a la comprensión de la depresión, entidad de relevante interés médico y social. En este sentido, el presente trabajo tiene la finalidad de determinar si el aplanamiento e incremento moderado, de los niveles plasmáticos de glucocorticoides, como el observado en pacientes deprimidos, modifica los efectos ejercidos por la nicotina sobre las neuronas serotoninérgicas del NDR.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuál es la influencia del aplanamiento de los niveles plasmáticos de los glucocorticoides sobre la excitabilidad de las neuronas serotoninérgicas del NDR?

¿Cuál es la influencia del aplanamiento de los niveles plasmáticos de los glucocorticoides sobre los efectos de la nicotina en las neuronas serotoninérgicas del NDR?

4. HIPÓTESIS

La exposición crónica a concentraciones constantes de glucocorticoides altera la función de los autorreceptores 5HT_{1A} de las neuronas serotoninérgicas del NDR, lo que provoca disminución de su excitabilidad y reducción de la acción excitadora de la nicotina sobre éstas.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar las propiedades eléctricas fundamentales de las neuronas serotoninérgicas del NDR de animales control con las de animales expuestos crónicamente a niveles plasmáticos aplanados de corticosterona.
- Comparar los efectos de la nicotina sobre las neuronas serotoninérgicas del NDR de animales control con las de animales expuestos crónicamente a niveles plasmáticos aplanados de corticosterona.
- Determinar los tipos de receptores nicotínicos y serotoninérgicos involucrados en los efectos de la nicotina sobre las neuronas serotoninérgicas del NDR de los animales crónicamente expuestos a niveles plasmáticos aplanados de corticosterona.
- Determinar mediante inmunohistoquímica la naturaleza serotoninérgica de las neuronas cuya actividad sea registrada.

6. METODOLOGÍA

6.1 Grupos experimentales

Los experimentos fueron llevados a cabo en ratas Wistar macho, jóvenes de 1.5 meses de edad, divididas en tres grupos experimentales:

- Primer grupo (control): constituido por ratas sin ninguna manipulación quirúrgica u hormonal.
- Segundo grupo (control *sham*): constituido por ratas sometidas al mismo protocolo quirúrgico que las ratas implantadas con corticosterona pero sin adrenalectomía y con colocación subcutánea de una cápsula de 100mg de colesterol.
- Tercer grupo (Adx+CSR): constituido por ratas adrenalectomizadas e implantadas con una cápsula de 75 mg de corticosterona y 25 mg de colesterol.

6.2 Elaboración de las cápsulas de corticosterona y colesterol

Para la elaboración de las cápsulas los compuestos fueron pesados y colocados en un molde de aluminio donde fueron fundidos mediante exposición a calor.

6.3 Procedimiento quirúrgico y colocación de cápsulas

Para la realización de la adrenalectomía bilateral, las ratas fueron anestesiadas con hidrato de cloral (400 mg/Kg.). Se realizó una incisión en la piel del dorso, sobre la línea media, a partir de la última vértebra torácica; se incidieron los músculos laterales del dorso, se localizó la glándula adrenal en el polo craneal del riñón y se procedió a su extracción. Se suturaron los músculos y se procedió a la extracción de la glándula del lado opuesto. Antes de suturar la piel se colocó la cápsula de corticosterona subcutáneamente, en la región posterior del dorso.

En el caso de los animales control *sham* el procedimiento quirúrgico fue similar salvo que no se extrajeron las glándulas adrenales y la cápsula contuvo solamente colesterol.

A partir del día de la cirugía a las ratas del grupo Adx+CSR se suministró, tanto agua de bebida corriente como, solución de cloruro de sodio al 0.9%; mientras que las ratas control y control *sham* recibieron solamente agua de bebida corriente. El alimento fue ofrecido *ad libitum* en todos los casos.

Las ratas fueron sacrificadas, para la obtención de rebanadas de cerebro y muestras de sangre, 14 días después de la cirugía.

6.4 Registro del peso corporal

En las ratas control *sham* y Adx+CSR el peso corporal fue registrado diariamente a partir del día de cirugía y durante los 14 días posteriores. Durante el mismo periodo se registró el peso diario de animales control sin manipulación quirúrgica ni hormonal.

6.5 Medición de los niveles plasmáticos de corticosterona

Se obtuvieron muestras de sangre del tronco de animales de los grupos control y control-*sham* a las 7 h de la mañana y 7 h de la tarde y a las 8 h de la mañana de animales del grupo Adx+CSR. Se obtuvo el suero mediante centrifugación y se mantuvo en congelación a -20°C hasta la medición de la corticosterona.

La medición de los niveles séricos de corticosterona se realizó mediante la prueba de Radioinmunoanálisis (RIA) utilizando un equipo comercial (“Coat-a-Count”, *Diagnostic Products Corporation*, Los Ángeles, CA, USA).

6.6 Obtención de rebanadas de cerebro

Las ratas fueron anestesiadas con hidrato de cloral, vía intraperitoneal, a una dosis de 400 mg/kg. Bajo anestesia las ratas fueron perfundidas, vía cardiaca, con 10 ml de solución extracelular baja en sodio, fría (2-4°C), previamente oxigenada. Los animales fueron decapitados, se extrajo el cerebro y se colocó en solución baja en sodio, fría. Inmediatamente después se obtuvieron rebanadas de 280 µm de grosor del tallo cerebral a nivel del NDR, usando un vibrátomo (Electron Microscopy Science). Las rebanadas fueron colocadas en solución Ringer a temperatura ambiente, donde permanecieron al menos una hora, antes de ser transferidas a la cámara de registro. En todo momento las soluciones fueron burbujeadas con carbógeno (95% O₂, 5% CO₂).

6.7 Soluciones

Solución extracelular baja en sodio (composición en mM): sacarosa 220, KCl 2.5, NaH₂PO₄ 1.25, MgSO₄ 2, CaCl₂ 2, NaHCO₃ 26, d-glucosa 10; pH 7.35. Esta solución tiene una composición similar a la solución Ringer exceptuando el NaCl, que se substituyó por sacarosa con la finalidad de mejorar la supervivencia de las neuronas durante la obtención de las rebanadas.

Solución Ringer (composición en mM): NaCl 124, KCl 2.69, KH₂PO₄ 1.25, MgSO₄ 2, NaHCO₃ 26, CaCl₂ 2, d-glucosa 10; pH 7.35.

6.8 Perfusión de la solución

Para la obtención de los registros las rebanadas fueron transferidas a una cámara de registro donde se mantuvieron perfundidas con solución Ringer burbujeada con carbógeno, a 31°C de temperatura, con un flujo de 5-6 ml/min.

6.9 Estudios electrofisiológicos

Se realizaron registros electrofisiológicos en fijación de corriente y voltaje en configuración de célula completa. Se utilizaron microelectrodos de borosilicato con una resistencia de 3-8 MΩ y una solución interna con la siguiente composición en mM: gluconato de potasio 140, NaCl 5, MgCl₂ 1, HEPES 10, EGTA 0.02, MgATP 1.97, NaGTP 0.38 y biocitina 2.68; su osmolaridad fue de 285 mOsm y el pH de 7.3.

Las células fueron visualizadas en un monitor mediante el uso de un microscopio de luz infrarroja (Olympus Instr. BWX51) y un objetivo de inmersión en agua (60x). Se utilizó un amplificador MultiClamp 700 A (Axon Instruments) para amplificar y filtrar las señales. Las señales fueron digitalizadas con un equipo Digidata 1322A (Axon Instruments) a una frecuencia de muestreo de 6 KHz y grabadas en una computadora para su posterior análisis, usando el programa Clampex (Axon Instruments).

Se seleccionaron para registro células ubicadas en la línea media del NDR, con características morfológicas y electrofisiológicas propias de neuronas serotoninérgicas: diámetro ente 15 y 35 μm, potenciales de acción con duración mayor a 2 ms (Li y col., 2001), inflexión en la fase descendente, adaptación, patrón de disparo rítmico y de baja frecuencia (Vandermaelen y Aghajanian, 1983) y frecuencia de disparo máxima de 16 Hz producida por un estímulo despolarizante de 175 pA.

En fijación de voltaje, a un potencial de mantenimiento de -65 o -70 mV, se realizaron registros continuos y registros con aplicación de rampas y comandos de voltaje.

En fijación de corriente se realizaron registros continuos y registros con aplicación de pulsos de corriente, a un potencial de membrana de -70 mV. En algunos experimentos, durante los registros continuos, se aplicó un pulso intermitente de corriente hiperpolarizante (-50 pA) para la valoración de los cambios de resistencia de la membrana.

6.9.1 Caracterización de las propiedades electrofisiológicas

Para la obtención de las características del potencial de acción, la célula fue llevada a un potencial de membrana cercano al potencial umbral y se le aplicó un estímulo despolarizante de pequeña intensidad y duración (25 pA y 30 ms, respectivamente) para llevarla al potencial umbral.

La resistencia de la membrana fue obtenida en fijación de voltaje, a un potencial de mantenimiento de -65 mV, con la aplicación de comandos de voltaje de las siguientes características: rango de voltaje entre -125 y -5 mV, 3 seg de duración de cada comando, intervalo entre comandos de 6 s.

6.9.2 Efecto de la nicotina sobre la frecuencia de disparo

El efecto de la nicotina sobre la frecuencia de disparo se estudió en fijación de corriente con registro continuo a nivel del potencial umbral y con la aplicación pulsos de corriente despolarizante con incrementos de 25 pA y una intensidad máxima de 175 pA. La nicotina se administró a una concentración de 1 μ M en la solución de perfusión durante 5 y 8 minutos.

6.9.3 Efecto de la nicotina y la serotonina sobre la corriente de potasio rectificadora entrante

El efecto de la nicotina a una concentración de 1 μ M y de la serotonina a una concentración de 3 μ M, se evaluó en fijación de voltaje mediante la aplicación de comandos de voltaje para la obtención de curvas corriente-voltaje (I-V).

6.10 Drogas

En este estudio se utilizaron nicotina, serotonina y los antagonistas de receptores nicotínicos dihidro- β -eritroidina (DH β E) y metilcaconitina (MLA). Estas drogas fueron disueltas en solución Ringer y administradas mediante perfusión utilizando almacenes adicionales conectados a la línea principal. Los *stocks* de nicotina y serotonina fueron preparados el mismo día de registro.

Todas las drogas utilizadas, además de la biocitina, la corticosterona y el colesterol, fueron adquiridas de Sigma Aldrich RBl.

6.11 Estudio inmunohistoquímico

Con la finalidad de identificar la naturaleza química de las neuronas cuya actividad electrofisiológica fue registrada, las rebanadas fueron procesadas mediante el método inmunohistoquímico de doble marcado. Al término del registro, el electrodo fue retirado cuidadosamente para preservar la neurona y la rebanada fue incluida en una solución fijadora de paraformaldehído al 4% y ácido pícrico al 1%.

Después del periodo de fijación, la rebanada fue incluida en agar para obtener de ella rebanadas de 40 μ m de grosor. Estas rebanadas se expusieron a un conjugado fluorescente de Cy3 y estreptavidina; este último compuesto reacciona con la biotina de la biocitina (incorporada a la neurona cuya actividad fue registrada por haberse encontrado presente en la solución interna de llenado de los electrodos de registro), por lo que su uso permitió identificar, mediante microscopía de fluorescencia, la neurona de la que se obtuvo el registro.

Posteriormente, la rebanada que contenía la neurona de la que se obtuvo el registro fue expuesta a un anticuerpo contra serotonina (anticuerpo primario). Después del periodo de incubación, la rebanada se expuso a un anticuerpo contra el anticuerpo primario (anticuerpo secundario). Este segundo anticuerpo estuvo conjugado al fluoróforo Cy5, por lo que las células emisoras de la fluorescencia correspondiente a éste fueron consideradas positivas a serotonina (5-HT+).

Así, las neuronas de las que se obtuvo registro que emitieron la fluorescencia correspondiente al Cy5 fueron consideradas 5-HT+. Estas neuronas además emitieron la fluorescencia correspondiente al Cy3 por contener la estreptavidina unida a la biocitina presente en ellas.

6.12 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó fuera de línea usando el software Clampfit (Axon Instruments, Union City, CA) y el paquete estadístico y graficador, Origin v. 6. Microcal (Northampton MA and Systat, Richmond CA).

Los resultados se expresan como promedio \pm el error estándar (E.E.). Las pruebas estadísticas utilizadas fueron: ANOVA de dos o tres vías y prueba T de Student. Una $p < 0.05$ fue considerada estadísticamente significativa.

7. RESULTADOS

7.1 Ganancia de peso corporal

El promedio del peso corporal en el día cero (día de realización del procedimiento quirúrgico) fue similar entre los animales de los tres grupos: control: 105 ± 3.25 g (n=10); control *sham*: 103 ± 7.27 g (n=15) y Adx+CSR: 101 ± 1.49 g (n=33). Las curvas de ganancia de peso durante los 14 días posteriores al procedimiento quirúrgico se presentan en la figura 7.1. Después de 14 días, las ratas del grupo control alcanzaron un peso corporal de 178.6 ± 5.45 g, el cual fue similar al alcanzado por el grupo control *sham* (179.3 ± 28.5 g), sin embargo, el peso alcanzado en el mismo periodo por las ratas del grupo Adx+CSR fue solamente de 138.07 ± 2.26 g. El análisis estadístico de la ganancia de peso en los tres grupos se realizó mediante la prueba de ANOVA de dos vías de mediciones repetidas, habiéndose encontrado que las curvas de ganancia de peso del grupo control y control *sham* no fueron significativamente diferentes entre sí, pero ambas fueron estadísticamente diferentes de la curva de ganancia de peso del grupo Adx+CSR ($P < 0.001$).

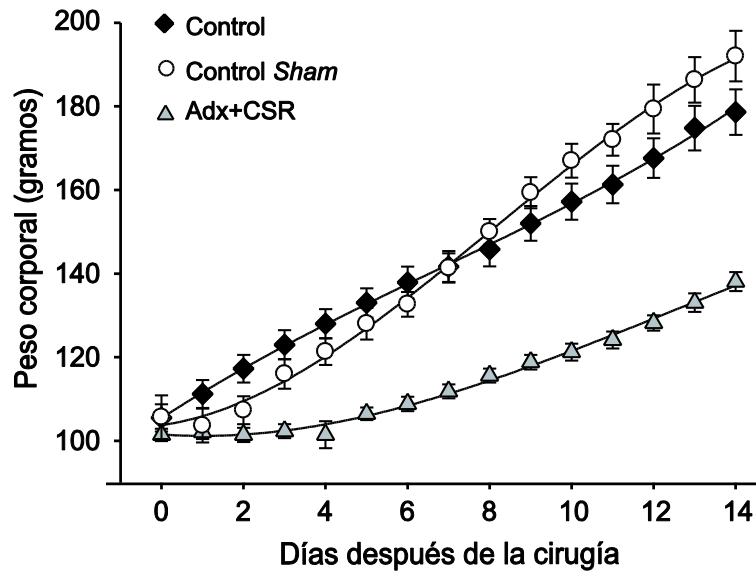


Figura 7.1 Curvas de ganancia de peso de los animales control, control sham y Adx+CSR. Los resultados se presentan como promedio \pm E.E. El día cero de registro corresponde al día de realización del procedimiento quirúrgico. Las curvas muestran que mientras los animales de los grupos control (rombos negros, n=10) y control sham (círculos claros, n=15) alcanzaron un peso similar al día 14, los animales del grupo Adx+CSR (triángulos grises, n=33) tuvieron una ganancia de peso significativamente menor que los controles. El análisis de los datos, mediante la prueba de ANOVA de dos vías de mediciones repetidas, señaló que las curvas de ganancia de peso de los grupos control y control sham no fueron significativamente diferentes entre sí y que la curva de ganancia de peso de las ratas Adx+CSR fue significativamente diferente de las curvas de los grupos control y control sham ($P < 0.001$).

7.2 Niveles plasmáticos de corticosterona

Los niveles plasmáticos de corticosterona fueron medidos 14 días después del procedimiento quirúrgico. Los animales de los grupos control y control *sham* presentaron valores similares por lo que se analizaron en conjunto; en estos animales el valor matutino (muestras obtenidas a las 7 de la mañana) fue de 23.8 ± 8.9 ng/ml ($n=9$) y el valor vespertino (7 de la tarde) fue de 160 ± 2.2 ng/ml ($n=9$) (Fig. 7.2). En los animales del grupo Adx+CSR se obtuvo un valor de 100.2 ± 15.5 ng/ml ($n=9$) en muestras obtenidas durante la mañana.

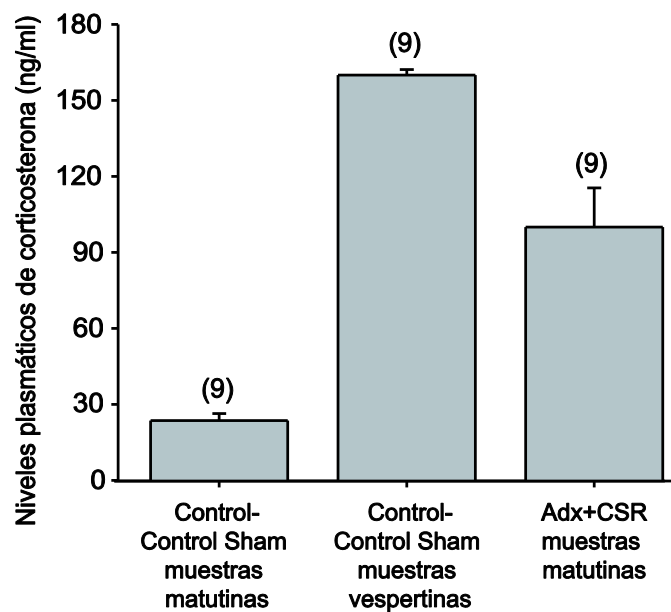


Figura 7.2 Niveles plasmáticos de corticosterona en los animales de los grupos control, control *sham* y Adx+CSR. Los valores en los grupos control y control *sham* fueron similares por lo que se grafican juntos. Valores expresado como promedios \pm el error estándar.

7.3 Características electrofisiológicas de las neuronas 5-HT+ y 5-HT- del NDR identificadas mediante inmunohistoquímica

En el grupo control *sham* las neuronas positivas (5-HT+) y negativas (5-HT-) a serotonina presentaron características similares a las reportadas previamente (Galindo-Charles y col., 2008). Las neuronas 5-HT+ presentaron potenciales de acción de una duración (medida en la base) de 3.34 ± 0.19 ms (n=17, Fig. 7.3 A, trazo superior), la cual fue significativamente mayor que la de las neuronas 5-HT- (1.77 ± 0.07 ms, n=7; Fig. 7.3 B, trazo superior) (prueba T de Student, $P < 0.001$).

El 86% de las neuronas 5-HT+ presentaron una inflexión en la fase de repolarización del potencial de acción (Fig. 7.3 A). Como se muestra en los trazos intermedios de las figura 7.3 A y B, la posthiperpolarización de las neuronas 5-HT+ tuvo una duración significativamente mayor que la exhibida por las neuronas 5-HT-, 150 ± 10.21 ms y 108.45 ± 19.65 ms, respectivamente (prueba T de Student, $P < 0.05$).

Tras la aplicación de un protocolo de pulsos despolarizantes, las neuronas 5-HT+ presentaron un disparo lento y rítmico, cuya frecuencia no excedió de 16 Hz con la aplicación de una corriente despolarizante de 175 pA, mientras que, con esta misma corriente, las neuronas 5-HT- presentaron una frecuencia superior a los 20 Hz (Fig. 7.3 A y B, trazos inferiores).

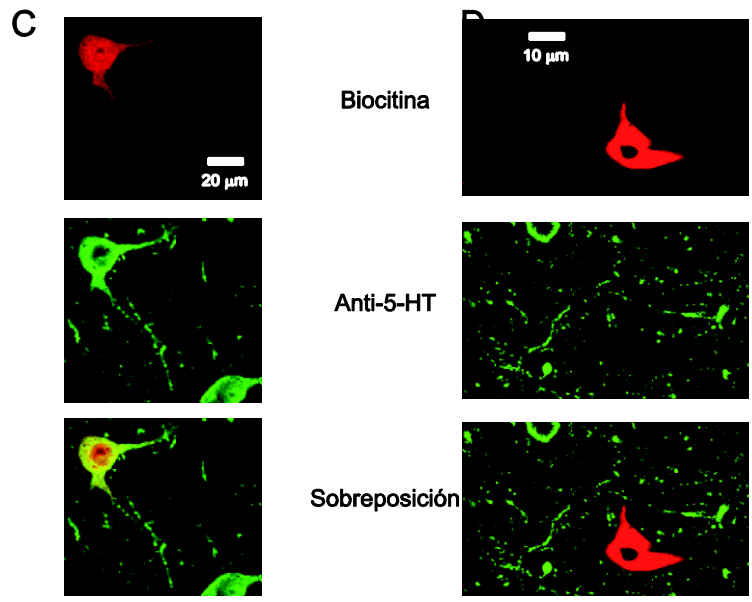
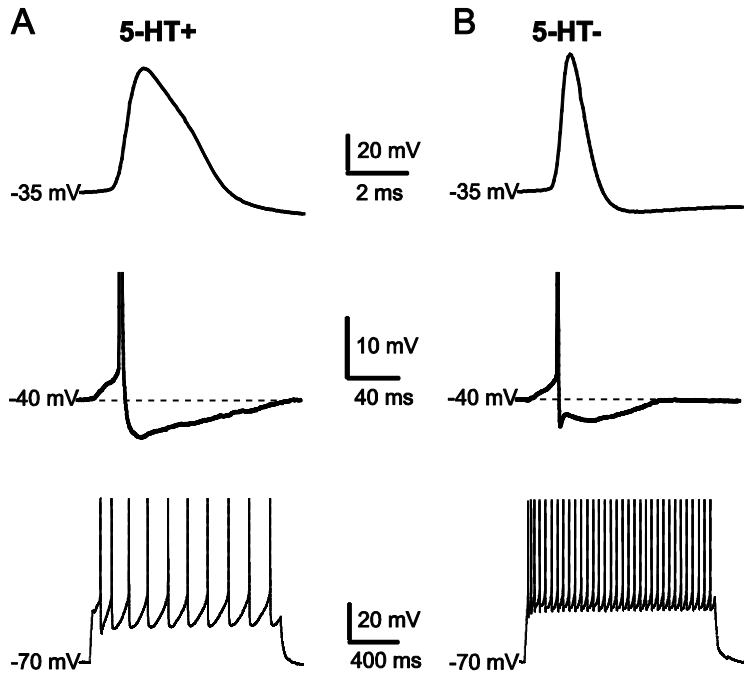
Figura 7.3. Características electrofisiológicas de las neuronas 5-HT+ y 5-HT- del NDR e identificación mediante inmunofluorescencia de doble marcado.

A. Características electrofisiológicas de una neurona 5-HT+; en el trazo superior puede apreciarse la gran duración del potencial de acción (3.5 ms, medida en la base); en el trazo intermedio se muestra la posthiperpolarización, que en esta célula tuvo una duración de 129 ms, mientras que en el trazo inferior puede apreciarse la relativa baja frecuencia de disparo (7 Hz) obtenida con la aplicación de una corriente despolarizante de 175 pA.

B. Se muestran las características electrofisiológicas de una neurona 5-HT-, en el trazo superior se aprecia la corta duración del potencial de acción (1.6 ms); en el trazo intermedio se observa la menor duración de la posthiperpolarización (78 ms) en comparación con la neurona 5-HT+, mientras que en el trazo inferior se muestra la alta frecuencia de disparo exhibida tras la aplicación de una corriente despolarizante de 175 pA (21 Hz).

C. Inmunofluorescencia de la neurona 5-HT+ cuya actividad electrofisiológica se presenta en la sección A de esta figura; en la imagen superior se muestra la fluorescencia correspondiente al Cy3 unido a la biocitina, lo que indica que la neurona fluorescente es aquella de la que se obtuvo el registro.

La imagen intermedia muestra, en el mismo campo, la fluorescencia correspondiente al Cy5 unido indirectamente a la serotonina, por lo que las células fluorescentes son positivas para 5-HT (5-HT+); en la imagen inferior, la sobreposición de los campos indica que la neurona de la que se obtuvo el registro fue 5-HT+, ya que presentó ambas marcas fluorescentes.



D. Inmunofluorescencia de la neurona 5-HT- cuya actividad electrofisiológica se muestra en la sección B de esta figura; en la imagen superior se observa la neurona registrada ya que exhibe la fluorescencia indicadora de la presencia de biocitina, en la imagen intermedia el mismo campo con la fluorescencia indicadora de la 5-HT donde se aprecia que la neurona registrada no emitió tal fluorescencia, en el trazo inferior la sobreposición de los campos confirma que la neurona registrada fue negativa a 5-HT.

7.4 Características electrofisiológicas de las neuronas 5-HT+ de los grupos control y Adx+CSR

Los valores obtenidos de los parámetros electrofisiológicos en las neuronas serotoninérgicas del NDR, de los grupos control *sham* y Adx+CSR, se presentan en el cuadro 7.1; como puede observarse, la duración del potencial de acción en las neuronas de los animales del grupo Adx+CSR tendió a ser mayor que en los animales control, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Asimismo, la duración de la PHP fue ligeramente superior en el grupo Adx+CSR en comparación con el control, pero esta diferencia tampoco fue estadísticamente significativa. De manera similar, los demás parámetros no resultaron estadísticamente diferentes.

Cuadro 7.1. Valores de parámetros electrofisiológicos de neuronas serotoninérgicas de los grupos control *sham* y AdxCSR. Los resultados se expresan como promedio \pm E.E.

Parámetro	Control (n=17)	AdxCSR (n=20)
Resistencia (M Ω)	418.31 \pm 29.53	414.77 \pm 20.27
Potencial umbral (mV)	-37 \pm 6	-35 \pm 6
Amplitud del potencial de acción (mV)	53 \pm 4	58 \pm 2
Duración del potencial de acción (ms)	3.34 \pm 0.20	3.51 \pm 0.19
Duración 1/2 del potencial de acción (ms)	1.1 \pm 0.04	1.2 \pm 0.07
Amplitud de la posthiperpolarización (mV)	10 \pm 0.9	9.9 \pm 0.7
Duración de la posthiperpolarización (ms)	150.98 \pm 10.21	156.82 \pm 14.56

7.5 Efecto de la nicotina sobre la frecuencia de disparo de las neuronas del grupo control

En animales control *sham* se obtuvieron registros en fijación de corriente, con administración de nicotina en perfusión, a una concentración de $1\mu\text{M}$. La nicotina provocó un incremento significativo de la frecuencia de potenciales de acción (frecuencia de disparo) en el 100% de las neuronas 5-HT+ del NDR (Fig.7.4). La frecuencia de disparo alcanzó valores de 2.2 veces el valor control (de 0.74 ± 0.2 a 1.66 ± 0.18 Hz) y presentó una latencia de 316 ± 65.4 segundos; este efecto persistió aún después de retirar la nicotina, requiriéndose entre 20 y 30 minutos para la recuperación de la frecuencia basal.

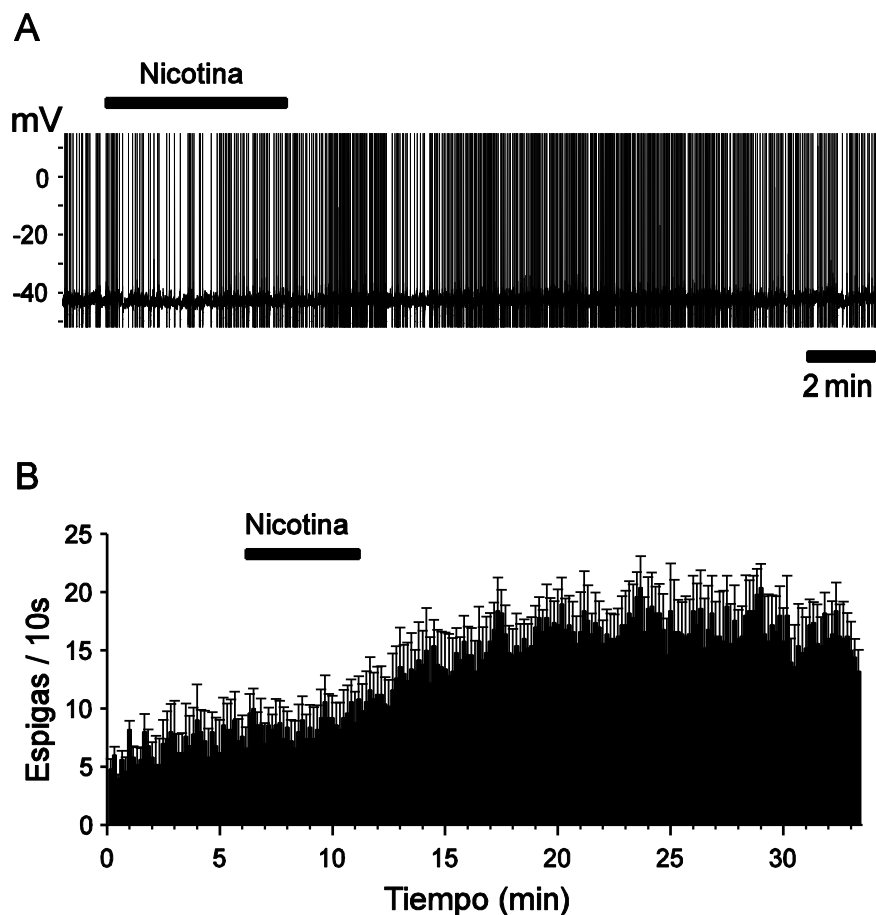


Figura 7.4 Efecto estimulador de la nicotina en neuronas serotoninérgicas del NDR de animales control. **A.** Registro continuo de potenciales de acción en que se observa incremento de la frecuencia de disparo por la administración de nicotina ($1\mu\text{M}$). **B.** Histograma de la frecuencia de disparo donde se aprecia el incremento, de larga duración, ocasionado por la administración de nicotina $1\mu\text{M}$. Los resultados se presentan como promedio \pm E.E (n=15).

El efecto estimulador de la nicotina fue reproducido por una segunda administración de la droga (Fig. 7.5). Tras la segunda administración el aumento de la frecuencia de disparo fue de menor magnitud y duración que con la primera administración.

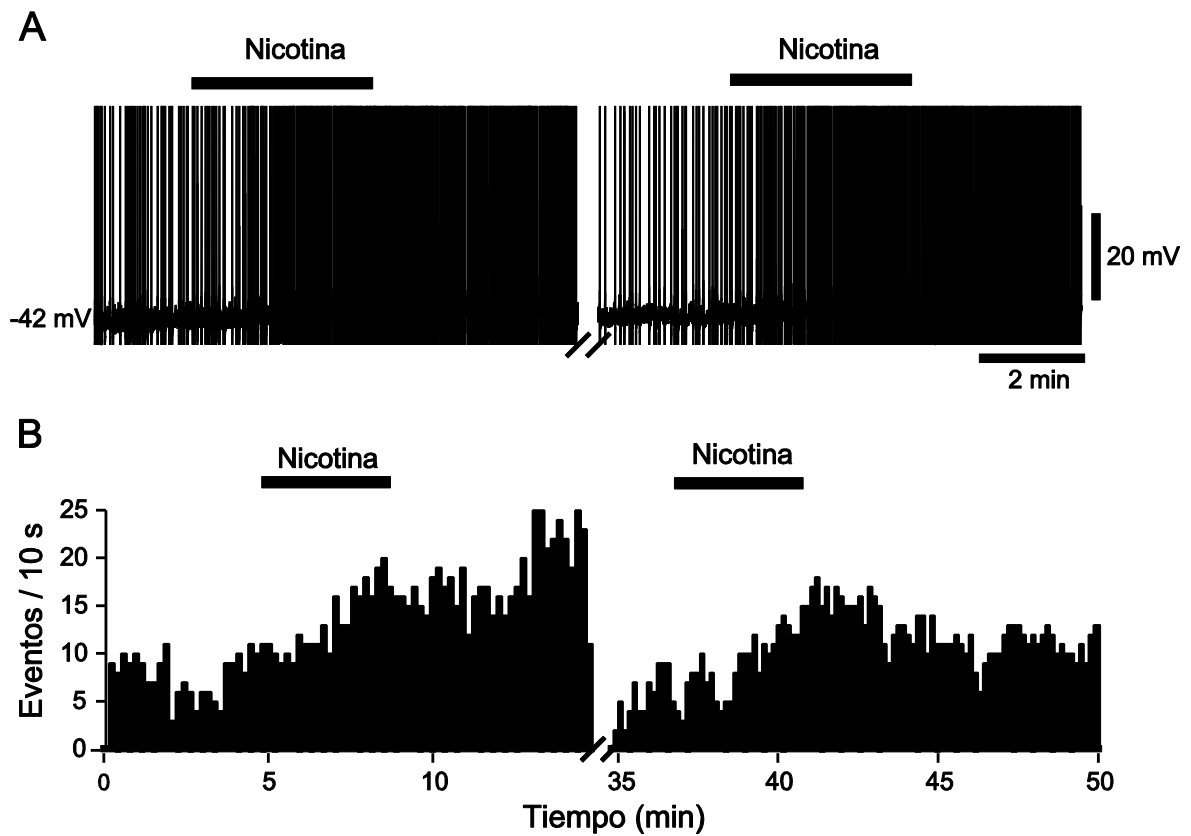


Figura 7.5 Aumento reproducible de la frecuencia de disparo generado por la doble administración de nicotina en una neurona 5-HT+ del NDR. A. Registro continuo de potenciales de acción en el que se observa que una segunda administración de nicotina también generó aumento de la frecuencia de disparo (con fines ilustrativos se eliminó el tiempo de lavado). **B.** Histograma de frecuencia correspondiente a la misma célula.

El efecto estimulador de la nicotina sobre la frecuencia de disparo se observó también en registros obtenidos mediante aplicación de pulsos crecientes de corriente despolarizante. En la figura 7.6 A se muestra un registro representativo y en la sección B de la misma, se presentan las curvas intensidad de corriente-frecuencia de disparo (intensidad-frecuencia) obtenidas en condición control y tras la administración de nicotina $1\mu\text{M}$; donde se observa que la nicotina incrementó la frecuencia de disparo desarrollada con todos los valores de corriente, lo que indujo desviación hacia arriba de la curva intensidad-frecuencia, indicativo del aumento en la excitabilidad de tales células.

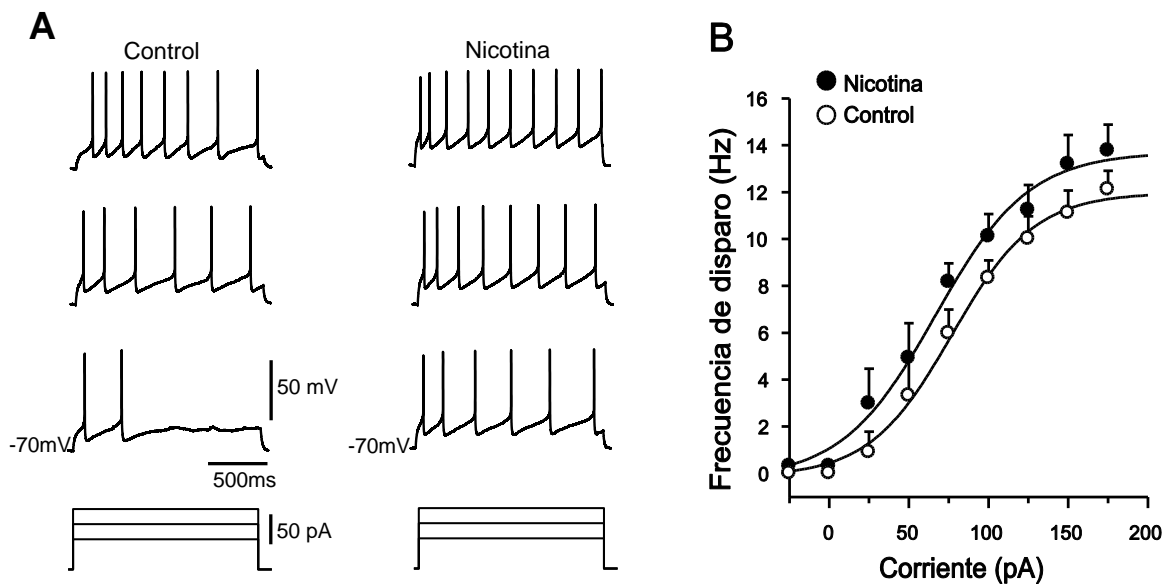


Figura 7.6 Efecto de la nicotina sobre la frecuencia de disparo de una neurona serotonérgica del NDR.
A. Registro de potenciales de acción provocados por la aplicación de pulsos de corriente, antes y a los 5 minutos de administración de nicotina ($1\mu\text{M}$). La administración de nicotina produjo incremento de la frecuencia de disparo en los diferentes niveles de estimulación **B.** Curvas intensidad-frecuencia donde se observa que la administración de nicotina produjo un desplazamiento a la izquierda y hacia arriba de la curva.

7.6 Efecto de la nicotina sobre la frecuencia de disparo de neuronas serotoninérgicas del NDR del grupo Adx+CSR

En registros continuos de neuronas 5-HT+ del grupo Adx+CSR la nicotina disminuyó la frecuencia de disparo (efecto inhibitor) (Fig. 7.7) en 11 de 14 células (78.6 %), en dos células provocó aumento de la frecuencia (14.3 %) y en una de ellas no tuvo efecto sobre la frecuencia de disparo (7.1 %). El efecto inhibitor se manifestó, en algunas células, mediante abolición total del disparo e hiperpolarización durante algunos minutos, mientras que en otras sólo se presentó disminución significativa de la frecuencia de disparo. En la figura 7.8 se comparan gráficamente los efectos de la nicotina en el grupo control y el grupo Adx+CSR.

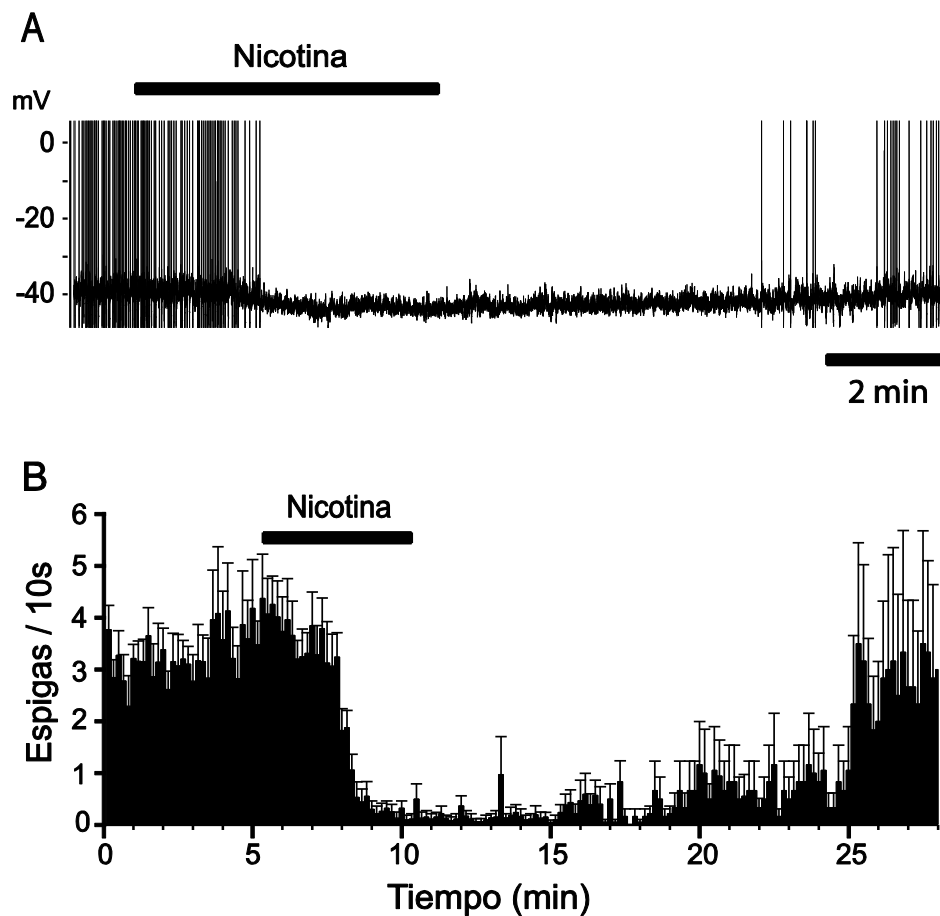


Figura 7.7 Efecto inhibitor de la nicotina en neuronas 5-HT+ del NDR de los animales Adx+CSR. A. Registro continuo de potenciales de acción en que se observa inhibición total del disparo por la administración de nicotina (1 μ M). **B.** Histograma de frecuencia donde se aprecia el efecto inhibitor, de larga duración, ocasionado por la administración de nicotina 1 μ M (n=11).

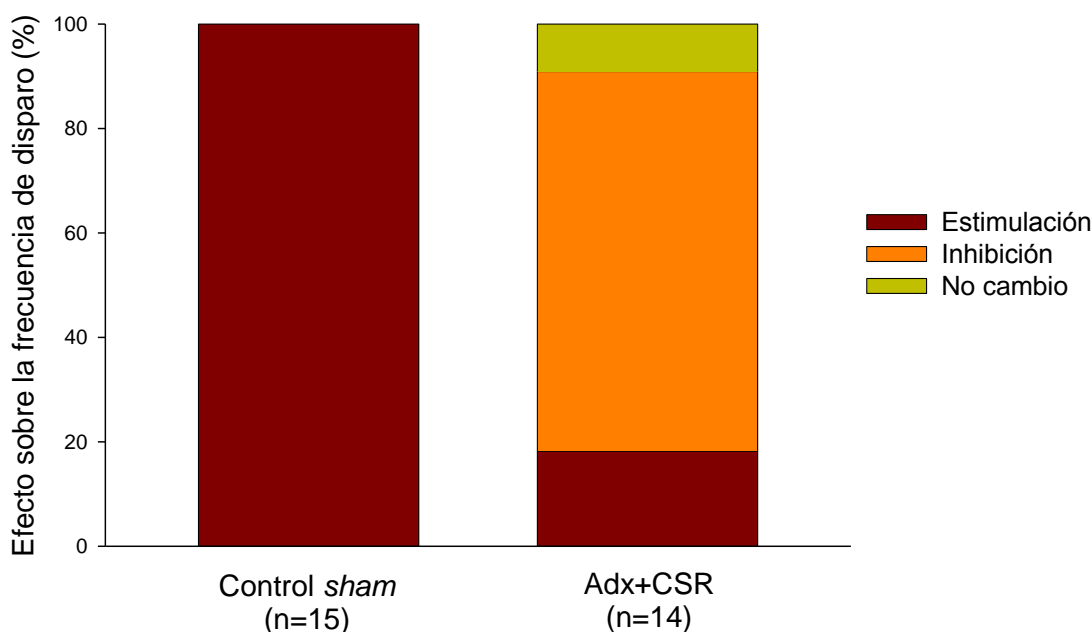


Figura 7.8 Efecto de la nicotina sobre las neuronas serotoninérgicas de los grupos control-*sham* y Adx+CSR. Se observa que en las células del grupo control el efecto fue estimulador en todos los casos, mientras que el efecto dominante (78.6 % de las células) en el grupo Adx+CSR fue inhibitorio.

La disminución de la frecuencia de disparo en estas células fue reproducido por exposiciones repetidas a la nicotina. En la Figura 7.9, se muestra el registro de una célula a la que se administró nicotina 30 minutos después de la primera exposición (con fines ilustrativos se omitió parte del registro), como puede observarse, la segunda administración también generó inhibición del disparo.

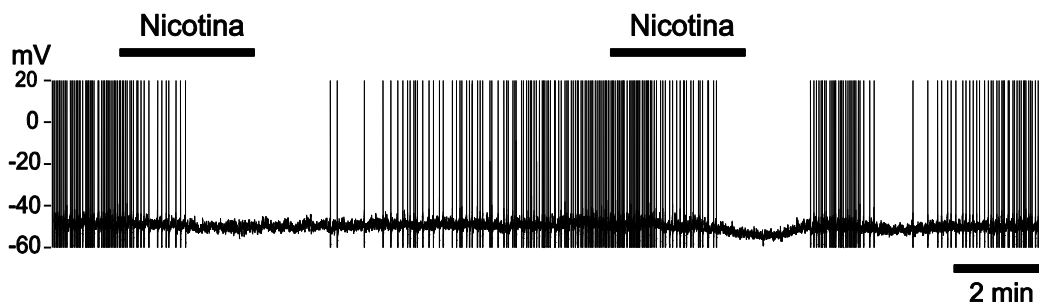


Figura 7.9 Reproducibilidad del efecto inhibitorio de la nicotina sobre la frecuencia de disparo en una neurona 5-HT+ del grupo Adx+CSR. Registro continuo de potenciales de acción en el que se observa que una segunda administración de nicotina también generó inhibición del disparo neuronal (con fines ilustrativos se omitió parte del registro).

El efecto inhibitor predominante de la nicotina sobre la frecuencia de disparo en las neuronas serotoninérgicas del grupo Adx+CSR también se observó en registros con aplicación de pulsos de corriente despolarizante, lo que se aprecia en la figura 7.10 A. Tras la administración de nicotina a una concentración de $1\mu\text{M}$, se presentó disminución significativa del disparo neuronal, con ausencia del mismo a niveles de estimulación en los que previamente se había presentado. Las curvas intensidad-frecuencia correspondientes se presentan en la sección B de esta figura y muestran que la frecuencia desarrollada con la mayor intensidad de corriente fue aproximadamente 50% de la alcanzada antes de la administración de nicotina. Este efecto indujo desviación hacia abajo y a la derecha de la curva intensidad-frecuencia (Fig. 7.10 B).

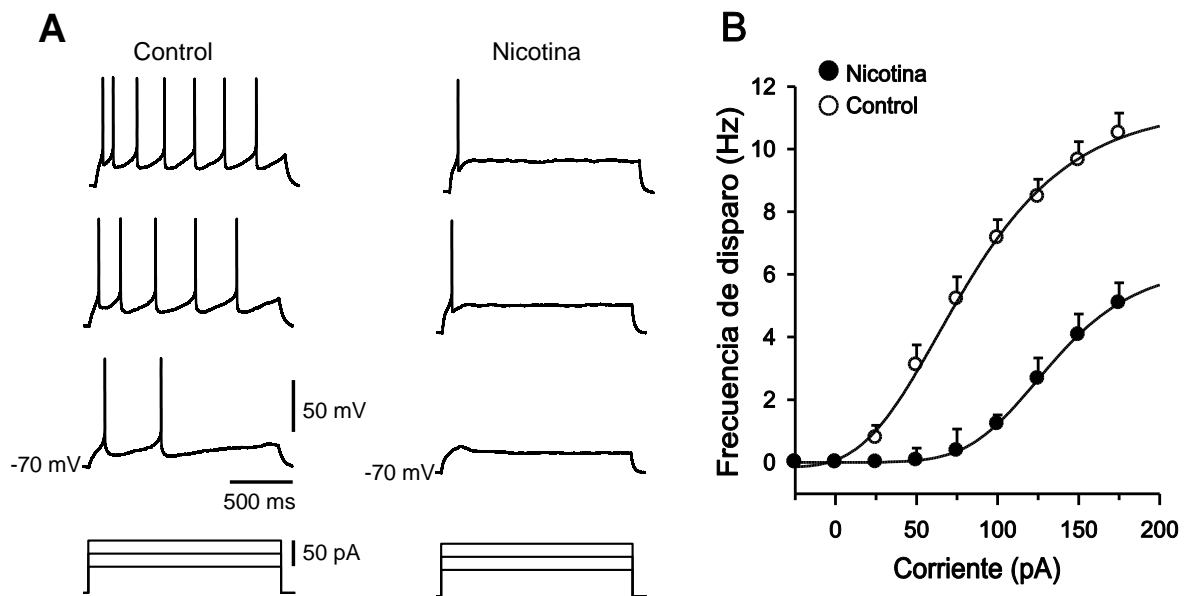


Figura 7.10 Efecto inhibitor de la nicotina sobre la frecuencia de disparo de neuronas 5-HT del NDR del grupo Adx+CSR. A. Registro de potenciales de acción provocados por la aplicación de pulsos de corriente despolarizante creciente a partir de un potencial de -70mV , antes y a los 3 minutos de la administración de nicotina ($1\mu\text{M}$), donde puede apreciarse el efecto inhibitor de la nicotina sobre la frecuencia de disparo. B. Desplazamiento a la derecha y hacia abajo de la curva intensidad-frecuencia causado por la administración de nicotina (resultados presentados como promedio \pm E.E., $n=9$).

7.7 Efecto de la nicotina sobre la corriente rectificadora entrante

En experimentos de fijación de voltaje, con aplicación de comandos de voltaje, se obtuvieron las curvas corriente-voltaje (I-V) generadas por la administración de nicotina en perfusión, a una concentración de $1\mu\text{M}$. En el grupo Adx+CSR la nicotina produjo una corriente rectificadora entrante significativamente mayor que en el grupo control (Fig. 7.11).

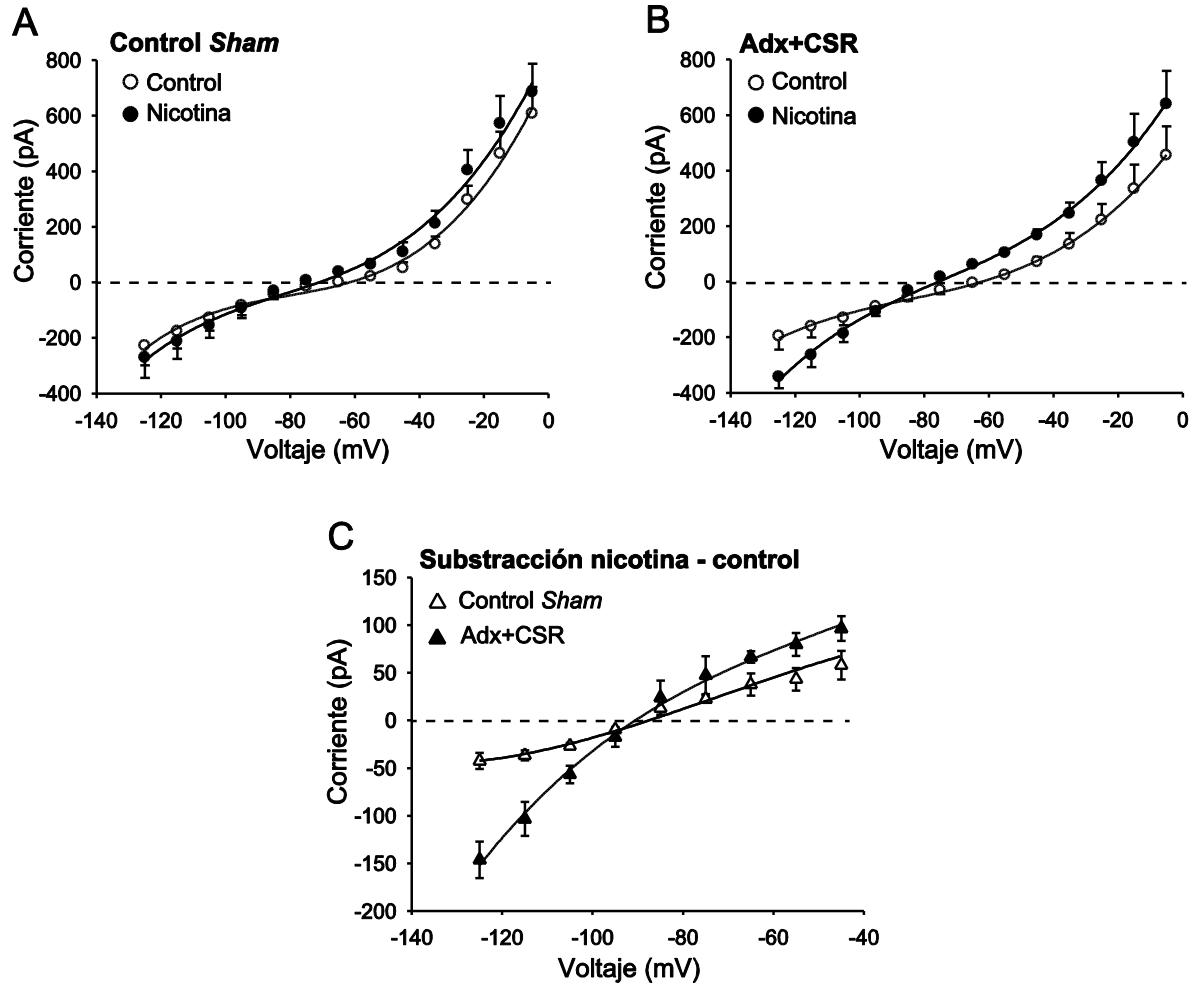


Figura 7.11 Curvas I-V obtenidas en neuronas 5-HT+ del NDR del grupo control-*sham* y Adx+CSR. En las neuronas del grupo Adx+CSR (B) la nicotina indujo una corriente rectificadora entrante mayor que en el grupo control *sham* (A). En C se presentan las curvas resultantes de la resta de la corriente control a la corriente generada por la nicotina en los dos grupos, donde se observa la mayor corriente rectificadora entrante ocasionada por la administración de nicotina en el grupo Adx+CSR. Los resultados se presentan como promedio \pm E.E. (n=5).

7.8 Participación de los receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} en el efecto de la nicotina sobre la frecuencia de disparo

Teniendo en cuenta que el efecto inhibitor de la nicotina sobre neuronas presuntamente serotoninérgicas del NDR depende de la liberación de serotonina al interior de este núcleo (Li y col., 1998; Mihailescu y col., 1998), se procedió a evaluar farmacológicamente la participación de la 5-HT y de los autorreceptores 5-HT_{1A}, en el efecto de la nicotina en ambos grupos de estudio.

En el grupo control *sham*, el bloqueo selectivo de los receptores 5-HT_{1A}, con WAY 100635 (25 nM), incremento la frecuencia de disparo en un 20% del valor control (de 0.76 ± 0.14 Hz a 0.91 ± 0.06 , $n=6$) de las neuronas 5-HT+. La posterior administración de nicotina (1 μ M) junto con el WAY 100635, incrementó la frecuencia de disparo a 3.87 ± 0.25 Hz, un valor de 5.1 veces la frecuencia control (Fig. 7.12). En comparación, la frecuencia de disparo generada por la nicotina, en ausencia de WAY100635, fue solamente de 2.2 veces la frecuencia control (Fig. 7.4 B).

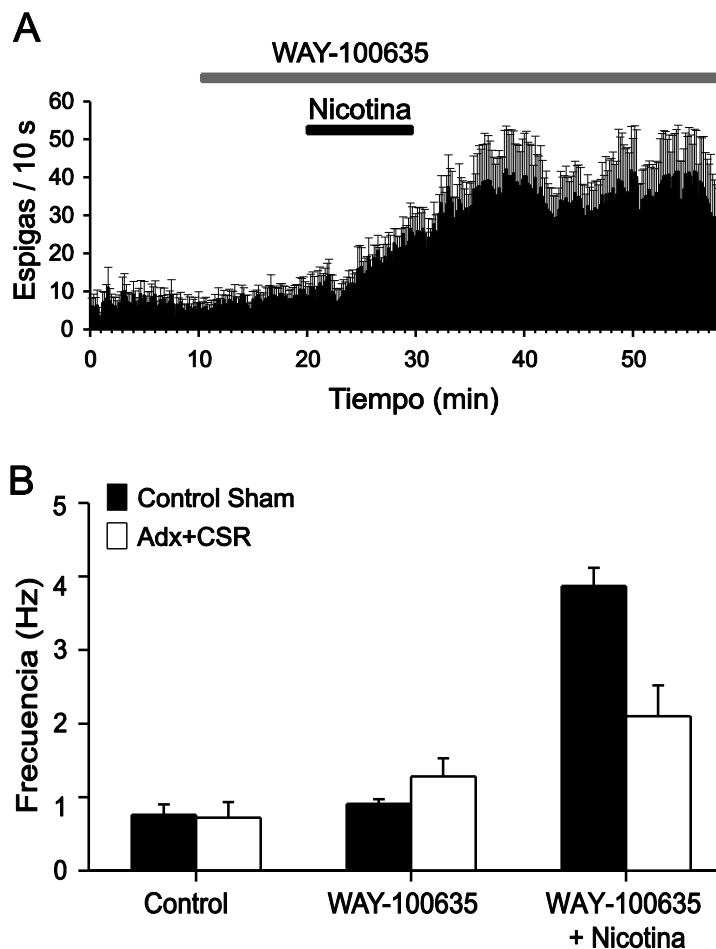


Figura 7.12 Efecto estimulador del WAY 100635 y de la nicotina en neuronas 5-HT+ del NDR en animales control *sham*. **A.** Histograma de frecuencia donde se aprecia ligero incremento de la frecuencia de disparo tras la administración de WAY 100635 (25nM) y un aumento adicional, de gran magnitud y larga duración, tras la administración de nicotina 1 μ M. Los resultados se presentan como promedio \pm E.E. ($n=6$). **B.** Comparativo de los cambios de la frecuencia de disparo de las neuronas 5-HT+ del NDR observados tras la administración de WAY 100635 (25nM) y tras la adición de nicotina (1 μ M) en los grupos control-*sham* y Adx+CSR.

En las neuronas del grupo de animales Adx+CSR, el WAY100635 (25 nM) indujo un incremento de 1.77 veces en la frecuencia de disparo de las neuronas 5-HT+ del NDR (de 0.72 ± 0.21 a 1.28 ± 0.25 , $n=6$; Fig. 7.12 B y 7.13 B). De manera opuesta a lo observado en ausencia del WAY 100635, condición en la que el efecto predominante de la nicotina fue inhibitorio (Fig. 7.13 A), la administración de nicotina ($1 \mu\text{M}$), en presencia de este antagonista indujo, en todas las neuronas estudiadas, incremento de la frecuencia de disparo (Fig. 7.13 A y B), habiéndose alcanzado valores de 2.1 ± 0.42 Hz, 2.91 veces el valor control (Fig. 7.12 B).

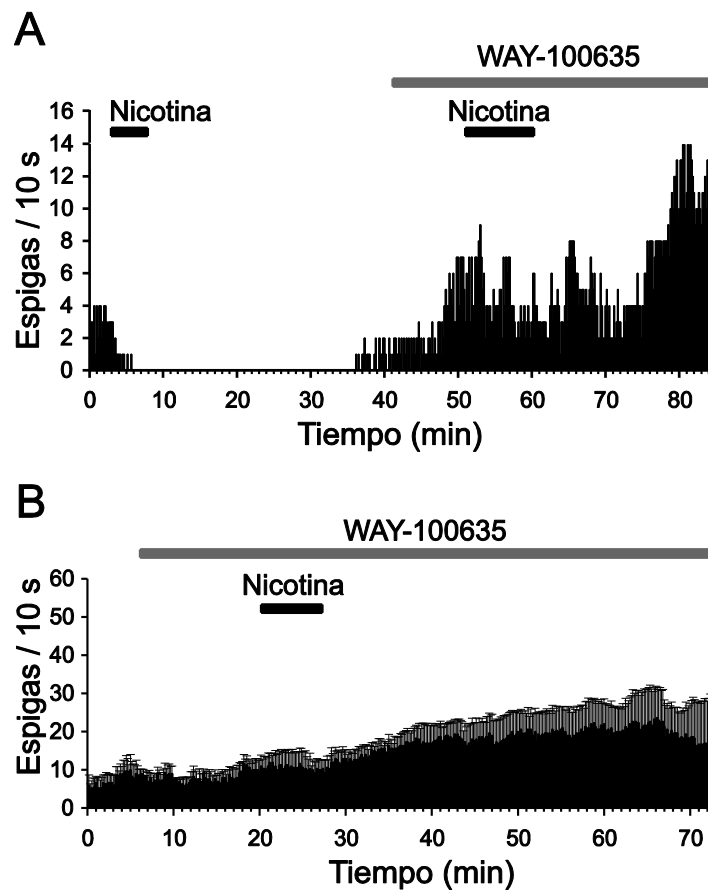


Figura 7.13 Efecto del antagonista selectivo de los receptores 5-HT_{1A}, WAY 100635, sobre la respuesta inhibitoria a la nicotina de las neuronas 5-HT+ del NDR en animales del grupo Adx+CSR. **A.** Histograma de frecuencia donde se aprecia inhibición completa del disparo neuronal tras la primera administración de nicotina ($1 \mu\text{M}$). Una vez recuperado el disparo, la administración de WAY 100635 (25nM) indujo incremento de la frecuencia de disparo; la adición de nicotina en esta condición ocasionó un pequeño efecto inhibitorio seguido por un aumento significativo de la frecuencia de disparo. **B** Histograma de frecuencia donde se observa incremento ligero de la frecuencia de disparo por administración de WAY 100635 (25nM) y el aumento adicional, de larga duración, generado por la adición subsequente de nicotina ($1 \mu\text{M}$). Los resultados se presentan como promedio \pm E.E. ($n=6$).

El análisis estadístico de tales resultados, realizado mediante la prueba ANOVA de dos vías de medidas repetidas, arrojó que: en ambos grupos, el incremento de la frecuencia de disparo causado por el WAY100635 y por la nicotina en asociación con WAY100635, fue estadísticamente significativo y que el incremento inducido por la nicotina en asociación con WAY100635, fue significativamente más alto en el grupo control que en el grupo Adx+CSR.

Resultados similares se obtuvieron en experimentos con aplicación de pulsos de corriente. En ambos grupos, el WAY 100635 (25 nM) incrementó la frecuencia de disparo por pulso despolarizante (Fig. 7.14 A y B). Esto resultó en desplazamiento a la izquierda y elevación de la curva intensidad-frecuencia. En presencia de este antagonista, la administración de nicotina (1 μ M), indujo un desplazamiento adicional y una mayor elevación de la curva (Fig. 7.14 A y B). El Análisis de varianza de tres vías de las curvas obtenidas, indicó que el incremento causado por la nicotina en asociación con WAY100635 fue estadísticamente significativo en ambos grupos de animales. De manera similar a lo observado en registro continuo, en el grupo control, el incremento de frecuencia provocado por la nicotina fue mayor en presencia de WAY100635 que en ausencia del bloqueo de los receptores 5-HT_{1A} (Fig. 7.6).

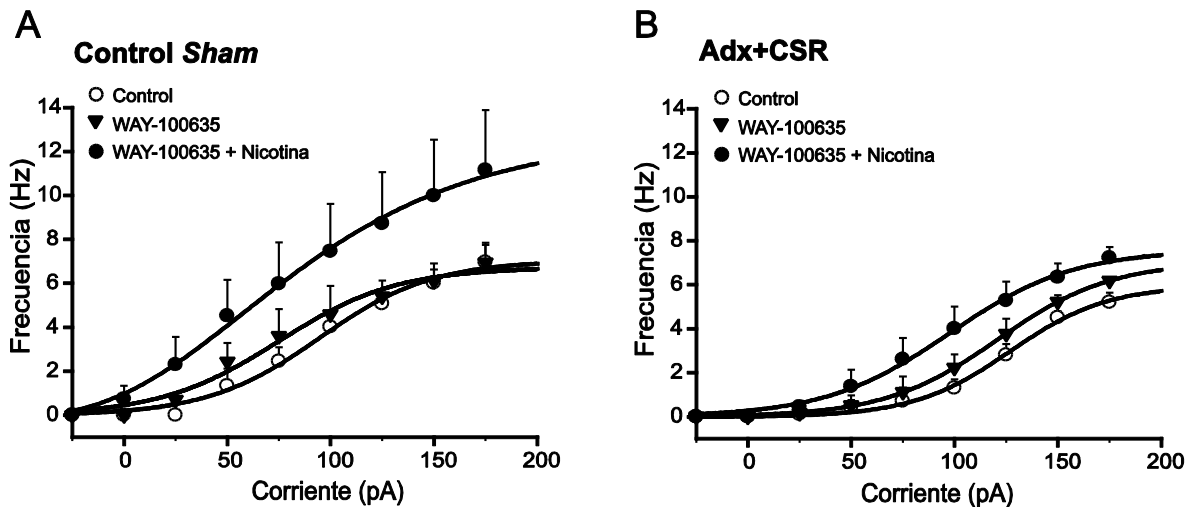


Figura 7.14 Efecto del WAY 100635 y de nicotina en presencia de WAY 100635, sobre la frecuencia de disparo de neuronas 5-HT⁺ del NDR. A. Curvas intensidad-frecuencia obtenidas de células de animales control *sham*, mediante la aplicación de pulsos despolarizantes. **B.** Resultados obtenidos en los animales del grupo Adx+CSR donde se observa que el bloqueo de los receptores 5-HT_{1A} evitó la disminución del disparo causada por la nicotina. Los resultados se presentan como promedio \pm E.E. (n=6).

7.9 Efecto de la serotonina sobre la corriente rectificadora entrante de potasio en neuronas 5-HT+ del NDR de los grupos control sham y Adx+CSR

En experimentos de fijación de voltaje, con aplicación de comandos de voltaje, se obtuvieron las curvas I-V generadas por la administración de 5-HT en perfusión, a una concentración de 3 μ M, en ambos grupos de animales. En las neuronas del grupo Adx+CSR (Fig. 7.15 B, n=5) la 5-HT produjo una corriente rectificadora entrante significativamente mayor que la generada en las neuronas del grupo control sham (Fig. 7.15 A, n=5)). Así, por ejemplo, a un potencial de -125 mV, en el grupo control sham la serotonina generó una corriente de 55.03 ± 17.90 pA (n=5), mientras que en las neuronas del grupo Adx+CSR la corriente generada fue de 149.86 ± 18.48 pA (Fig. 7.15 C, n=5).

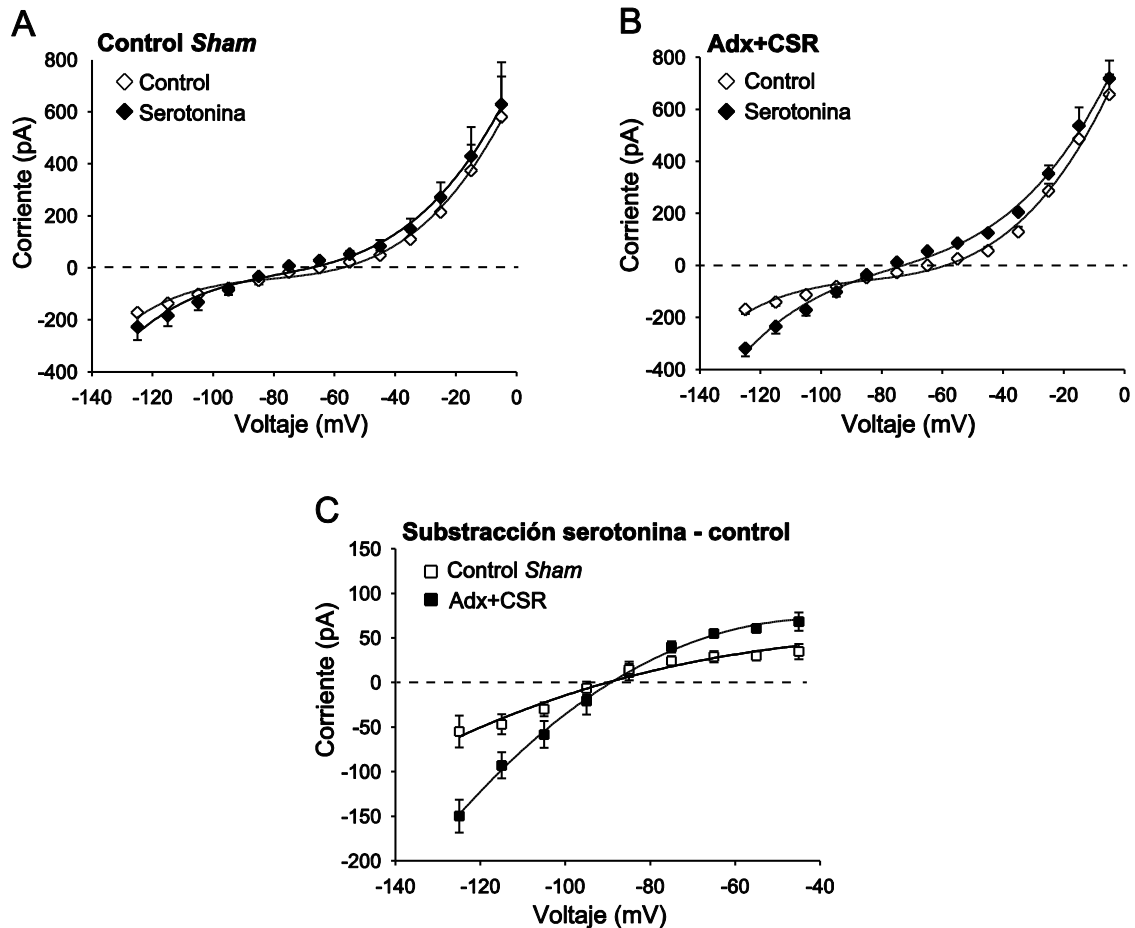


Figura 7.15 Curvas I-V obtenidas por administración de 5-HT a una concentración de 3 μ M en neuronas de los grupos control sham y Adx+CSR. En las neuronas del grupo Adx+CSR (B) la 5-HT indujo una corriente rectificadora entrante significativamente mayor que en el grupo control sham (A). En C se presentan las curvas resultantes de la resta de la corriente control a la corriente generada por la 5-HT en ambos grupos, donde se observa la mayor corriente rectificadora entrante ocasionada por la administración de 5-HT en el grupo Adx+CSR. Los resultados se presentan como promedio \pm E.E. (n=5).

7.10 Participación de los receptores nicotínicos tipo $\alpha 4\beta 2$ en el efecto inhibitor de la nicotina sobre la frecuencia de disparo neuronal

En las neuronas 5-HT+ del NDR del grupo Adx+CSR, la administración de DH β E (1 μ M) redujo el efecto inhibitor de la nicotina sobre la frecuencia de disparo tanto en amplitud como en duración en el 100% (n=5) de las células estudiadas. Como puede observarse en la figura 7.16, la administración de nicotina en ausencia de DHBE produjo una inhibición completa y prolongada de la frecuencia de disparo. Sin embargo, como se muestra en la sección B de la misma figura, en presencia de DHBE, la inhibición de la frecuencia de disparo fue incompleta y de corta duración. A continuación se presentó un incremento significativo la frecuencia que persistió por varios minutos aún después de retirada la nicotina.

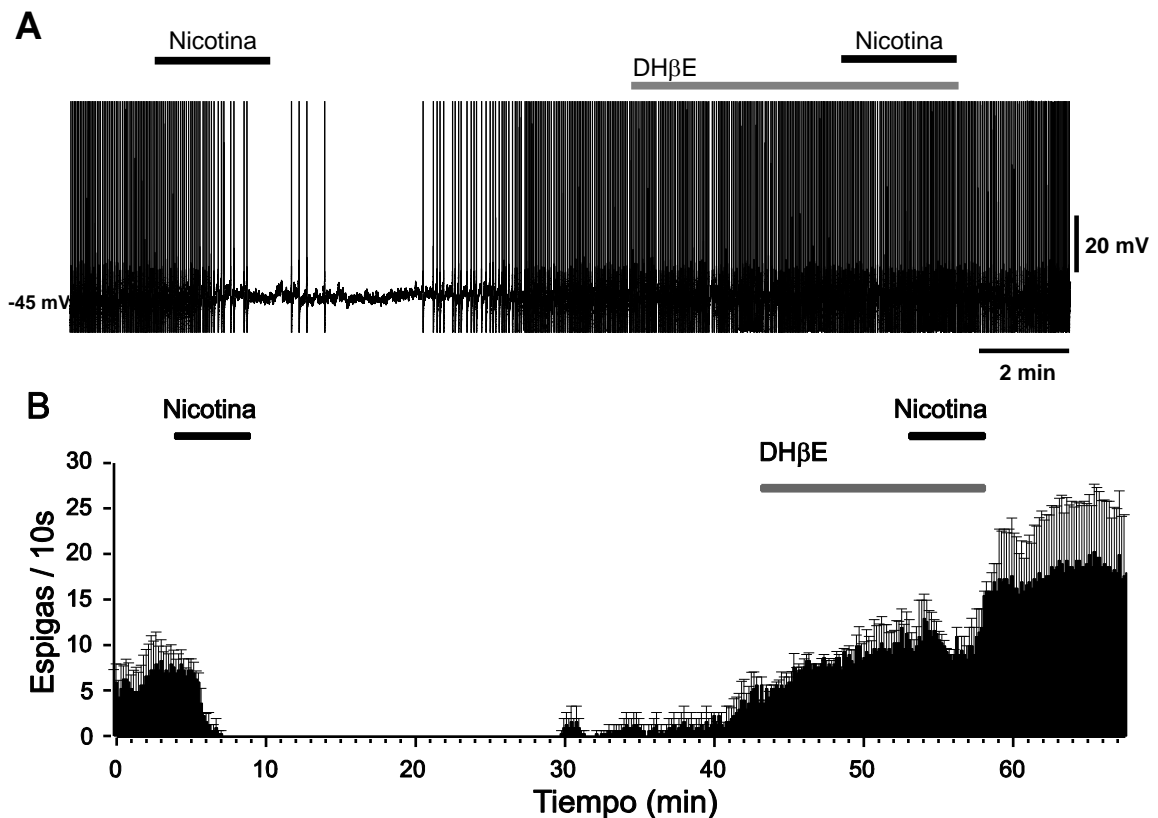


Figura 7.16 Bloqueo del efecto inhibitor de la nicotina, en neuronas 5-HT+ del NDR del grupo Adx+CSR, por la DH β E. En A. se observa la inhibición de la frecuencia de disparo generada por la primera administración de nicotina (1 μ M) y el bloqueo de este efecto por la incubación de la rebanada con DH β E a una concentración de 1 μ M (con fines ilustrativos se omitió parte del tiempo de registro). B. Histograma de la frecuencia de disparo de las neuronas registradas. La inhibición del disparo, completa y duradera (\approx 25 min), observada tras la primera administración de nicotina fue bloqueada por la administración de DH β E; en su lugar se observó una disminución de menor magnitud y breve duración tras la administración de nicotina (1 μ M), seguida de aumento significativo de la frecuencia. Los resultados se presentan como promedio \pm E.E. (n=5)

7.11 Participación de los receptores nicotínicos $\alpha 7$ en el efecto inhibidor de la nicotina sobre la frecuencia de disparo neuronal

La participación de los receptores nicotínicos tipo $\alpha 7$ fue estudiada mediante la administración, en la solución de perfusión, del antagonista selectivo de los receptores nicotínicos $\alpha 7$, metilcaconitina (MLA), a una concentración de 25 nM. Las rebanadas fueron expuestas al antagonista durante 10 minutos previo a la administración de nicotina (1 μ M). En las neuronas 5-HT+ del NDR del grupo Adx+CSR, la administración de MLA no evitó el efecto inhibidor de la nicotina (n=5); lo que indica que este efecto fue independiente de los receptores nicotínicos $\alpha 7$.

8. DISCUSIÓN

8.1 Ganancia de peso corporal

La ganancia de peso en los animales del grupo Adx+CSR fue significativamente inferior que en los grupos control y control *sham*, habiendo sido sólo aproximadamente del 50% de la ganancia presentada por los animales control; así el peso alcanzado por dicho grupo fue de 138.07 ± 2.26 g, mientras que en los grupos control y control *sham* fue de: 178.6 ± 5.45 g y 179.3 ± 28.5 g, respectivamente. Resultados similares fueron reportados por Akana y col. (1985) usando adrenalectomía bilateral y cápsulas con 50 mg de corticosterona. La menor concentración de corticosterona en sus cápsulas resultó en una menor concentración plasmática de la hormona en sus animales (80 ng/ml). Akana y col. también demostraron que los niveles plasmáticos de corticosterona superiores a 75 ng/ml disminuyeron la tasa de ganancia de peso corporal debido a la disminución de la ingestión de alimento, producida por disminución del apetito. Más recientemente Donner y col. (2012) han atribuido la disminución de la tasa de ganancia de peso, inducida por la corticosterona, al incremento del catabolismo de lípidos y proteínas musculares, lo que concuerda con los efectos metabólicos de estas hormonas. Estos datos confirman que nuestros animales del grupo Adx+CSR estuvieron expuestos a una concentración diaria promedio de corticosterona mayor que los animales control, lo cual cumple con una de las características de este modelo de depresión.

8.2 Niveles plasmáticos de corticosterona

Los valores de concentración plasmática de corticosterona en los animales control fueron similares a los reportados por Ishikawa y col. (1995) y son representativos del ciclo circádico de secreción de estas hormonas en roedores, con valores máximos durante la tarde y mínimos en la mañana. En los animales del grupo Adx+CSR la concentración plasmática matutina de corticosterona (100.2 ± 15.5 ng/ml) fue aproximadamente 9% superior al promedio de los valores mínimo y máximo de los animales control (91.9 ng/ml). Aunque en este grupo sólo se midió la concentración de corticosterona en la mañana se infiere que dicha concentración fue similar durante el día, toda vez que, en estos animales, el origen de dicha hormona fue la cápsula subcutánea de corticosterona. Asimismo en los trabajos de Akana y col. (1985) y Leitch y col. (2003), quienes utilizaron una manipulación hormonal similar, se encontraron niveles constantes de esta hormona a

lo largo del día, sin variaciones circádicas, condición reportada como “aplanamiento del nivel plasmático de corticosterona”.

La concentración plasmática de corticosterona en los animales del grupo Adx+CSR, así como la menor tasa de ganancia de peso en ellos, son indicativos de que nuestro modelo experimental reprodujo el perfil moderadamente alto y aplanado de la concentración plasmática de glucocorticoides, condiciones similares a las observadas en pacientes con depresión (Weber y col., 2000).

El uso de animales expuestos a corticosterona como modelos experimentales de depresión, tiene soporte en estudios recientes (Donner y col., 2012, Gourley y Taylor, 2009; Lee y col., 2010) que han demostrado que la administración crónica (entre 2 semanas y un mes) de dosis bajas de corticosterona (5-7 mg/Kg por día), por vía oral en ratas y ratones, produce una condición persistente, de larga duración, similar al estado depresivo, caracterizado por comportamientos similares a los de desesperanza y anhedonia. No obstante que no hay reportes de estudios conductuales en animales expuestos a la corticosterona mediante cápsulas subcutáneas, en el estudio de Leitch y col. (2003), en el que se utilizó este tipo de manipulación, se encontraron efectos similares en las concentraciones plasmáticas de corticosterona, en el ritmo de actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales, ganancia de peso corporal y peso de las glándulas adrenales; a las encontradas en los estudios con administración oral de la corticosterona (Donner y col., 2012, Gourley y Taylor, 2009). Lo que permite considerar que nuestros animales del grupo Adx+CSR pueden representar un modelo animal de depresión.

8.3 La exposición a concentraciones constantes, moderadamente altas de corticosterona, no provocó cambios en las propiedades electrofisiológicas intrínsecas de las neuronas serotoninérgicas del NDR

Los valores de resistencia de la membrana y las características del potencial de acción, encontradas en las células identificadas mediante inmunohistoquímica como serotoninérgicas, se corresponden con aquellas reportadas en otros trabajos (Vandermaelen y Aghajanian, 1983; Beck y col., 2004).

La resistencia de la membrana y diversos parámetros del potencial de acción como son su amplitud y duración, así como la amplitud y duración de la posthiperpolarización, no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo Adx+CSR, lo que indica que la exposición a concentraciones moderadamente altas y constantes de corticosterona no afecta la expresión y funcionalidad de los canales

determinantes de la resistencia de la membrana y del potencial de acción en estas células. Al respecto, en neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo, se ha encontrado que la activación del receptor de glucocorticoides incrementa la transcripción de los genes de los canales de calcio tipo L y P pero no del tipo N (Nair y col., 1998), lo cual induce incremento de la amplitud de las corrientes de calcio inducidas por despolarización y de la activación de los canales de potasio dependientes de calcio; lo que a su vez puede provocar incremento de la amplitud y duración de la posthiperpolarización y disminución de la frecuencia de disparo generada por pulsos de corriente despolarizante (Joels and Kloet, 1989). Sin embargo, en nuestro trabajo no se observaron tales efectos, probablemente porque las neuronas serotoninérgicas del NDR expresan principalmente canales de calcio tipo N y pocos canales tipo L, pero no expresan canales tipo P (Penington y Fox, 1995). Otra posible explicación es que las neuronas serotoninérgicas del NDR liberan continuamente pequeñas cantidades de 5-HT dentro del NDR, lo cual inhibe sus propios canales para calcio mediante la activación de los autorreceptores 5-HT_{1A} (Penington y col., 1991).

8.4 El efecto de la nicotina sobre la frecuencia de disparo de las neuronas 5-HT+ del NDR en animales control fue excitador

De manera similar a lo encontrado previamente por Mihailescu y col. (1998, 2002), la administración de nicotina provocó incremento de larga duración de la frecuencia de potenciales de acción en las neuronas serotoninérgicas del NDR de los animales control. Acciones excitadoras semejantes han sido reportadas por otros autores (Li y col., 1998; Chang y col., 2011). Tales acciones pueden explicarse por un efecto excitador directo de la nicotina, a través de la estimulación de receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ presentes en las neuronas 5-HT+ de este núcleo (Bitner y col., 2000; Bitner y Níkel, 2002; Galindo-Charles y col., 2008) y cuya estimulación aumenta la conductancia para cationes, principalmente calcio (McGehee y Role, 1995; Fuucile, 2004). Sin embargo, la gran duración del efecto estimulador y su persistencia después de retirado el fármaco, indican la posible participación de un efecto indirecto, de facilitación de la liberación de uno o varios neurotransmisores excitadores por la nicotina dentro del NDR. En este sentido Li y col. (1998) demostraron que los efectos estimuladores de la nicotina son mediados, en parte, por la liberación presináptica de noradrenalina. Lo que concuerda con lo reportado por VanderMaelen y Aghajanian (1983) en relación con el aumento de la frecuencia de disparo de las neuronas serotoninérgicas del NDR, generado por los agonistas de receptores $\alpha 1$ adrenérgicos. Adicionalmente, en un estudio reciente de nuestro laboratorio (Garduño y

col., 2012), se comprobó que la estimulación de receptores $\alpha 4\beta 2$ por la nicotina provoca aumento de la frecuencia de corrientes postsinápticas excitatorias en neuronas 5-HT+ del NDR; efecto suprimido por el bloqueo de los receptores glutamatérgicos tipo AMPA-kainato. De tal manera, es factible que el efecto excitador de la nicotina observado en este trabajo se deba tanto a un efecto estimulador directo (postsináptico), como a un efecto presináptico mediado por la liberación de neurotransmisores excitadores como el glutamato y la noradrenalina.

8.5 El efecto de la nicotina en las neuronas 5-HT+ de los animales Adx+CSR fue predominantemente inhibitor

De manera sobresaliente, el efecto dominante de la nicotina sobre la frecuencia de disparo en las neuronas 5-HT+ de los animales expuestos a niveles constantes, moderadamente altos, de corticosterona, fue inhibitor, habiéndose observado no sólo disminución de la frecuencia de disparo, sino, ausencia total del disparo por periodos de hasta media hora. Sin embargo, debido a que los receptores nicotínicos son canales iónicos para cationes, cuya estimulación genera despolarización (Albuquerque y col., 2009), es factible que dicho efecto inhibitor de la nicotina sea indirecto, a través de la estimulación de la secreción de un neurotransmisor con efectos inhibidores sobre las neuronas serotoninérgicas del NDR, como la 5-HT misma. Se ha comprobado que la 5-HT puede ser secretada dentro del NDR desde el soma y las dendritas de las neuronas serotoninérgicas, mediante un mecanismo dependiente de la despolarización celular (Adell y col., 1993). Asimismo diversos estudios confirman que la nicotina incrementa la liberación de 5-HT dentro del NDR (Mihailescu y col., 1998, 2001, 2002). El efecto inhibitor de la serotonina en estas células depende de la participación de los autorreceptores 5-HT_{1A}, cuya estimulación provoca aumento de la conductancia para K⁺ (Penington y col., 1993) y por lo tanto, reducción de la excitabilidad neuronal, que puede manifestarse con disminución o ausencia del disparo neuronal.

Bajo estas consideraciones la prevalencia de efectos inhibidores de la nicotina en los animales Adx+CSR puede ser explicada por una mayor liberación de 5-HT generada por la nicotina en estos animales. Una mayor liberación de 5-HT podría deberse a aumento en la síntesis y almacenamiento de 5-HT, por incremento de la actividad de la hidroxilasa de triptófano, causado por la exposición a corticosterona (Malek y col., 2007; Abumaria y col., 2008; Donner y col., 2012). Asimismo, la prevalencia de efectos inhibidores podría ser debida a una disminución en la recaptura de serotonina, causada por la corticosterona, a

través de la inhibición del transportador de cationes orgánicos 3 (Baganz y col., 2010), el cual se expresa en el NDR (Amphoux y col., 2006).

8.6 La exposición a concentraciones moderadamente altas y constantes de corticosterona indujo incremento de la corriente rectificadora entrante causada por la nicotina

La administración de nicotina provocó una corriente rectificadora entrante que fue considerablemente mayor en los animales expuestos experimentalmente a corticosterona que en los animales control y fue similar a la ocasionada por la 5-HT. Esta corriente puede ser explicada por efecto de la 5-HT secretada en respuesta a la estimulación nicotínica. La 5-HT puede originar dicha corriente en las neuronas serotoninérgicas del NDR, mediante su unión a los autorreceptores 5-HT_{1A}, cuya estimulación favorece la apertura del canal de potasio rectificador entrante dependiente de proteínas G (GIRK) (Aghajanian y Sanders-Bush, 2002). Así, la estimulación de dichos receptores da como resultado reducción de la excitabilidad celular por incremento de la permeabilidad de la membrana al potasio.

A su vez, la mayor corriente rectificadora entrante de potasio, en los animales del grupo Adx+CSR, puede deberse a una mayor liberación de 5-HT resultado de la estimulación nicotínica y explicar la prevalencia del efecto inhibitor de la nicotina sobre la frecuencia de disparo de las neuronas serotoninérgicas del NDR, en este grupo.

8.7 La corriente rectificadora entrante de potasio causada por la serotonina fue mayor en los animales expuestos experimentalmente a la corticosterona

En las neuronas 5-HT⁺ del NDR, la corriente rectificadora entrante de potasio generada por la 5-HT, fue significativamente mayor en los animales del grupo Adx+CSR, que en los animales control. Estos hallazgos indican que la exposición a corticosterona, utilizada en este modelo experimental, incrementa la magnitud del efecto de la 5-HT sobre las neuronas serotoninérgicas del NDR. Lo cual puede deberse a cambios, ocasionados por la corticosterona, en la afinidad o sensibilidad de los autorreceptores 5-HT_{1A}, que dan lugar a un aumento de la función de éstos. El incremento en la expresión de dichos receptores puede ser excluido, toda vez que altos niveles de corticosterona disminuyen (Saenz del Burgo y col., 2013) o no cambian (Fairchild y col., 2003; Neumaier y col., 2000) la expresión del RNAm del autorreceptor 5-HT_{1A}.

8.8 El efecto inhibitor de la nicotina en los animales del grupo Adx+CSR fue mediado por los receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}

En animales control, el incremento de la frecuencia de disparo generado por la nicotina fue significativamente mayor cuando se bloquearon los receptores 5-HT_{1A} que en ausencia de dicho bloqueo. Lo que indica, que en animales control, la nicotina estimula la liberación de 5-HT; como ha sido reportado por otros trabajos (Mihailescu y col., 1998, 2001, 2002). Este fenómeno, permite señalar que la magnitud del efecto estimulador de la nicotina es resultado del balance, entre el aumento de la excitabilidad generado por su acción directa (Galindo-Charles y col., 2008) y la liberación de noradrenalina (Li y col., 1998) y/o glutamato (Garduño y col., 2012) y la disminución de la excitabilidad causada por la 5-HT.

En el grupo de animales expuestos a concentraciones moderadamente altas de corticosterona, el bloqueo de los receptores 5-HT_{1A} evitó la inhibición del disparo neuronal generada por la administración de nicotina, lo que señala que el efecto inhibitor de ésta es fuertemente dependiente de la acción de la 5-HT sobre los autorreceptores 5-HT_{1A}. Asimismo refuerza la idea de que este tipo de exposición a la corticosterona incrementa la función de los autorreceptores 5-HT_{1A}, dando como resultado, prevalencia del efecto inhibitor de la nicotina.

Además en las neuronas del grupo Adx+CSR, previamente expuestas al WAY 100635, el efecto de la nicotina sobre la frecuencia de disparo fue excitador, en lugar de inhibitor, lo que indica que, en ambos grupos de estudio, la nicotina ejerce tanto efectos excitadores como inhibidores, sin embargo, posiblemente por las razones antes expuestas, en el grupo Adx+CSR el efecto predominante es el inhibitor.

No obstante, el efecto excitador de la nicotina en las neuronas del grupo Adx+CSR, en presencia del bloqueador de los receptores 5-HT_{1A}, fue de menor magnitud que el observado en el grupo control; lo que permite suponer que la exposición a la corticosterona utilizada en nuestro modelo, altera además otros elementos celulares o sistemas neuroquímicos, involucrados en la respuesta a la nicotina por parte de las neuronas serotoninérgicas del NDR. Entre ellos, puede considerarse a los mismos receptores nicotínicos; toda vez que se ha encontrado que la exposición aguda a corticosterona induce un efecto inhibitorio rápido sobre la amplitud de la corriente entrante inducida por estimulación de receptores nicotínicos (Shi y col., 2002). Si la exposición a corticosterona, utilizada en nuestro modelo experimental, provoca efectos similares sobre los receptores nicotínicos, la menor magnitud del efecto excitador

observado en el grupo Adx+CSR podría ser explicado, al menos en parte, por tales alteraciones.

Por otra parte, recientemente se ha reportado que los glucocorticoides ejercen una acción postsináptica rápida, no genómica, que favorece la liberación de endocannabinoides, los cuales, actuando de manera retrógrada, disminuyen la transmisión sináptica glutamatérgica sobre las neuronas serotoninérgicas del NDR (Wang y col., 2012); resulta de interés determinar si la exposición crónica a corticosterona también disminuye la transmisión glutamatérgica en estas células, lo que podría contribuir a explicar el menor efecto excitador de la nicotina en las neuronas del grupo Adx+CSR. Asimismo, este hallazgo podría ser explicado por disminución del efecto excitador de la noradrenalina (Judge y col., 2004), toda vez que, como se ha mencionado anteriormente, el efecto estimulador de la nicotina depende parcialmente de la liberación presináptica de noradrenalina dentro del NDR (Li y col., 1998). Otro sistema posiblemente involucrado es el GABAérgico; el cual ejerce efectos inhibitorios sobre las neuronas serotoninérgicas del NDR (Pan y col., 1989; Pan y Williams, 1989; Baraban y Aghajanian, 1980) y es afectado por la nicotina. Al respecto, experimentos en curso en nuestro laboratorio, demuestran que la nicotina aumenta la frecuencia de las corrientes postsinápticas inhibitorias de origen GABAérgico en las neuronas 5-HT+ del NDR. Si la corticosterona afecta la función de este sistema es algo que debe esclarecerse.

8.9 El efecto inhibitor de la nicotina en el grupo Adx+CSR fue mediado por los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$

El bloqueo de los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ evitó el efecto inhibitor de la nicotina en las neuronas serotoninérgicas del NDR del grupo Adx+CSR. Lo cual sugiere que la liberación de 5-HT, dentro del NDR, inducida por la nicotina, es dependiente de la estimulación de los receptores $\alpha 4\beta 2$. Lo que concuerda con reportes que sugieren que la liberación de 5-HT inducida por la nicotina es dependiente de receptores $\alpha 4\beta 2$ (Ma y col., 2005), si bien en este trabajo se encontró también dependencia del receptor nicotínico $\alpha 7$. Sin embargo, Li y col. (1998) encontraron que tal liberación de 5-HT fue dependiente de receptores nicotínicos no $\alpha 7$. Además, en concordancia con nuestros resultados, estudios conductuales indican que el incremento de la liberación de 5-HT por la administración de nicotina dentro del rafe, es bloqueado por el antagonista de los receptores $\alpha 4\beta 2$, D β HE (Seth y col., 2002).

8.10 Incremento de la sensibilidad a la serotonina en animales expuestos a concentraciones moderadamente altas y constantes de corticosterona

En resumen, en este trabajo se observó una mayor sensibilidad a la 5-HT en las neuronas expuestas a niveles aplanados y moderadamente altos de corticosterona; así, la magnitud del efecto hiperpolarizante de la 5-HT fue significativamente mayor en neuronas de los animales del grupo Adx+CSR que en neuronas de animales control. Este hallazgo concuerda con resultados encontrados por Judge y col. (2004), en células serotoninérgicas del NDR y por Mueller y Beck (2000), en células piramidales de la región CA1 del hipocampo.

La mayor sensibilidad a la 5-HT, en los animales Adx+CSR, puede deberse a aumento de la afinidad de los receptores 5-HT_{1A} causado por la exposición a la corticosterona, lo que ha sido reportado por Bellido y col. (2004), quienes encontraron incremento de la afinidad del receptor 5-HT_{1A} por sus agonistas en el NDR, en presencia de altas concentraciones de corticosterona.

Nuestros resultados confirman hallazgos previos que plantean, que la exposición a concentraciones altas de glucocorticoides incrementa la acción inhibitoria de la 5-HT en el NDR, lo que a su vez puede generar disminución del disparo neuronal y de la liberación de 5-HT en áreas de proyección involucradas en la determinación del estado de ánimo, lo que podría contribuir a la manifestación de alteraciones como la depresión.

Adicionalmente nuestros resultados permiten suponer que el incremento de la liberación de 5-HT provocado por la nicotina y la subsecuente sobre estimulación de los receptores 5-HT_{1A}, podría llegar a generar su desensibilización, como la provocada por diversos antidepresivos, lo que derivaría en una mayor liberación de 5-HT en áreas de proyección y ser parte de las acciones antidepresivas atribuidas a la exposición crónica de nicotina, como la acaecida en fumadores. Esta hipótesis podría ser abordada en un modelo animal similar al utilizado en este trabajo, aunado a administración crónica de nicotina.

9. CONCLUSIONES

En las neuronas serotoninérgicas del NDR la exposición crónica a concentraciones constantes, moderadamente altas de corticosterona, favorece las acciones inhibitoras de la nicotina, a través de la liberación de 5-HT dentro del NDR y el incremento de la función de los autorreceptores 5HT_{1A}. Esta acción depende de la participación de los receptores nicotínicos tipo $\alpha 4\beta 2$.

En animales control la nicotina ejerce un efecto estimulador sobre la frecuencia de disparo de las neuronas serotoninérgicas del NDR. Esta acción estimuladora domina sobre la acción inhibitora indirecta que resulta de liberación de 5-HT, dentro del mismo núcleo, estimulada por la nicotina.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Abumaria N, Ribic A, Anacker C, Fuchs E, Flügge G. (2008). Stress upregulates TPH1 but not TPH2 mRNA in the rat dorsal raphe nucleus: identification of two TPH2 mRNA splice variants. *Cell Mol. Neurobiol.* 28(3):331-42.
2. Adcock IM, Caramori G. (2001). Cross-talk between pro-inflammatory transcription factors and glucocorticoids. *Immunol. Cell Biol.* 79: 376-384.
3. Adell, A, Carceller A, Artigas F. (1993). In vivo brain dialysis study of the somatodendritic release of serotonin in the Raphe nuclei of the rat: effects of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin. *J. Neurochem.* 60(5):1673-1681.
4. Aghajanian GK, Haigler HJ, Bloom FE. (1972). Lysergic acid diethylamide and serotonin: direct actions on serotonin-containing neurons in rat brain. *Life Sci.* 11:615-622.
5. Aghajanian GK, Haigler HJ. (1974). L-Tryptophan as a selective histochemical marker for serotonergic neurons in single-cell recording studies. *Brain Res.* 81(2):364-372.
6. Aghajanian GK, Sanders-Bush E. Serotonin. En: Davis KL, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C, editores. *Neuropsychopharmacology – 5th Generation of Progress.* Pennsylvania: Lippincott, Williams and Wilkins, 2002: 15-34.
7. Aghajanian GK, Sprouse JS, Rasmusen K. (1987) Physiology of the midbrain serotonin system. En: De Meltzer HY. *Psychopharmacology, the Third Generation of Progress.* New York: Raven Press, 141-149.
8. Aghajanian GK, VanDerMaelen CP. (1982). Intracellular recordings from serotonergic dorsal raphe neurons: pace-maker potentials and the effect of LSD. *Brain Res.* 238:463-469.
9. Aghajanian GK, Wang RY, Baraban J. (1978). Serotonergic and non-serotonergic neurons of the dorsal raphe: reciprocal changes in firing induced by peripheral nerve stimulation. *Brain Res.* 153:169-175.
10. Akana SF, Cascio CS, Shinsako J, Dallman MF. (1985). Corticosterone: narrow range required for normal body and thymus weight and ACTH. *Am. J. Physiol.* 249(5 Pt 2):R527-R532.
11. Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* 89(1):73-120.
12. Amphoux A, Vialou V, Drescher E, Brüss M, Mannoury La Cour C, Rochat C, Millan MJ, Giros B, Bönisch H, Gautron S. (2006). Differential pharmacological in vitro properties of organic cation transporters and regional distribution in rat brain. *Neuropharmacology.* 50(8):941-952.
13. Andreasen JT, Redrobe JP. (2009). Nicotine, but not mecamylamine, enhances antidepressant-like effects of citalopram and reboxetine in the mouse forced swim and tail suspension tests. *Behav. Brain Res.* 197(1):150-156.
14. Aronsson M, Fuxe K, Dong Y, Agnati LF, Okret S, Gustafsson JA. (1988). Localization of glucocorticoid receptor mRNA in the male rat brain by in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85:9331-9335.
15. Artigas F, Celada P, Laruelle M, Adell A. (2001). How does pindolol improve antidepressant action? *Trends Pharmacol Sci.* 22:224-228.
16. Artigas F, Perez V, Alvarez E. (1994). Pindolol induces a rapid improvement of depressed patients treated with serotonin reuptakeinhibitors. *Arch Gen Psychiatry.* 51:248-251.

17. Artigas F. (1993). 5-HT and antidepressants: new views from microdialysis studies. *Trends Pharmacol Sci.*14:262.
18. 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(3):641-67.
19. Azmitia EC. (1978). The serotonin-producing neurons of the midbrain median and dorsal raphe nuclei. *Handbook of Psychopharmacology.* 9:233-314.
20. Azmitia EC. (1981). Bilateral serotonergic projections to the dorsal hippocampus of the rat: simultaneous localization of 3H-5HT and HRP after retrograde transport. *J. Comp Neurol.* 203(4):737-743.
21. Azmitia EC Jr, McEwen BS. (1974). Adrenalcortical influence on rat brain tryptophan hydroxylase activity. *Brain Res.*78 (2):291-302.
22. Baganz N, Horton R, Martin K, Holmes A, Daws LC. (2010). Repeated swim impairs serotonin clearance via a corticosterone-sensitive mechanism: organic cation transporter 3, the smoking gun. *J. Neurosci.* 30(45):5185-15195.
23. Bamberger C, Schulte H, Chrousos G. (1996). Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr. Rev.* 17:245-61.
24. Baraban JM, Aghajanian GK. (1980). Suppression of firing of 5-HT neurons in the dorsal raphe by alpha-adrenoreceptor antagonists. *Neuropharmacology.* 19:355-363.
25. Baraban JM, Aghajanian GK. (1980). Suppression of serotonergic neuronal **firing** by alpha-adrenoceptor antagonists: evidence against GABA mediation. *Eur J Pharmacol.* 66(4):287-294.
26. Baraban JM, Aghajanian GK. (1980). Suppression of serotonergic neuronal firing by α -adrenoreceptor antagonists, evidence against GABA mediation. *Eur. J. Pharmacol.* 66:287-294.
27. Baraban JM, Wang RY, Aghajanian GK. (1978). Reserpine suppression of dorsal raphe neurons firing: mediation by adrenergic system. *Eur. J. Pharmacol.* 52:27-36.
28. Baumgarten HG, Lachenmayer L. (1972). 5,7-Dihydroxytryptamine: improvement in chemical lesioning of indoleamine neurons in the mammalian brain. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 135:399-414.
29. Beato M, Klug J. (2000). Steroid hormone receptors: an update. *Hum. Reprod. Update.* 6:225-226.
30. Beato M. (1989). Gene regulation by steroid hormones. *Cell.* 56: 335-344.
31. Beck SG, Pan YZ, Akanwa AC, Kirby LG. (2004). Median and dorsal raphe neurons are not electrophysiologically identical. *J. Neurophysiol.* 91(2):994-1005.
32. Bel N, Artigas F. (1993). Chronic treatment with fluvoxamine increases extracellular serotonin in frontal cortex but not in raphe nuclei. *Synapse.* 15:243-245.
33. Belin MF, Nanopoulos D, Didier M, Agüera M, Steinbusch H, Verhofstad A, Maitre M, Pujol JF. (1983). Immunohistochemical Evidence for the Presence of γ -Aminobutyric Acid and Serotonin in One Nerve Cell. A Study on the Raphe Nuclei of the Rat Using Antibodies to Glutamate Decarboxylase and Serotonin. *Brain Res.* 275:329-339.
34. Bellido I, Harnsson AC, Gómez-Luque AJ, Andbjør B, Agnati LF, Fuxe K. (2004). Corticosterone strongly increases the affinity of dorsal raphe 5-HT_{1A} receptors. *Neuroreport.* 15(9):1457-1459.
35. Benwell M, Balfour D, Anderson J. (1988). Evidence that tobacco smoking increases the density of (-)-[³H] nicotine binding sites in human brain. *J. Neurochem.* 50:1243-1247.

36. Benwell M, Balfour D, Anderson J. (1990). Smoking-associated changes in the serotonergic systems of discrete regions of human brain. *Psychopharmacol.* 102:68-72.
37. Benwell M, Balfour D. (1997). Regional variation in the effects of nicotine on catecholamine overflow in the rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* 325:13-20.
38. Berenzon S, Lara MA, Robles R, Medina-Mora ME. (2013). Depression: state of the art and the need for public policy and action plans in Mexico. *Salud Publica Mex.* 55(1):74-80.
39. Berg KA, Harvey JA, Spampinato U, Clarke WP. (2008). Physiological and therapeutic relevance of constitutive activity of 5-HT 2A and 5-HT 2C receptors for the treatment of depression. *Prog. Brain Res.* 172:287-305.
40. Berger M, Gray JA, Roth BL. (2009). The expanded biology of serotonin. *Annu. Rev. Med.* 60: 355-366.
41. Bhagwagar Z, Whale R, Cowen PJ. (2002). State and trait abnormalities in serotonin function in major depression. *Br J Psychiatry.* 180:24-8.
42. Bhalla P, Sharma HS, Wurch T, Pauwels PJ, Saxena PR. (2002). Molecular cloning and expression of the porcine trigeminal ganglion cDNA encoding a 5-HT_{1F} receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 436: 23-33.
43. Bhattacharyya S, Schapira AH, Mikhailidis DP, Davar J. (2009). Drug-induced fibrotic valvular heart disease. *Lancet* 374: 577-585.
44. Bishop C, Tessmer JL, Ullrich T, Rice KC, Walker PD. (2004). Serotonin 5-HT_{2A} receptors underlie increased motor behaviors induced in dopamine-depleted rats by intrastriatal 5-HT_{2A/2C} agonism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310(2):687-694.
45. 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(1):66-74.
46. 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(1-2):45-54.
47. Björklund A, Baumgarten HG, Rensch A. (1975). 5,7-Dihydroxytryptamine: improvement of its selectivity for serotonin neurons in the CNS by pre-treatment with desipramine. *J. Neurochem.* 24:833-835.
48. Blier P, de Montigny C, Chaput Y. (1990). A role for the serotonin system in the mechanism of action of antidepressant treatments: preclinical evidence. *J. Clin. Psychiatry.* 51 Suppl:14-20.
49. Blier P, de Montigny C. (1994). Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacol. Sci.* 15(7):220-6.
50. Blier P, de Montigny C. (1994). Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacol. Sci.* 15(7):220-6.
51. Boadle-Biber MC. (1993). Regulation of serotonin synthesis. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 60: 1-15.
52. Boden JM, Fergusson DM, Horwood LJ. (2010). Cigarette smoking and depression: tests of causal linkages using a longitudinal birth cohort. *Br. J. Psychiatry.* 196(6):440-446.
53. Bohler S, Gay S, Bertrand S, Corringier PJ, Edelstein SJ, Changeux JP, Bertrand D. (2001). Desensitization of neuronal nicotinic acetylcholine receptors conferred by N-terminal segments of the beta 2 subunit. *Biochemistry.* 40(7):2066-2074.
54. Bonaventure P, Nepomuceno D, Kwok A, Chai W, Langlois X, Hen R, Stark K, Carruthers N, Lovenberg TW. (2002). Reconsideration of 5-Hydroxytryptamine (5-HT)₇ Receptor Distribution Using [³H]5-

- Carboxamidotryptamine and [3H]8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetraline: Analysis in Brain of 5-HT1A Knockout and 5-HT1A/1B Double-Knockout Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302(1):240-248.
55. Borman RA, Tilford NS, Harmer DW, Day N, Ellis ES, Sheldrick RL, Carey J, Coleman RA, Baxter GS. (2002). 5-HT(2B) receptors play a key role in mediating the excitatory effects of 5-HT in human colon in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 135: 1144-1151.
 56. Bortolozzi A, Díaz-Mataix L, Scorza MC, Celada P, Artigas F. (2005). The activation of 5-HT receptors in prefrontal cortex enhances dopaminergic activity. *J. Neurochem.* 95: 1597-1607.
 57. Bouzat C, Barrantes FJ. (1996). Modulation of muscle nicotinic acetylcholine receptors by the glucocorticoid hydrocortisone. Possible allosteric mechanism of channel blockade. *J. Biol. Chem.* 271(42):25835-41.
 58. Buhot MC. (1997). Serotonin receptors in cognitive behaviors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7: 243-254.
 59. Buisson B, Bertrand D. (2002). Nicotine addiction: the possible role of functional upregulation. *Trends Pharmacol. Sci. Mar*;23(3):130-6.
 60. Burnet PW, Mefford IN, Smith CC, Gold PW, Sternberg EM. (1992). Hippocampal 8-[3H]hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin binding site densities, serotonin receptor (5-HT1A) messenger ribonucleic acid abundance, and serotonin levels parallel the activity of the hypothalamopituitary-adrenal axis in rat. *J. Neurochem.* 59 (3):1062-70.
 61. Celada P, Puig V, Amargós-Bosch M, Adell A, Artigas F. (2004). The role of the 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in depression. *Rev Psychiatr Neurosci.* 29(4):252-265.
 62. Chang B, Daniele CA, Gallagher K, Madonia M, Mitchum RD, Barrett L, Vezina P, McGehee DS. (2011). Nicotinic excitation of serotonergic projections from dorsal raphe to the nucleus accumbens. *J. Neurophysiol.* 106(2), 801-808.
 63. Changeux JP, Devillers-Thiéry A, Chemouilli P. (1984). Acetylcholine receptor: an allosteric protein. *Science.* 225(4668):1335-45.
 64. Chaouloff F. (1993). Physiopharmacological interactions between stress hormones and central serotonergic systems. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 18(1):1-32.
 65. Chavez-Noriega LE, Gillespie A, Stauderman KA, Crona JH, Claeps BO, Elliott KJ, Reid RT, Rao TS, Velicelebi G, Harpold MM, Johnson EC, Corey-Naeve J. (2000). Characterization of the recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors alpha3beta2 and alpha4beta2 stably expressed in HEK293 cells. *Neuropharmacology.* Oct;39(13):2543-2560.
 66. Cheetham SC, Crompton MR, Katona CLE, Horton RW. (1990). Brain 5HT binding sites in the depressed suicides. *Psychopharmacol (Berl).* 102: 544-548.
 67. Chen YZ, Qiu J. (1999). Pleiotropic signaling pathways in rapid, nongenomic action of glucocorticoid. *Molec. Cell Biol. Res. Commun.* 2: 145-149.
 68. Chen, B, Dowlatshahi D, MacQueen GM, Wang, JF, Young LT. (2001). Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in sub-jects treated with antidepressant medication. *Biol. Psychiatry* 50,260–265.
 69. Clarke WP, Yocca FD, Maayani S. (1996). Lack of 5-hydroxytryptamine1A-mediated inhibition of adenylyl cyclase in dorsal raphe of male and female rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277: 1259-1266.
 70. Classey JD, Bartsch T, Goadsby PJ. (2010). Distribution of 5-HT(1B), 5-HT(1D) and 5-HT(1F) receptor expression in rat trigeminal and dorsal root ganglia neurons: relevance to the selective anti-migraine effect of triptans. *Brain Res.* 1361:76-85.
 71. Cohen SI. (1980). Cushing's syndrome: a psychiatric study of 29 patients. *Br J Psychiatry.* 136:120-124.

72. Colquhoun D, Ogden DC. (1988). Activation of ion channels in the frog end-plate by high concentrations of acetylcholine. *J Physiol.* 395:131-59.
73. Commons KG. (2008). Alpha4 containing nicotinic receptors are positioned to mediate postsynaptic effects on 5-HT neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuroscience* May 15;153(3):851-9.
74. Corringer PJ, Bertrand S, Bohler S, Edelstein SJ, Changeux JP, Bertrand D. (1998). Critical elements determining diversity in agonist binding and desensitization of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurosci.* Jan 15;18(2):648-657.
75. Covey LS, Glassman AH, Stetner F. (1990). Depression and depressive symptoms in smoking cessation. *Comp Psychiatry.* 31:350-354.
76. Cox DA, Cohen ML. (1995). 5-hydroxytryptamine 2B receptor signaling in rat stomach fundus: role of voltage-dependent calcium channels, intracellular calcium release and protein kinase C. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272: 143-150.
77. 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(3):263-268.
78. Cucchiario G, Commons KG. (2003). Alpha 4 nicotinic acetylcholine receptor subunit links cholinergic to brainstem monoaminergic neurotransmission. *Synapse.* Sep 1;49(3):195-205.
79. Czubak A, Nowakowska E, Golembiowska K, Kus K, Burda K, Metelska J. (2010). Effect of venlafaxine and nicotine on the level of neurotransmitters and their metabolites in rat brains. *J. Physiol. Pharmacol.* Jun;61(3):339-46.
80. Dahlström A, Fuxe K. (1964). Evidence for the existence of monoamines containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol. Stand. Suppl.* 232:I-55.
81. Dahlstrom A, Fuxe K. (1964). Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia.* 20(7):398-399.
82. Davidson C, Stamford JA. (1995). Evidence that 5-hydroxytryptamine release in rat dorsal raphe nucleus is controlled by 5-HT1A, 5-HT1B and 5-HT1D autoreceptors. *Br. J. Pharmacol.* 114(6):1107-1109.
83. De Deurwaerdere P, Stinus L, Spampinato U. (1998). Opposite change of in vivo dopamine release in the rat nucleus accumbens and striatum that follows electrical stimulation of dorsal raphe nucleus: role of 5-HT3 receptors. *J. Neurosci.* 18(16): 6528-6538.
84. De Kloet ER, Kovács GL, Szabó G, Telegdy G, Bohus B, Versteeg DH. (1982). Decreased serotonin turnover in the dorsal hippocampus of rat brain shortly after adrenalectomy: selective normalization after corticosterone substitution. *Brain Res.* 239(2):659-63.
85. Descarries L, Watkins K, Garcia 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.
86. Deuschle M, Schweiger U, Weber W, Gotthardt U, Korner A, Schmider J. (1997). Diurnal activity and pulsatility of the hypothalamic-pituitary-adrenal system in male depressed patients and healthy controls. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 82:234-238.
87. Dominiak P, Kees F, Grobecker H. (1984). Changes in peripheral and central catecholaminergic and serotonergic neurons of rats after acute and subacute administration of nicotine. *Klin. Wochenschr.* 62 Suppl 2:76-80.

88. Donner NC, Johnson PL, Fitz SD, Kellen KE, Shekhar A, Lowry CA. (2012). Elevated tph2 mRNA expression in a rat model of chronic anxiety. *Depress Anxiety*. 29(4):307-319.
89. Donner NC, Montoya CD, Lukkes JL, Lowry CA. (2012). Chronic non-invasive corticosterone administration abolishes the diurnal pattern of tph2 expression. *Psychoneuroendocrinology*. May;37(5):645-61.
90. Donner NC, Montoya CD, Lukkes JL, Lowry CA. (2012). Chronic non-invasive corticosterone administration abolishes the diurnal pattern of tph2 expression. *Psychoneuroendocrinology*. 37(5):645-661.
91. Drevets WC, Frank E, Price JC, Kupfer DJ, Holt D, Greer PJ, Huang Y, Gautier C, Mathis C. (1999). PET imaging of serotonin 1A receptor binding in depression. *Biol. Psychiatry*. 46(10):1375-1387.
92. Drouin J, Sun YL, Chamberland M, Gauthier Y, De Lean A, Nemer M, Schmidt TJ. (1993). Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene. *EMBO J*. 12:145-156.
93. Duman, RS. (1998). Novel Therapeutic Approaches beyond the Serotonin Receptor. *Biol Psychiatry*. 325:324-335.
94. El Mestikawy S, Fargin A, Raymond JR, Goylan H, Hnatowich M. (1991). The 5-HT_{1A} receptor: an overview of recent advances. *Neurochem. Res*. 16: 1-10.
95. Ellis ES, Byrne C, Murphy OE, Tilford NS, Baxter GS. (1995). Mediation by 5-hydroxytryptamine_{2B} receptors of endothelium-dependent relaxation in rat jugular vein. *Br. J. Pharmacol*. 114: 400-404.
96. Encio IJ, Detera-Wadleigh SD. (1991). The genomic structure of the human glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem*. 266: 7182-7188.
97. Engberg G, Erhardt S, Sharp T, Hajos M. (2000). Nicotine inhibits firing activity of dorsal raphe 5-HT neurones in vivo. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol*. 362(1):41-45.
98. Fairchild G, Leitch MM, Ingram CD. (2003). Acute and chronic effects of corticosterone on 5-HT_{1A} receptor-mediated autoinhibition in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology*. 45(7):925-934.
99. Feng J, Cai X, Zhao J, Yan Z. (2001). Serotonin receptors modulate GABA(A) receptor channels through activation of anchored protein kinase C in prefrontal cortical neurons. *J. Neurosci*. 21: 6502-6511.
100. Fenster CP, Rains MF, Noerager B, Quick MW, Lester RA. (1997). Influence of subunit composition on desensitization of neuronal acetylcholine receptors at low concentrations of nicotine. *J. Neurosci*. Aug 1;17(15):5747-59.
101. Ferrari MD, Färkkilä M, Reuter U, Pilgrim A, Davis C, Krauss M, Diener HC. (2010). Acute treatment of migraine with the selective 5-HT_{1F} receptor agonist lasmiditan- A randomised proof-of-concept trial. *Cephalalgia* Oct;30(10):1170-8.
102. Flanagan J, Maany I. (1982). Smoking and depression. *Am J Psychiatry*. 139(4): 541.
103. Fowler CD, Arends MA, Kenny PJ. (2008). Subtypes of nicotinic acetylcholine receptors in nicotine reward, dependence, and withdrawal: evidence from genetically modified mice. *Behav Pharmacol*. 19(5-6):461-484.
104. Frazer A, Hensler JG. (1999). Serotonin. En: Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W., Fisher, S.K. y Uhler, M.D. eds. *Basic Neurochemistry*. USA:Lippincott-Raven, 263-292.
105. Fucile S. (2004). Ca²⁺ permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium*. 35(1):1-8.
106. Fuller RW. (1992). The involvement of serotonin in regulation of pituitary-adrenocortical function. *Front Neuroendocrinol*. Jul;13(3):250-70.

107. Galindo-Charles L, Hernandez-Lopez S, Galarraga E, Tapia D, Bargas J, Garduño J, Frías-Domínguez C, Drucker-Colin R, Mihailescu S. (2008). Serotonergic dorsal raphe neurons possess functional postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors. *Synapse* 62(8): 601-615.
108. García-Colunga J, Miledi R. (1995). Effects of serotonergic agents on neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* Mar 28;92(7):2919-23.
109. Garduño J, Galindo-Charles L, Jiménez-Rodríguez J, Galarraga E, Tapia D, Mihailescu S, Hernandez-Lopez S. (2012). Presynaptic $\alpha 4\beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptors increase glutamate release and serotonin neuron excitability in the Dorsal Raphe Nucleus. *J. Neurosci.* 32(43): 15148-15157.
110. Gervais J, Rouillard C. (2000). Dorsal raphe stimulation differentially modulates dopaminergic neurons in the ventral tegmental area and substantia nigra. *Synapse.* 35(4):281-291.
111. 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(11): 4217-4225.
112. Gilbert F, Brazeal C, Tricklebank MD, Stah SM. (1988). Activation of the 5-HT_{1A} receptor subtype increases rat plasma ACTH concentrations. *Eur. J. Pharmacol.* 147:431-437.
113. Gillo B, Lass Y. (1984). The mechanism of steroid anaesthetic (alphaxalone) block of acetylcholine-induced ionic currents. *Br J. Pharmacol.* 82(4):783-9.
114. Glassman AH, Helzer JE, Covey LS, Cottler LB, Stetner F, Tipp JE, Johnson J. (1990). Smoking, Smoking Cessation, and Major Depression. *JAMA.* 264:1546-1549.
115. Goodwin GM, Emsley R, Rembry S, Rouillon F; Agomelatine study group. (2009). Agomelatine prevents relapse in patients with major depressive disorder without evidence of a discontinuation syndrome: a 24-week randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J. Clin. Psychiatry.* 70: 1128-1137.
116. Gotti C, Clementi F, Fornari A, Gaimarri A, Guiducci S, Manfredi I, Moretti M, Pedrazzi P, Pucci L, Zoli M. (2009). Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. *Biochem. Pharmacol.* 78(7):703-711.
117. Gourley SL, Taylor JR. (2009). Recapitulation and reversal of a persistent depression-like syndrome in rodents. *Curr. Protoc. Neurosci.* Chapter 9;Unit 9.32:9.32.1-9.32.11
118. Grailhe R, Grabtree GW, Hen R. (2001). Human 5-HT(5) receptors: the 5-HT(5A) receptor is functional but the 5-HT(5B) receptor was lost during mammalian evolution. *Eur. J. Pharmacol.* 418: 157-167.
119. Groenink L, Van Bogaert MJ, Van der Gugten J, Oosting RS, Olivier B. (2003). 5-HT1A receptor and 5-HT1B receptor knockout mice in stress and anxiety paradigms. *Behav Pharmacol* 14: 369-383.
120. Guzman-Marin R, Alam MN, Mihailescu S, Szymusiak R, McGinty D, Drucker-Colin R. (2001). Subcutaneous administration of nicotine changes dorsal raphe serotonergic neurons discharge rate during REM sleep. *Brain Res.* 888(2):321-325.
121. Gyermek L. (1995). 5-HT₃ receptors: pharmacologic and therapeutic aspects. *J. Clin. Pharmacol.* 35: 845-855.
122. Halberstadt AL, Balaban CD. (2006). Serotonergic and nonserotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus send collateralized projections to both the vestibular nuclei and the central amygdaloid nucleus. *Neuroscience.* 140(3): 1067-1077.
123. Halberstadt AL, Balaban CD. (2008). Selective anterograde tracing of nonserotonergic projections from dorsal raphe nucleus to the basal forebrain and extended amygdala. *J. Chem. Neuroanat.* 35(4): 317-25.

124. Hamilton JP, Chen MC, Gotlib IH. (2013). Neural systems approaches to understanding major depressive disorder: an intrinsic functional organization perspective. *Neurobiol. Dis.* 52:4-11.
125. Hannon J, Hoyer D. (2002). Serotonin receptors and systems: endless diversity? *Acta Biolog. Szeged.* 46: 1-12.
126. Hansen MB, Arif F, Gregersen H, Bruusgaard H, Wallin L. (2008). Effect of serotonin on small intestinal contractility in healthy volunteers. *Physiol. Res.* 57: 63-71.
127. Harandi M, Aguera M, Gamrani H, Didier M, Maitre M, Calas A, Belin MF. (1987). γ -aminobutyric acid and 5-hydroxytryptamine interrelationship in the rat nucleus raphe dorsalis: combination of radioautographic and immunohistochemical techniques at light and electron microscopic levels. *Neuroscience.* 21:237-251.
128. Härfstrand A, Fuxe K, Cintra A, Agnati LF, Zini I, Wikström AC, Okret S, Yu ZY, Goldstein M, Steinbusch H, et al. (1986). Glucocorticosteroid receptor immunoreactivity in monoaminergic neurons of the rat brain. *Proc. Natl. Acad.Sci. U.S.A.* 83: 9779-9783.
129. Hayashi R, Wada H, Ito K, Adcock I. (2004). Effects of glucocorticoids on gene transcription. *Eur. J. Pharmacol.* 500:51-62.
130. Heitzer MD, Wolf IM, Sanchez ER, Witchel SF, DeFranco DB. (2007). Glucocorticoid receptor physiology. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 8:321–330.
131. Heninger GR, Delgado PL, Charney DS. (1996). The revised monoamine theory of depression: a modulatory role for monoamines, based on new findings from monoamine depletion experiments in humans. *Pharmacopsychiatry.* 29(1):2-11. Review.
132. Hensler JG. Serotonin. En: Siegel GJ, Albers RW, Brady ST, Price DL, editors. *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical aspects.* San Diego: Academic Press, 2006: 227-248.
133. Hensler JG. Serotonin. En: Siegel J, Wayne Albers R, Brady ST, Price DL, editores. *Basic Neurochemistry. USA: Elsevier Academic Press, 2006: 227-248.*
134. Hervás I, Artigas F. (1998). Effect of fluoxetine on extracellular 5-hydroxytryptamine in rat brain. Role of 5-HT autoreceptors. *Eur. J. Pharmacol.* 358(1): 9-18.
135. Hjorth S, Magnusson T. (1988). The 5-HT 1A receptor agonist, 8-OH-DPAT, preferentially activates cell body 5-HT autoreceptors in rat brain in vivo. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 338(5):463-471.
136. Holsboer F, Lauer CJ, Schreiber W, Krieg JC. (1995). Altered hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation in healthy subjects at high familial risk for affective disorders. *Neuroendocrinology.* 62(4):340-7.
137. Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP. (1994). International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol. Rev.* 46(2):157-203
138. Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71: 533-554.
139. Hughes JR, Hatsukami DK, Mitchell JE, Dahlgren LA. (1986). Prevalence of smoking among psychiatric outpatients. *Am J Psychiatry.* 143:993-997.
140. Hui SC, Sevilla EL, Ogle CW. (1993). 5-HT₃ antagonists reduce morphine self-administration in rats. *Br. J. Pharmacol.* 110(4):1341-1346.

141. Imai H, Park MR, Steindler DA, Kitai ST. (1986). The morphology and divergent axonal organization of midbrain raphe projection neurons in the rat. *Brain Dev.* 8(4):343-354.
142. Innis RB, Nestler EJ, Aghajanian GK. (1988). Evidence for G-protein mediation of serotonin -and GABA_B-induced hyperpolarization of rat dorsal raphe neurons. *Brain Res.* 459:27-36.
143. Ishikawa M, Ohdo S, Watanabe H, Hara C, Ogawa N. (1995). Alteration in circadian rhythm of plasma corticosterone in rats following socio-psychological stress induce by communication box. *Physiol. and Behav.* 57(1):41-47.
144. Jacobs BL, Azmitia CL. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev.* 72(1):165-229.
145. Jahng JW, Houpt TA, Wessel TC, Chen K, Shih JC, Joh TH. (1997). Localization of monoamine oxidase A and B mRNA in the rat brain by in situ hybridization. *Synapse* 25(1):30–36.
146. Jensen NH, Cremers TI, Sotty F. (2010). Therapeutic potential of 5-HT_{2C} receptor ligands. *ScientificWorldJournal.* 10:1870-1885.
147. Joëls M, de Kloet ER. (1990). Mineralocorticoid receptor-mediated changes in membrane properties of rat CA1 pyramidal neurons in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87(12):4495-8.
148. Joëls M, De Kloet ER. (1992). Coordinative mineralocorticoid and glucocorticoid receptor-mediated control of responses to serotonin in rat hippocampus. *Neuroendocrinology.* 55(3):344-350.
149. Johnson CN, Ahmed M, Miller ND. (2008). 5-HT₆ receptor antagonists: prospects for the treatment of cognitive disorders including dementia. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 11: 642-654.
150. Judge SJ, Ingram CD, Gartside SE. (2004). Moderate differences in circulating corticosterone alter receptor-mediated regulation of 5-hydroxytryptamine neuronal activity. *J. Psychopharm.* 18(4): 475-483.
151. Judge SJ, Ingram CD, Gartside SE. (2004). Moderate differences in circulating corticosterone alter receptor-mediated regulation of 5-hydroxytryptamine neuronal activity. *J. Psychopharmacol.* 18(4):475-483.
152. 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(1):69-77.
153. Katz B, Thesleff S. (1957). A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate. *J. Physiol.* 138(1):63-80.
154. Kazakov VN, Kravtsov Pla, Krakhotkina ED, Maškiš VA. (1992). Sources of cortical, hypothalamic and spinal serotonergic projections: topical organization in the dorsal Raphe nucleus. *Neirofiziologija.* 24(1):87-96.
155. Kelly WF, Checkley SA, Bender DA, Mashiter K. (1983). Cushing's syndrome and depression--a prospective study of 26 patients. *Br. J. Psychiatry.* 142:16-19.
156. Kennett GA, Trail B, Bright F. (1998). Anxiolytic-like actions of BW 723C86 in the rat Vogel conflict test are 5-HT_{2B} receptor mediated. *Neuropharmacol.* 37: 1603-1610.
157. Kennett GA, Wood MD, Glen A, Grewal S, Forbes I, Gadre A, Blackburn TP. (1994). In vivo properties of SB 200646A, a 5-HT_{2C/2B} receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.* 111: 797-802.

158. Kenny PJ, File SE, Rattray M. (2001). Nicotine regulates 5-HT_{1A} receptor gene expression in the cerebral cortex and dorsal hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 13:1267-1271.
159. Kessler RC, Chiu WT, Demler O, Merikangas KR, Walters EE. (2005). Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch. Gen. Psychiatry.* 62(6):617-27.
160. Key BJ, Krzywoski L. (1977). Electrocortical changes induced by the perfusion of noradrenaline, acetylcholine and their antagonists directly into the dorsal raphe nucleus of the cat. *Br. J. Pharmacol.* 61(2):297-305.
161. Kim SW, Shin IS, Kim JM, Youn T, Yang SJ, Hwang MY, Yoon JS. (2009). The 5-HT₂ receptor profiles of antipsychotics in the pathogenesis of obsessive-compulsive symptoms in schizophrenia. *Clin. Neuropharmacol.* 32: 224-226.
162. 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. *Neurosci.* 116:669-983
163. Klamt JG, Prado WA. (1991). Antinociception and behavioral changes induced by carbachol microinjected into identified sites of the rat brain. *Brain Res.* 549(1):9-18.
164. Koenig JI, Gudelsky GA, Meltzer HY. (1987). Stimulation of corticosterone and beta-endorphin secretion in the rat by selective 5-HT receptor subtype activation. *Eur. J. Pharmacol.* 137: 1-8.
165. Kohen R, Metcalf MA, Khan N, Druck T, Huebner K, Lachowicz JE, Meltzer HY, Sibley DR, Roth BL, Hamblin MW. (1996). Cloning, characterization, and chromosomal localization of a human 5-HT₆ serotonin receptor. *J. Neurochem.* 66: 47-56.
166. Laaris N, Haj-Dahmane S, Hamon M, Lanfumey L. (1995). Glucocorticoid receptor-mediated inhibition by corticosterone of 5-HT_{1A} autoreceptor functioning in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology.* 34(9):1201-1210.
167. Lechner J, Leah JD, Zimmermann M. (1993). Brainstem peptidergic neurons projecting to the medial and lateral thalamus and zona incerta in the rat. *Brain Res.* 603(1):47-56.
168. Lee HS, Kim MA, Valentino RJ, Waterhouse BD. (2003). Glutamatergic afferent projections to the dorsal raphe nucleus of the rat. *Brain Res.* 963(1-2):57-71.
169. Lee RS, Tamashiro KL, Yang X, Purcell RH, Harvey A, Willour VL, Huo Y, Rongione M, Wand GS, Potash JB. (2010). Chronic corticosterone exposure increases expression and decreases deoxyribonucleic acid methylation of Fkbp5 in mice. *Endocrinology.* 151(9):4332-4343.
170. Leitch MM, Ingram CD, Young AH, McQuade R, Gartside SE. (2003). Flattening the corticosterone rhythm attenuates 5-HT_{1A} autoreceptor function in the rat: relevance for depression. *Neuropsychopharmacol.* 28(1):119-25.
171. Lesch KP, Mayer S, Disselkamp-Tietze J, Hoh A, Wiesmann M, Osterheider M. (1990). Schulte HM 5-HT_{1A} receptor responsivity in unipolar depression. Evaluation of ipsapirone-induced ACTH and cortisol secretion in patients and controls. *Biol Psychiatry.* 1;28(7):620-8
172. Li X, Rainnie D, McCarley R, Greene R. (1998). Presynaptic nicotinic receptors facilitate monoaminergic transmission. *J. Neurosci.* 18 (5) 1904-1912.

173. 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.* 4;900 (1):110-118.
174. Li YQ, Takada M, Shinonaga Y, Mizuno N. (1993). Direct projections from the midbrain periaqueductal gray and the dorsal raphe nucleus to the trigeminal sensory complex in the rat. *Neuroscience.* 54(2):431-43.
175. Lopez-Figueroa AL, Norton CS, Lopez-Figueroa MO, Armellini-Dodel D, Burke S, Akil H, Lopez JF, Watson SJ. (2004). Serotonin 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} and 5-HT_{2A}, receptor mRNA expression in subjects with major depression, bipolar disorder, and schizophrenia. *Biol. Psychiatry.* 55:225-233.
176. Lorens SA, Van De Kar LD. (1987). Differential effects of serotonin (5HT_{1A} and 5-HT₂) agonists and antagonists on renin and corticosterone secretion. *Neuroendocrinology.* 45:305-310.
177. Lucaites VL, Krushinski JH, Schaus JM, Audia JE, Nelson DL. (2005). [³H]LY334370, a novel radioligand for the 5-HT_{1F} receptor. II. Autoradiographic localization in rat, guinea pig, monkey and human brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 371(3):178-84. Epub 2005 Apr 27.
178. Lukas RJ. (1991). Effects of chronic nicotinic ligand exposure on functional activity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by cells of the PC12 rat pheochromocytoma or the TE671/RD human clonal line. *J. Neurochem.* Apr;56(4):1134-1145.
179. Lum CT, Stahl SM. (2012). Opportunities for reversible inhibitors of monoamine oxidase-A (RIMAs) in the treatment of depression. *CNS Spectr.* 17(3):107-120.
180. Ma QP, Yin GF, Ai MK, Han JS. (1991). Serotonergic projections from the nucleus raphe dorsalis to the amygdala in the rat. *Neurosci Lett.* 134(1):21-24.
181. Ma QP. (2001). Co-localization of 5HT(1B/1D/1F) receptors and glutamate in trigeminal ganglion in rats. *NeuroReport* 12, 1589–1591.
182. Ma Z, Strecker RE, McKenna JT, Thakkar MM, McCarley RW, Tao R. (2005). Effects on serotonin of (-)-nicotine and dimethylphenylpiperazinium in the dorsal raphe and nucleus accumbens of freely behaving rats. *Neurosci.* 135(3):949-958.
183. Machu TK. (2011). Therapeutics of 5-HT₃ receptor antagonists: current uses and future directions. *Pharmacol. Ther.* 130(3):338-347.
184. Malek ZS, Dardente H, Pevet P, Raison S. (2005). Tissue-specific expression of tryptophan hydroxylase mRNAs in the rat midbrain: anatomical evidence and daily profiles. *Eur. J. Neurosci.* Aug;22(4):895-901.
185. Malek ZS, Sage D, Pévet P, Raison S. (2007). Daily rhythm of tryptophan hydroxylase-2 messenger ribonucleic acid within raphe neurons is induced by corticoid daily surge and modulated by enhanced locomotor activity. *Endocrinology.* 148(11):5165-72.
186. Mann JJ, Currier D, Quiroz JA, Manji HK. (). *Neurobiology of Severe Mood and Anxiety.* En: Siegel GJ, Albers RW, Brady ST, Price DL, editors. (2006) *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical aspects.* San Diego: Academic Press, 887-909.
187. Mann JJ. (2013). The serotonergic system in mood disorders and suicidal behaviour. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences* 25, 20120537, <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2012.0537>.

188. Marek GJ, Carpenter LL, McDougle CJ, Price LH. (2003). Synergistic action of 5-HT_{2A} antagonists and selective serotonin reuptake inhibitors in neuropsychiatric disorders. *Neuropsychopharmacology*. 28(2):402-412.
189. Marhawa J, Aghajanian GK. (1982). Relative potencies of alpha-1 and alpha-2 antagonists in the locus coeruleus, dorsal raphe and dorsal lateral geniculate nuclei: an electrophysiological study. *J. Pharmacol Exp Ther*. 222:287-293.
190. Mc Gehee DS, Role LW. (1995). Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annu Rev Physiol*. 57:521-46.
191. McEwan IJ, Wright AP, Dahlman-Wright K, Carlstedt-Duke J, Gustafsson JA. (1993). Direct interaction of the tau 1 transactivation domain of the human glucocorticoid receptor with the basal transcriptional machinery. *Mol. Cell Biol*. 13:399-407.
192. McEwen BS, De Kloet ER, Rostene W. (1986). Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiol. Rev*. 66:121-188.
193. Menkes DB, Baraban JM, Aghajanian GK. (1981). Prazosin selectively antagonizes neuronal responses mediated by α_1 -adrenoreceptors in brain. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol*. 317:273-275.
194. Mialet J, Berque-Bestel I, Eftekhari P. (2000). Isolation of the serotonergic 5-HT₄(e) receptor from human heart and comparative analysis of its pharmacological profile in C6-glia and CHO cell lines. *Br. J. Pharmacol*. 129: 771-781.
195. Mihailescu S, Guzmán-Marín R, Drucker-Colín R. (2001). Nicotine stimulation of dorsal raphe neurons: effects on laterodorsal and pedunculopontine neurons. *Eur Neuropsychopharmacol*. 11: 359-366.
196. Mihailescu S, Guzmán-Marín R, Frías DM, Drucker-Colín R. (2002). Mechanisms of nicotine actions on dorsal raphe serotonergic neurons. *Eur. J. Pharmacol*. 452: 77-82.
197. 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.
198. Mitchell SN. (1993). Role of the locus coeruleus in the noradrenergic response to a systemic administration of nicotine. *Neuropharmacology*. 32:937-949.
199. Mnie-Filali O, Lambás-Señas L, Zimmer L, Haddjeri N. (2007). 5-HT₇ receptor antagonists as a new class of antidepressants. *Drug. News. Perspect*. 20: 613-618.
200. Monti JM. (2010). The role of dorsal raphe nucleus serotonergic and non-serotonergic neurons, and of their receptors, in regulating waking and rapid eye movement (REM) sleep. *Sleep Med Rev*. 14: 319-327.
201. Moore RY, Halaris AE, Jones BE. (1978). Serotonin neurons of the midbrain raphe: ascending projections. *J. Comp. Neurol*. 180(3):417-438.
202. Mosko SS, Haubrich D, Jacobs BL. (1977). Serotonergic afferents to the dorsal raphe nucleus: evidence from HRP and synaptosomal uptake studies. *Brain Res*. 119(2): 269-290.
203. Mosko SS, Jacobs BL. (1974). Midbrain raphe neurons: spontaneous activity and response to light. *Physiol Behav*; 13:589-593.
204. Mosko SS, Jacobs BL. (1976). Recording of dorsal raphe unit activity in vitro. *Neuroscience Lett*. 2:195-200.

205. Mueller NK, Beck SG. (2000). Corticosteroids Alter the 5-HT_{1A} Receptor-Mediated Response in CA1 Hippocampal Pyramidal Cells. *Neuropsychopharmacology*. 23(4):419-427.
206. Muma NA, Beck SG. (1999). Corticosteroids alter G protein inwardly rectifying potassium channels protein levels in hippocampal subfields. *Brain Res*. 839:331-335.
207. Nair SM, Werkman TR, Craig J, Finnell R, Joëls M, Eberwine JH. (1998). Corticosteroid regulation of ion channel conductances and mRNA levels in individual hippocampal CA1 neurons. *J. Neurosci*. 18(7):2685-2696.
208. Nebigil CG, Launay JM, Hickel P, Tournois C, Maroteaux L. (2000). 5-hydroxytryptamine 2B receptor regulates cell-cycle progression: cross-talk with tyrosine kinase pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 2591- 2596.
209. Neckers LM, Schwartz JP, Wyatt RJ, Speciale SG. (1979). Substance P afferents from the habenula innervate the dorsal raphe nucleus. *Exp Brain Res*. 37(3): 619-23.
210. Nestler EJ, Barrot M, Di Leone RJ, Eisch AJ, Gold JS y Monteggia LM. (2002). Neurobiology of Depression. *Neuron*. 34:13-25.
211. Nestler EJ, Carlezon Jr WA. (2006). The Mesolimbic Dopamine Reward Circuit in Depression. *Biol Psychiatry*. 59:1151-1159.
212. Neumaier JF, Sexton TJ, Hamblin MW, Beck SG. (2000). Corticosteroids regulate 5-HT_{1A} but not 5-HT_{1B} receptor mRNA in rat hippocampus. *Brain Res. Mol. Brain Res*. 82(1-2):65–73.
213. Nibuya M, Morinobu S, Duman RS. (1995). Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J. Neurosci*. 15(11):7539-47.
214. Nilsson T, Longmore J, Shaw D, Pantev E, Bard JA, Branchek T, Edvinsson L. (1999). Characterization of 5-HT receptors in human coronary arteries by molecular and pharmacological techniques. *Eur. J. Pharmacol*. 372: 49-56.
215. Nomura M, Nomura Y. (2006). Psychological, neuroimaging, and biochemical studies on functional association between impulsive behavior and the 5-HT_{2A} receptor gene polymorphism in humans. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1086:134-143.
216. Norman AW, Mizwicki MT, Norman DP. (2004). Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nat. Rev., Drug Discov*. 3: 27-41.
217. Ochoa EL, Chattopadhyay A, McNamee MG. (1989). Desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor: molecular mechanisms and effect of modulators. *Cell Mol. Neurobiol*. Jun;9(2):141-78.
218. O'Hearn E, Molliver ME. (1984). Organization of raphe-cortical projections in rat: a quantitative retrograde study. *Brain Res. Bull*. 13(6):709-726.
219. Olesen J. (2010). 5-Hydroxytryptamine 1F (5-HT_{1F}) receptor agonism. A possible new treatment principle for acute migraine attacks. *Cephalalgia*. 30(10):1157-1158.
220. Orr-Urtreger A, Göldner FM, Saeki M, Lorenzo I, Goldberg L, De Biasi M, Dani JA, Patrick JW, Beaudet AL. (1997). Mice deficient in the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor lack alpha-bungarotoxin binding sites and hippocampal fast nicotinic currents. *J. Neurosci*. 17(23):9165-9171.
221. Owens MJ, Edwards E, Nemeroff CB. (1990). Effects of 5-HT_{1A} receptor agonists on hypothalamo-pituitary-adrenal axis activity and corticotropin releasing factor containing neurons in the rat brain. *Eur. J. Pharmac*. 190:113-122.

222. Pan ZZ, Colmers WF, Williams JT. (1989). 5-HT-mediated synaptic potentials in the dorsal raphe nucleus: interactions with excitatory amino acid and GABA neurotransmission. *J. Neurophysiol.* 62(2):481-486.
223. Pan ZZ, Williams JT. (1989). GABA- and glutamate-mediated synaptic potentials in rat dorsal raphe neurons in vitro. *J Neurophysiol.* 61(4):719-726.
224. Pandey GN, Dwivwidi Y, Rizavi HS, Ren X, Pandey SC, Pesold C, Roberts RC, Conley RR, Tamminga CA. (2002). Higher expression of serotonin 5-HT(2A) receptors in the postmortem brains of teenage suicide victims. *Am Psychiatry.* 159: 419-429.
225. Paradiso K, Sabey K, Evers AS, Zorumski CF, Covey DF, Steinbach JH. (2000). Steroid inhibition of rat neuronal nicotinic alpha4beta2 receptors expressed in HEK 293 cells. *Mol. Pharmacol.* 58(2):341-51.
226. Park MR, Gonzales-Vegas JA, Kitai ST. (1982). Serotonergic excitation from dorsal raphe stimulation recorded intracellularly from rat caudate-putamen. *Brain Res.* 243(1): 49-58.
227. Parsey RV, Ogden RT, Miller JM, Tin A, Hesselgrave N, Goldstein E, Mikhno A, Milak M, Zanderigo F, Sullivan GM, Oquendo MA, Mann JJ. (2010). Higher serotonin 1A binding in a second major depression cohort: modeling and reference region considerations. *Biol. Psychiatry.* 68(2):170-178.
228. Pauly JR, Grun EU, Collins AC. (1990). Chronic corticosterone administration modulates nicotine sensitivity and brain nicotinic receptor binding in C3H mice. *Psychopharmacology (Berl).* 101:310-316.
229. Paxinos G, Watson C. (1982). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* New York:Academic press.
230. Peng X, Gerzanich V, Anand R, Whiting PJ, Lindstrom J. (1994). Nicotine-induced increase in neuronal nicotinic receptors results from a decrease in the rate of receptor turnover. *Mol. Pharmacol.* 46(3):523-530.
231. Penington NJ, Fox AP. (1995). Toxin-insensitive Ca current in dorsal raphe neurons. *J. Neurosci.* 15(8):5719-5726.
232. Penington NJ, Kelly JS, Fox AP. (1991). A study of the mechanism of Ca²⁺ current inhibition produced by serotonin in rat dorsal raphe neurons. *J. Neurosci.* 11(11):3594-3609.
233. Penington NJ, Kelly JS, Fox AP. (1993). Whole cell recordings of inwardly rectifying K⁺ currents activated by 5-HT_{1A} receptors on dorsal raphe neurons of the adult rat. *J. Physiol. Lond.* 469:387-406.
234. Penington NJ, Reiffenstein RJ. (1986). Lack of effect of antagonists on serotonin-induced inhibition in rat hippocampus. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 64(11):1413-1418.
235. Pereira EF, Alkondon M, Reinhardt S, Maelicke A, Peng X, Lindstrom J, Whiting P, Albuquerque EX. (1994). Physostigmine and galanthamine: probes for a novel binding site on the alpha 4 beta 2 subtype of neuronal nicotinic acetylcholine receptors stably expressed in fibroblast cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270(2):768-78.
236. Petit JM, Luppi PH, Peyron C, Rampon C, Jouvet M. (1995).VIP-like immunoreactive projections from the dorsal raphe and caudal linear raphe nuclei to the bed nucleus of the stria terminalis demonstrated by a double immunohistochemical method in the rat. *Neurosci Lett.* 193(2):77-80.
237. Peyron C, Luppi PH, Fort P, Rampon C, Jouvet M. (1996). Lower brainstem catecholamine afferents to the rat dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol.* 364(3):402-413.
238. Peyron C, Petit JM, Rampon C, Jouvet M, Luppi PH. (1998). Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. *Neuroscience.* 82(2):443-468.

239. Picciotto MR, Mineur YS. (2013). Molecules and circuits involved in nicotine addiction: The many faces of smoking. *Neuropharmacology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.028>.
240. Pidoplichko VI, DeBiassi M, Williams JT, Dani JA. (1997). Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. *Nature*. 390:401-404.
241. Pullar IA, Boot JR, Broadmore RJ, Eyre TA, Cooper J, Sanger GJ, Wedley S, Mitchell SN. (2004). The role of the 5-HT_{1D} receptor as a presynaptic autoreceptor in the guinea pig. *Eur. J. Pharmacol.* 493: 85-93.
242. Pytliak M, Vargová V, Mechírová V, Felšöci M. (2011). Serotonin Receptors-From Molecular Biology to Clinical Applications. *Physiol. Res.* 60: 15-25.
243. Rafful C, Medina-Mora ME, Borges G, Benjet C, Orozco R. (2012). Depression, gender, and the treatment gap in Mexico. *J. Affect. Disord.* 138(1-2):165-169.
244. Rasanen P, Hakko H, Tiihonen J. (1999). Pindolol and major affective disorders: a three-year follow-up study of 30,485 patients. *J Clin Psychopharmacol* 19,297-302.
245. Raymond JR, Mukhin YV, Gelasco A, Turner J, Collinsworth G, Gettys TW, Grewal JS, Garnovskaya MN. (2001). Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacol Ther.* 92(2-3):179-212.
246. Revah F, Bertrand D, Galzi JL, Devillers-Thiéry A, Mulle C, Hussy N, Bertrand S, Ballivet M, Changeux JP. (1991). Mutations in the channel domain alter desensitization of a neuronal nicotinic receptor. *Nature*. Oct 31;353(6347):846-849.
247. Revollo JR, Cidlowski JA. (2009). Mechanisms generating diversity in glucocorticoid receptor signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1179:167-78.
248. Reynolds GP, Mason SL, Meldrum A, De Keczer S, Parnes H, Eglen RM, Wong EH. (1995). 5-Hydroxytryptamine (5-HT)₄ receptors in post mortem human brain tissue: distribution, pharmacology and effects of neurodegenerative diseases. *Br. J. Pharmacol.* 114: 993-998.
249. Role LW, Berg DK. (1996). Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron*. Jun;16(6):1077-1085.
250. Ruat M, Traiffort E, Leurs R, Tardivel-Lacombe J, Diaz J, Arrang JM, Schwartz JC. (1993). Molecular cloning, characterization, and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT₇) activating cAMP formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8547-8551.
251. Russo SJ, Nestler EJ. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 14(9):609-625.
252. Saenz del Burgo L, Cortés R, Mengod G, Montaña M, García del Caño G, Sallés J. (2013). Chronic effects of corticosterone on GIRK1-3 subunits and 5-HT_{1A} receptor expression in rat brain and their reversal by concurrent fluoxetine treatment. *Eur Neuropsychopharmacol.* 23(3):229-239.
253. Sakai K, Crochet S. (2001). Differentiation of presumed serotonergic dorsal raphe neurons in relation to behavior and wake-sleep states. *Neuroscience.* 104:1141-1155.
254. Salín-Pascual R, Drucker-Colín R. (1998). A novel effect of nicotine on mood and sleep in major depression. *Neuroreport.* 9:57-60.
255. Salin-Pascual RJ, de la Fuente JR, Galica-Polo L, Drucker-Colín. (1995). Effects of transdermal nicotine on mood and sleep in nonsmoking major depressed patients. *Psychopharmacol.* 121:476-479.
256. Sargent, P.A., Kjaer, K.H., Bench, C.J., Rabiner, E.A., Messa, C., Meyer, J., Gunn, R.N., Grasby, P.M., Cowen, P.J. (2000). Brain serotonin_{1A} receptor binding measured by positron emission tomography

- with [11C]WAY-1000635: effects of depression and antidepressant treatment. *Arch. Gen. Psychiatry* 57(2), 174-180.
257. Saura J, Bleuel Z, Ulrich J, Mendelowitsch A, Chen K, Shih JC, Malherbe P, Da Prada M, Richards JG. (1996). Molecular neuroanatomy of human monoamine oxidases A and B revealed by quantitative enzyme radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neurosci.* 70(3):755–774.
 258. Savory JG, Hsu B, Laquian IR, Giffin W, Reich T, Hache RJ, Lefebvre YA. (1999). Discrimination between NL1- and NL2-mediated nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *Mol. Cell Biol.* 19:1025-1037.
 259. Schmuck K, Ullmer C, Engels P, Lübbert H. (1994). Cloning and functional characterization of the human 5-HT_{2B} serotonin receptor. *FEBS Lett.* 342: 85-90.
 260. Schoneveld OJ, Gaemers IC, Lamers WH. (2004). Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochim. Biophys. Acta.* 1680(2):114-28.
 261. Seckl JR, Dickson KL, Fink G. (1990). Central 5,7-dihydroxytryptamine lesions decrease hippocampal glucocorticoid and mineralocorticoid receptor messenger ribonucleic Acid expression. *J. Neuroendocrinol.* 2 (6):911-6.
 262. Segal M. (1975). Physiological and pharmacological evidence for a serotonergic projection to the hippocampus. *Brain Res.* 94(1):115-131.
 263. Semba J, Mataka C, Yamada S, Nankai M, Toru M. (1998). Antidepressant like effects of chronic nicotine on learned helplessness paradigm in rats. *Biol. Psychiatry.* 43:389–391.
 264. Seth P, Cheeta S, Tucci S, File SE. (2002). Nicotinic--serotonergic interactions in brain and behaviour. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71(4):795-805.
 265. Sheard MH, Zolovick A, Aghajanian GK. (1972). Raphe neurons, effect of tricyclic depressants drugs. *Brain Res.* 43:690-694.
 266. Shi LJ, Liu LA, Cheng XH, Wang CA. (2002). Modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by glucocorticoids. *Acta Pharmacol. Sin.* 23(3):237-42.
 267. Shih JC, Chen K, Ridd MJ. (1999). Monoamine oxidase: from genes to behavior. *Annu. Rev. Neurosci.* 22:197–217.
 268. Shimron-Abarbanell D, Nothen MM, Erdmann J, Propping P. (1995). Lack of genetically determined structural variants of the human serotonin-1E (5-HT_{1E}) receptor protein points to its evolutionary conservation. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 29: 387-390.
 269. Soiza-Reilly M, Commonsa KG. (2011). Glutamatergic drive of the dorsal raphe nucleus. *J. Chem. Neuroanat.* 41:247–255.
 270. Sonino N, Fava GA. (2001). Psychiatric disorders associated with Cushing's syndrome. *Epidemiology, pathophysiology and treatment.* *CNS Drugs.* 15(5):361-73.
 271. Sprouse JS, Aghajanian GK. (1987). Electrophysiological response of 5-HT dorsal raphe neurons to 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B} agonistas. *Synapse.* 1:3-9.
 272. Steinbusch HW, Nieuwenhuys R, Verhofstad AA, Van der Kooy D. (1981). The nucleus raphe dorsalis of the rat and its projection upon the caudatoputamen. A combined cytoarchitectonic, immunohistochemical and retrograde transport study. *J. Physiol. Paris.* 77(2-3):157-174.

273. Steininger TL, Wainer BH, Blakely RD, Rye DB. (1997). Serotonergic dorsal raphe nucleus projections to the cholinergic and noncholinergic neurons of the pedunculo-pontine tegmental region: a light and electron microscopic anterograde tracing and immunohistochemical study. *J. Comp. Neurol.* 382(3):302-322.
274. Stratford TR, Wirtshafter D. (1990). Ascending dopaminergic projections from the dorsal raphe nucleus in the rat. *Brain Res.* 511(1):173-176.
275. 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(6):753-759.
276. 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(10):1181-1186.
277. Takada Y, Urano T, Ihara H, Takada A. (1995). Changes in the central and peripheral serotonergic system in rats exposed to water-immersion restrained stress and nicotine administration. *Neurosci. Res.* 23(3):305-311.
278. Tao R, Ma Z, Auerbach SB. (1996). Differential regulation of 5-hydroxytryptamine release by GABA_A and GABA_B receptors in midbrain raphe nuclei and forebrain of rats. *Br J Pharmacol.* 119(7):1375-84.
279. Thomas DR. (2006). 5-HT_{2A} receptors as a therapeutic targets. *Pharmacol. Ther.* 111: 707-714.
280. Thompson AJ, Lummis SCR. (2007). The 5-HT₃ receptor as a therapeutic target. *Expert. Opin. Ther. Targets* 11: 527-540.
281. Uki M, Nabekura J, Akaike N. (1999). Suppression of the nicotinic acetylcholine response in rat superior cervical ganglionic neurons by steroids. *J. Neurochem.* 72(2):808-14.
282. Valera S, Ballivet M, Bertrand D. (1992). Progesterone modulates a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89(20):9949-53.
283. Van Bockstaele EJ, Cestari DM, Pickel VM. (1994). Synaptic structure and connectivity of serotonin terminals in the ventral tegmental area: potential sites for modulation of mesolimbic dopamine neurons. *Brain Res.* 647(2): 307-322.
284. 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.
285. Vaswani M, Linda FK, Ramesh S. (2003). Role of selective serotonin reuptake inhibitors in psychiatric disorders: a comprehensive review. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 27(1):85-102.
286. Vázquez-Palacios G, Bonilla-Jaime H, Velázquez-Moctezuma J. (2005). Antidepressant effects of nicotine and fluoxetine in an animal model of depression induced by neonatal treatment with clomipramine. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 29:39-46.
287. Vázquez-Palacios G, Bonilla-Jaime H. (2004). Receptores nicotínicos cerebrales y trastornos neuropsiquiátricos. *Rev Neurol.* 39:1146-1160.
288. Vergé D, Daval G, Marcinkiewicz M, Patey A, el Mestikawy S, Gozlan H, Hamon M. (1986). Quantitative autoradiography of multiple 5-HT₁ receptor subtypes in the brain of control or 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats. *J. Neurosci.* 6(12):3474-82.

289. Vertes RP, Lindley SB. (2008). Efferent and afferent connections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. En: Monti JM, Pandi-Perumal SR, Jacobs BL, Nutt DJ, editors. Serotonin and Sleep: Molecular, Functional and Clinical Aspects. Suiza: Birkhäuser Verlag.: 69-102.
290. Vincent SR, Staines WA, Mcgeer EG, Fibiger HC. (1980). Transmitters contained in the efferents of the habenula. *Brain Res.* 195:479-484.
291. Vizi ES, Lendvai B. (1999). Modulatory role of presynaptic nicotinic receptors in synaptic and non-synaptic chemical communication in the central nervous system. *Brain Res Rev.* 30(3):219-235.
292. Wang CC, Billett E, Borchert A, Kuhn H, Ufer C. (2013). Monoamine oxidases in development. *Cell Mol. Life Sci.* 70(4):599-630.
293. Wang HT, Han F, Shi YX. (2009). Activity of the 5-HT_{1A} receptor is involved in the alteration of glucocorticoid receptor in hippocampus and corticotropin-releasing factor in hypothalamus in SPS rats. *Int. J. Mol. Med.* 24: 227-231.
294. Wang J, Shen RY, Haj-Dahmane S. (2012). Endocannabinoids mediate the glucocorticoid-induced inhibition of excitatory synaptic transmission to dorsal raphe serotonin neurons. *J. Physiol.* 590(22):5795-5808.
295. Wang RY, Aghajanian GK. (1977). Antidromically identified serotonergic neurons in the rat midbrain raphe: evidence for collateral inhibition. *Brain Res.*132:186-193.
296. Wang RY, Aghajanian GK. (1977). Inhibition of neurons in the amygdala by dorsal raphe stimulation: mediation through a direct serotonergic pathway. *Brain Res.* 120(1):85-102.
297. Weber B, Lewicka S, Deuschle M, Colla M, Vecsei P, Heuser I. (2000). Increased diurnal plasma concentrations of cortisone in depressed patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85:1133-1136.
298. Westlund KN, Denney RM, Rose RM, Abell CW. (1988). Localization of distinct monoamine oxidase A and monoamine oxidase B cell populations in human brainstem. *Neurosci.* 25(2):439-456.
299. Williams JT, Colmers WF, Pan ZZ. (1988). Voltage- and ligand-activated inwardly rectifying currents in dorsal raphe neurons in vitro. *J. Neurosci.* 8:3499-3506.
300. Willner P. (1995). Animal models of depression: validity and applications. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 49:19-41.
301. Willner P. (1997). Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl).* 134:319-329.
302. Wirtshafter D, Stratford TR, Asin KE. (1987). Evidence that serotonergic projections to the substantia nigra in the rat arise in the dorsal, but not the median, raphe nucleus. *Neurosci. Lett.* 77(3):261-266.
303. Wong ML, Kling MA, Munson PJ, Listwak S, Licinio J, Prolo P. (2000). Pronounced and sustained central hypernoradrenergic function with major depression with melancholic features: relation to hypercortisolism and corticotropin-releasing hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:325-330.
304. Zahniser NR, Doolen S. (2001). Chronic and acute regulation of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters: drugs, substrates, presynaptic receptors, and signaling systems. *Pharmacol. Ther.* 92(1):21-55.



Research report

Flattening plasma corticosterone levels increases the prevalence of serotonergic dorsal raphe neurons inhibitory responses to nicotine in adrenalectomised rats

Carmen Frías-Domínguez^a, Julieta Garduño^a, Salvador Hernández^a, René Drucker-Colín^b, Stefan Mihailescu^{a,*}

^a Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México DF, Mexico

^b Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México DF, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 April 2013

Received in revised form 5 July 2013

Accepted 10 July 2013

Available online xxx

Keywords:

Dorsal raphe nucleus

Serotonin

Nicotine

Corticosterone

5-HT_{1A} receptor

ABSTRACT

Major depression is characterized by a diminished activity of the brain serotonergic system as well as by the flattening of plasma cortisol levels. Nicotine improves mood in patients with major depression and in experimentally depressed animals by increasing brain serotonin (5-HT), noradrenaline and dopamine levels. The present study was directed to determine if flattening plasma glucocorticoid levels changes nicotine's stimulatory effects upon 5-HT DRN neurons. The experiments were performed in brain slices obtained from rats previously (14 days) adrenalectomised and implanted subcutaneously with one pellet containing 75 mg of corticosterone (Adx+CSR rats). Whole cell voltage and current clamp techniques were used to study the activity of immunocytochemically identified 5-HT DRN neurons. Administration of nicotine (1 μ M) in sham-operated animals produced stimulatory effects in all 5-HT DRN neurons studied. In Adx+CSR rats however, nicotine inhibited 75% of 5-HT DRN neurons and increased the potassium-dependent inward rectifying current. The inhibitory effect of nicotine upon 5-HT DRN neurons was dependent on serotonin release inside the DRN, since it was converted into a stimulatory response by the selective antagonist of 5-HT_{1A} receptors *N*-[2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-*N*-(2-pyridyl)cyclohexanecarboxamide (WAY100635, 25 nM). Adx+CSR rats also presented an increased function of 5-HT_{1A} autoreceptors, since, in these rats, serotonin (1–10 μ M) produced a higher increase in the potassium dependent inward rectifying current in comparison with sham-operated animals. Serotonin release inside DRN was mediated by α 4 β 2 nicotinic acetylcholine receptors since the selective antagonist of these receptors dihydro- β -erythroidine hydrobromide (DH β E, 100 nM) blocked the inhibitory effects of nicotine 5-HT DRN neurons. These data indicate that, in the experimental model of adrenalectomised rats implanted with corticosterone pellets, nicotine increases the function of 5-HT_{1A} receptors of 5-HT DRN neurons.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Nicotine improves mood in depressed non-smoking patients (Salin-Pascual and Drucker-Colín, 1998) and induces antidepressant-like effects in animal models of depression (Semba et al., 1998; Tizabi et al., 1999; Djuric et al., 1999). Several authors consider that tobacco smoking represents a form of auto

medication in depression (Covey et al., 1990; Breslau et al., 1992; Ferguson et al., 1996), a view supported by the higher prevalence of smoking in depressed patients compared to normal individuals (Glassman et al., 1990; Diwan et al., 1998).

The antidepressant effect of nicotine was initially attributed only to an increase in the release of brain antidepressant neurotransmitters such as dopamine (Pidoplichko et al., 1997), serotonin (Mihailescu et al., 1998) and noradrenaline (Engberg and Hajos, 1994). More recently however, it was hypothesized that desensitization or long-term antagonism of nAChRs may also contribute to nicotine's antidepressant effect (Picciotto and Mineur, 2013, for review). This last hypothesis receives support from experimental observations indicating a fast desensitization of nAChRs (especially of α 4 β 2 subtype) in the presence of nicotine (Grady et al., 1994) and from antidepressant effects of nAChRs antagonists or partial agonists (Picciotto and Mineur, 2013; Philip et al., 2012). It was

Abbreviations: Adx+CSR rats, adrenalectomised and corticosterone-treated rats; DRN, dorsal raphe nucleus; nAChRs, nicotinic acetylcholine receptors.

* Corresponding author at: Departamento de Fisiología, Edificio de Investigación A, 5° piso, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Colonia Copilco-Coyoacán, CP 04510 México DF, Mexico. Tel.: +52 55 5623 2345/5415 9283; fax: +52 55 5623 2241.

E-mail address: stefm@unam.mx (S. Mihailescu).

also shown that the regular use of tobacco precipitates depressive symptoms (Boden et al., 2010), which converts the classic unidirectional relationship between smoking and depression into a bidirectional one.

Behavioral studies suggest that nicotine's antidepressant like effect results, at least in part, from an increase in serotonin release (Vázquez-Palacios et al., 2005). Indeed, *in vitro* studies indicated that nicotine increases the firing rate of 5-HT dorsal raphe nucleus (DRN) neurons (Mihailescu et al., 1998, 2001), through direct (Galindo-Charles et al., 2008) and indirect (Li et al., 1998; Garduño et al., 2012) stimulation of 5-HT DRN neurons. Likewise, *in vivo* studies showed that systemic nicotine increases serotonin levels in various brain areas including cerebral cortex, striatum, hippocampus, dorsal raphe nucleus and hypothalamus among others (Seth et al., 2002, for review).

A significant number of patients with major depression present flat plasma cortisol levels (Gillespie and Nemeroff, 2005; Weber et al., 2000), probably due to a diminished negative feedback regulation of corticotropin releasing factor (CRF) secretion (Gold and Chrousos, 2002). The pattern of flattening of plasma cortisol levels consisted in elevation of the nadir values with preservation or increment of the peak values, resulting in an increase in total cortisol exposure (Holsboer, 2000). Both CRF and glucocorticoid hormones act directly on various targets located in the central nervous system and peripheral tissues to produce alterations of physiological and behavioral functions which accompany major depression: activation of the sympathetic nervous system and adrenal medulla, inhibition of food intake and sexual activity and inhibition of endocrine programs for growth and reproduction (Gold and Chrousos, 2002). The hypothesis of glucocorticoid hormone involvement in the pathogenesis of depression is supported by clinical studies showing that cortisol hypersecretion (Cushing's disease) is associated with symptoms of depression that disappear after adequate treatment of the endocrine dysfunction. Likewise, a rodent model of depression based on increased plasma corticosterone levels was recently created (Gourley and Taylor, 2009, for review).

Serotonergic innervation of areas involved in mood regulation like amygdala, prefrontal cortex, hippocampus and ventral tegmental area, originates mostly in the DRN (Descarries et al., 1982). Pharmacological stimulation of 5-HT DRN neurons (Gardier, 2005) and selective inhibition of 5-HT reuptake (Vaswani et al., 2003) produce antidepressant effects. Acute *in vitro* exposure of 5-HT DRN neurons to glucocorticoids reduces the function of 5-HT_{1A} autoreceptors in the rat (Laaris et al., 1995). The effect of chronic administration of glucocorticoids on 5-HT DRN neuron activity is, however, controversial. Positron emission tomography studies indicated that depressed patients may exhibit both decreases (Drevets et al., 1999; Sargent et al., 2000), and increases (Parsey et al., 2010) in the binding potential of DRN 5-HT_{1A} autoreceptor. Implantation of corticosterone pellets in adrenalectomized rats produced a reduction in 5-HT_{1A} autoreceptor sensitivity (Leitch et al., 2003). Similarly, the *in vitro* electrophysiological study realized by Fairchild et al. (2003) showed that chronic, *via oral*, administration of corticosterone in intact rats resulted in a marked decrease in the inhibitory response to serotonin of 5-HT DRN neurons. In contrast, in the study of Judge et al. (2004), pellet administration of corticosterone in adrenalectomized rats produced different effects on 5-HT_{1A} autoreceptor sensitivity as a function of the fixed plasma levels of corticosterone. For example, the inhibitory response to serotonin of 5-HT DRN neurons was higher in animals implanted with 70 mg corticosterone pellets than in animals implanted with 2 mg corticosterone pellets.

The aim of the present study was to determine if changing the pattern of daily glucocorticoid hormone levels in the plasma from the normal oscillatory to a flat one, influences nicotine's

stimulatory effects on 5-HT DRN neuron activity. To this end, we assessed the electrophysiological effects of nicotine on 5-HT DRN neurons in brain slices obtained from adrenalectomized rats implanted with pellets containing 75 mg corticosterone (Adx + CSR rats), and compared the results with the ones obtained from sham-operated animals.

2. Methods

The protocols followed the National University of Mexico and National Institute of Health guidelines for the use of animals in biomedical experiments. Young male Wistar rats (1 month postnatal age) from our animal house were housed in groups of four under controlled conditions of temperature and humidity in a 12:12 h light/dark cycle (lights on at 07:00 h). We used the animal model of adrenalectomized rats with constant corticosterone levels described by Segaloff (1950) and modified by Meyer et al. (1979). Briefly, corticosterone pellets weighing 100 mg and containing 75% corticosterone and 25% cholesterol were obtained by mixing corticosterone (Sigma) and cholesterol (Sigma) in appropriate (w/w) proportions and heating gently over a Bunsen burner flame until molten. The liquid was rapidly poured into a cubic pill mold. Once hardened, the pellets were trimmed with a razor blade to a weight of 100 mg.

2.1. Surgery

Animals (30 days postnatal male Wistar rats), undergoing surgery for adrenalectomy and corticosterone pellet implantation, were anaesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg). A single midline incision was made in the back of the animals and the muscles on each side of the spine were dissociated by blunt dissection to allow access to superior region of the kidneys. The adrenal glands were identified by inspection and removed. The muscles were sutured and, before closing the skin wound, a 75 mg corticosterone pellet was implanted subcutaneously. During recovery, animals were allowed *ad libitum* access to 0.9% saline in addition to tap water. Animals were weighed daily and their general health was assessed by inspection.

The control (sham-operated) animals were implanted subcutaneously, using the previously described surgical protocol, with a 100 mg pellet containing cholesterol only.

2.2. Electrophysiology

Two weeks after surgery, adrenalectomized and sham-operated animals were deeply anesthetized with isoflurane and decapitated, at 08:00 h. The brains were quickly removed from the skulls and immersed in ice-cold Ringer solution containing (in mM): 125 NaCl, 3 KCl, 25 NaHCO₃, 1.25 KH₂PO₄, 1 MgCl₂, 1.2 CaCl₂, 25 glucose, 300 mOsm/L, pH 7.3 by bubbling with 95% O₂/5% CO₂. Coronal brain stem slices (350 μm thick) containing the DRN were cut using a Vibratome 1500 system (Vibratome Company, St. Louis, MO) and stored in oxygenated Ringer solution at room temperature for at least one hour before performing electrophysiological recordings. Individual slices were then transferred into a custom Plexiglas recording chamber and superfused with Ringer solution at a rate of 3–4 ml/min. The temperature of the perfusate was maintained at 31 °C using a Warner automatic temperature controller model TC-324B (Warner Instr., Hamden, CT). This temperature is not the physiological one (*i.e.* 37 °C) but allows a longer survival time for neurons obtained from Adx + CSR rats, which are particularly fragile. 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 Company, Novato, CA) and fire polished using a MF-830 microforge (Narishige Company, Japan). The internal solution consisted of (mM): 115 KH₂PO₄, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 0.5 EGTA, 2 Na₂-ATP, 0.7 Na₂GTP, 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 recordings were located in the midline area of the DRN, identified as the translucent area between the medial longitudinal fasciculus and the aqueduct.

For control experiments, midbrain slices were also obtained from sham-operated animals of same age.

Recordings of 5-HT DRN neuron activity were realized using the whole cell patch clamp technique, in both current and voltage clamp modes.

Frequency–intensity curves were used to identify inline putative 5-HT DRN neurons and to determine the effects of various drugs on these neurons. In current clamp mode, starting from a membrane potential of –65 mV, 14 hyperpolarizing and depolarizing current pulses in the range of –150 to 175 pA, with 25 pA increments and 1.5 s duration were applied.

The continuous recording of neuronal activity was used to construct frequency histograms and test the effects of various drugs on 5-HT DRN neurons. In current clamp mode, the membrane was progressively depolarized until the cell started firing action potentials at a frequency of 0.3–1 Hz. In order to assess the effects of drugs on 5-HT DRN neurons separate experiments were performed using *I–F* curves and continuous recordings in current clamp mode.

For assessing intrinsic properties of 5-HT DRN neurons, the current clamp mode was used and the membrane potential was adjusted at a value of –50 mV. Depolarizing current pulses of progressive increasing intensity were applied until the excitation threshold was reached.

Inward rectifying currents of 5-HT DRN neurons were obtained from intensity–voltage (*I–V*) curves. Starting from a holding potential of –65 mV and using the voltage-clamp mode, voltage commands from –125 to –5 mV with 10 mV increments between commands and three-second duration were applied. Serotonin-dependent currents were calculated by subtracting control currents obtained in control conditions from the currents obtained after serotonin administration.

2.3. Assessment of plasma corticosterone levels

For measuring corticosterone levels, blood samples were obtained from sham-operated and Adx + CSR rats. Animals from both groups were sacrificed by guillotine and trunk blood collected. Blood samples of sham-operated rats were obtained at 07:00 and 19:00 h, whereas blood samples of Adx + CSR rats were obtained only in the morning, between at 08:00 h. Blood was allowed to clot on ice before samples were centrifuged and the resulting serum was removed. Serum samples were frozen and stored at –20 °C until corticosterone levels were measured by radioimmunoassay using a commercial kit (Coat-a-Count, Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA, USA).

2.4. Immunohistochemistry

Neurons were filled with biocytin during recordings, through diffusion from the internal solution used to fill the recording electrodes (see also Section 2.2). A combination of intracellular labeling

and 5-HT immunocytochemistry was used to determine the serotonergic nature of the recorded neurons. 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 μm 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 (Incstar/Diasorin, MN, USA, 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. Afterwards, the sections were mounted in an anti-queching media (Vectashield, Vector Laboratories) and examined under a confocal microscope (MRC 1024; Bio-Rad, Natford, UK) equipped with a Krypton/Argon laser. A two lines 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). Control slices were processed without primary antisera.

2.5. Drugs

Drugs were dissolved in Ringer solution from stock solutions prepared daily and administered using gravity-driven superfusion system. The time required for obtaining equilibrated concentrations of the drugs in the recording chamber was of 5–6 min. All the drugs including: 5-hydroxytryptamine (5-HT), *N*-[2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-*N*-(2-pyridyl)cyclohexanecarboxamidemecamylamine (WAY100635), (MEC), methyllycaconitine (MLA), dihydro-β-erythroidine hydrobromide (DHβE), as well as biocytin, were purchased from Sigma–Aldrich RBI.

2.6. Data analysis

Offline analysis of the data was performed using Clampfit 8 (Axon Instruments, Union City, CA) and graphing and statistical software packages (Origin v.6. Microcal, Northampton, MA and Systat, Richmond, CA). Unless stated otherwise, data are expressed as means ± SEM. Statistical comparisons between samples were made by two- and three-way repeated measures of ANOVA. Comparisons of means between two groups were achieved using the *t*-test. Differences were considered significant for *P* < 0.05.

3. Results

3.1. Serum corticosterone levels

In sham-operated rats, the value of plasma corticosterone concentration was of 24.1 ± 2.6 ng/ml (*n* = 9) for samples collected at 08:00 h and of 160.7 ± 1.9 ng/ml (*n* = 9) for samples collected at 19:00 h. For a 12:12 h light/dark cycle with lights on at 07:00 h, these timings are representative of the trough and peak of the corticosterone rhythm (Ishikawa et al., 1995). In Adx + CSR rats, plasma corticosterone levels, measured at 08:00 h, were 100 ± 15.5 ng/ml, *n* = 9 (Fig. 1A).

3.2. Body weight

The increase in body weight was assessed in normal rats, in sham-operated rats and in rats adrenalectomised and implanted subcutaneously, during 14 days, with a pellet containing 75 mg corticosterone (Adx + CSR animals) (Fig. 1B). The mean body weights

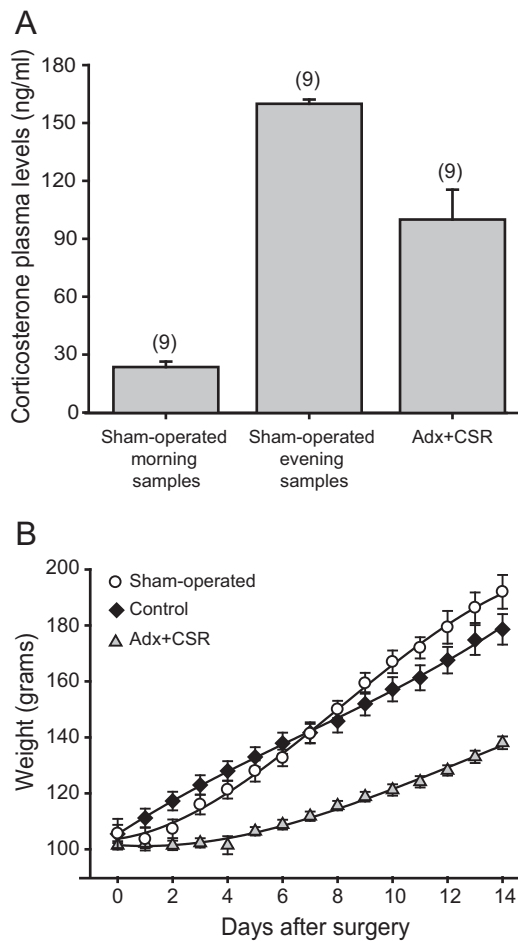


Fig. 1. (A) Corticosterone levels in sham-operated animals and in adrenalectomised animals implanted with corticosterone pellets. Results are presented as means \pm SEM. (B) Cumulative curves of body weight gain obtained from control animals ($n = 10$), sham-operated animals ($n = 15$) and Adx + CSR animals ($n = 33$). Results are presented as means \pm SEM. Data obtained from the animals of the three groups were compared using two-way repeated measures of ANOVA. The weight gain curve of Adx + CSR rats (gray triangles) was significantly different from the ones of control (black rhombs) and sham-operated animals (open circles) ($P < 0.001$). Weight gain curves obtained from sham and control groups were not significantly different.

of animals from the three groups in day 0 (before surgery was applied to sham and Adx + CSR groups) were very similar: control group = 105 ± 3.25 g ($n = 10$); sham-operated group = 103 ± 7.27 g ($n = 15$); Adx + CSR = 101 ± 1.49 g ($n = 33$).

After 14 days, body weight gain was similar in sham-operated rats to control rats but was much slower in the Adx + CSR than the other two groups. The weight gain curves of control and sham operated animals were not significantly different from each other but were both significantly different from the weight gain curve of Adx + CSR animals (two-way repeated measures of ANOVA, $P < 0.05$).

3.3. Electrophysiological and anatomical characteristics of 5-HT DRN neurons

A total of 92 identified 5-HT DRN neurons were recorded from Adx + CSR rats and 95 identified 5-HT DRN neurons were recorded from sham-operated rats. All recordings were performed in neurons encountered in the midline of DRN. Preference was given to cells with higher diameter, a morphological characteristic of 5-HT DRN neurons (Bitner and Nikkel, 2002). The duration of action

potentials of 5-HT DRN neurons (3.34 ± 0.19 ms, $n = 17$, measured at the base, Fig. 2A, upper trace) was significantly higher than the one of non-5-HT DRN neurons (1.77 ± 0.07 ms, $n = 7$; Fig. 2B, upper trace) (t -test, $P < 0.001$). We found that 86% of the identified 5-HT DRN neurons exhibited an inflexion in the descending phase of the action potential (Fig. 2A, upper trace) as previously reported (Galindo-Charles et al., 2008). 5-HT neurons exhibited longer afterhyperpolarizations (150 ± 10.21 ms, $n = 17$, Fig. 2A, middle trace) than non-5-HT neurons (108.45 ± 19.65 ms, $n = 7$, Fig. 2B, middle trace) (t -test, $P < 0.05$). Upon application of a protocol of depolarizing pulses, 5-HT neurons exhibited a slow rhythmical firing pattern that did not exceed 16 Hz with maximal depolarizing stimuli of 175 pA (Fig. 2A, bottom trace). In contrast, non-5-HT neurons exhibited firing frequencies in excess of 20 Hz (Fig. 2B, bottom trace).

In order to select inline putative 5-HT DRN neurons, the intensity–frequency protocol was applied to each neuron. The electrophysiological criteria used for identification of 5-HT DRN neurons were: action potentials with durations higher than 3 ms, long-lasting after hyperpolarizations (>120 ms) and low frequencies of firing upon application of depolarizing stimuli.

3.4. Adrenalectomy and corticosterone replacement therapy do not alter significantly the intrinsic electrophysiological properties of 5-HT DRN neurons

In this experimental group, a total of 20 identified 5-HT neurons were recorded from 14 Adx + CSR rats and 17 neurons were recorded from 14 sham rats. All recordings were performed in current clamp mode, according to the protocol described in Section 2.2.

In identified 5-HT neurons obtained from Adx + CSR rats, the duration of APs (3.51 ± 0.19 ms, $n = 20$) was not significantly different (t -test, $P > 0.05$) to that found in 5-HT DRN neurons from sham-operated animals (3.34 ± 0.20 ms, $n = 17$). Likewise, the duration of AHPs was very similar in both Adx + CSR (156.82 ± 14.56 ms, $n = 20$) and sham-operated groups (150.98 ± 10.21 ms, $n = 17$). Chronic exposure to corticosterone also failed to alter membrane resistance (418.31 ± 29.53 M Ω , ($n = 17$ sham) and 414.77 ± 20.27 M Ω ($n = 20$ Adx + CSR). Moreover, the intensity–frequency curves were not significantly different in sham-operated versus Adx + CSR animals (not shown).

3.5. The prevalence of nicotine inhibitory effects upon 5-HT DRN neurons is increased in Adx + CSR rats

In this experimental group a total of 27 identified 5-HT neurons were recorded from 21 sham-operated rats and 24 neurons from 19 Adx + CSR rats.

In slices obtained from sham-operated animals, bath administration of nicotine (1 μ M) increased the firing frequency of all 5-HT DRN neurons studied ($n = 15$) (continuous current clamp recordings, Fig. 3A and B). On average the firing rate increased 2.34-fold. Nicotine also induced an upward shift of the intensity–frequency (I – F) curves ($n = 7$, Fig. 3C), associated with an increase in membrane resistance by $9.4 \pm 1.97\%$ ($n = 7$). The intensity–frequency curves of 5-HT DRN neurons obtained in control conditions and in presence of nicotine were statistically different (two-way repeated measures of ANOVA, $P < 0.05$).

In contrast, in Adx + CSR animals ($n = 12$) nicotine induced (continuous current clamp recordings), a decrease in firing rate of 5-HT DRN neurons in 9 cells (75%) (Fig. 3D and E), an increase in firing frequency in 2 cells (16.7%) and no effects in 1 cell (8.3%). The nicotine-induced decrease in firing rate was accompanied by a decrease in membrane resistance by $16.5 \pm 3.05\%$ ($n = 7$) and

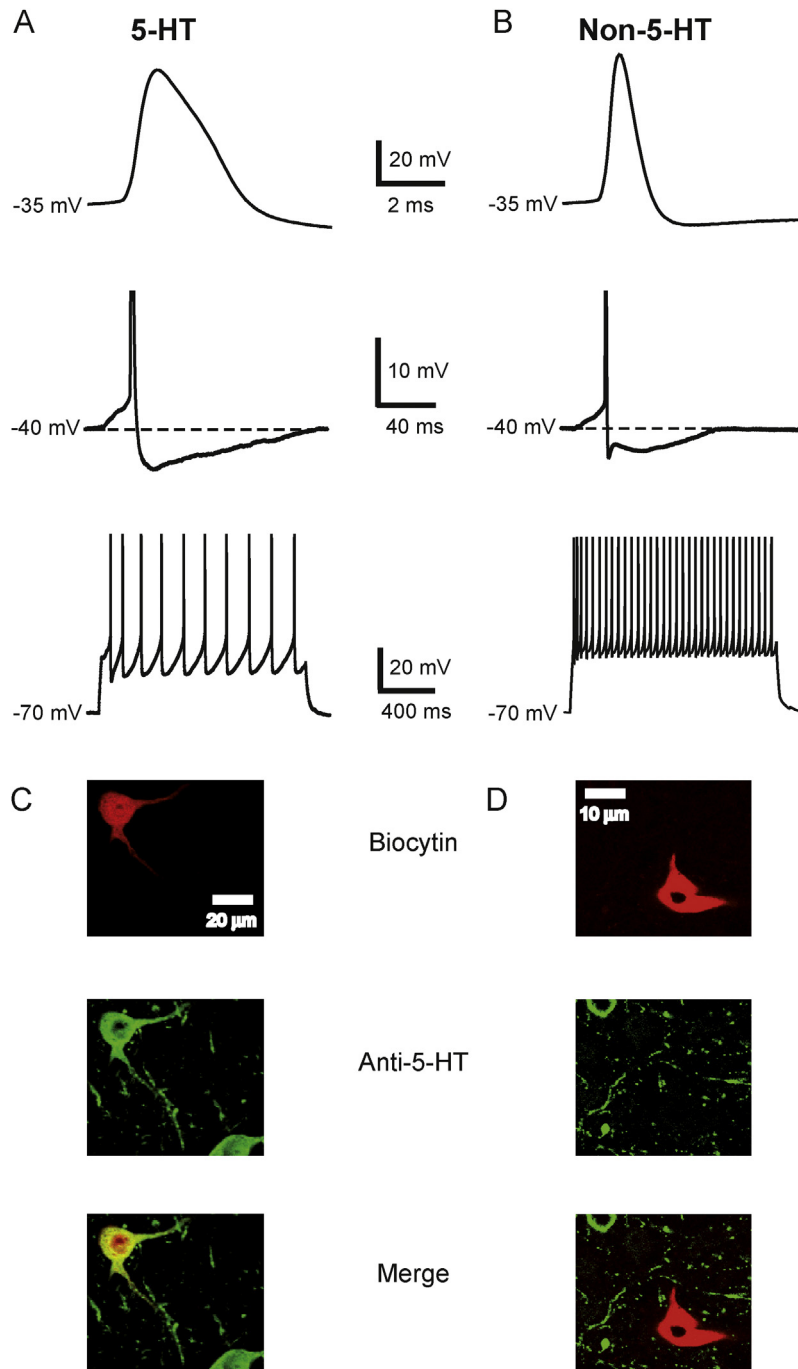


Fig. 2. (A) Electrophysiological characteristics of a 5-HT DRN neuron. Note the large duration of the spike (3.5 ms measured at the base, top trace), and of the posthyperpolarization (129 ms, middle trace), as well as the low frequency of firing upon application of a depolarizing pulse of current (7 Hz at 175 pA, bottom trace); (B) electrophysiological characteristics of a non-5-HT DRN neuron. Note the short durations of the action potential (1.6 ms at the base, upper trace) and of the after hyperpolarization (78 ms, middle trace) as well as the high firing rate upon application of a depolarizing pulse (21 Hz at 175 pA, bottom trace); (C) 5-HT immunoreactivity of the cell whose electrophysiological characteristics are presented in Fig. 2A; upper image presents biocytin staining of the recorded cell, middle image presents positive 5-HT immunoreactivity; bottom image represents the superposition of the upper and middle images, allowing to identify the recorded cell as 5-HT; (D) 5-HT immunoreactivity of the cell whose electrophysiological characteristics are presented in Fig. 2B; upper image biocytin staining of the recorded cell; middle image-5-HT immunoreactivity; bottom image – superposition of upper and middle images allowing to identify the recorded cell as non-5-HT.

a downward displacement of the I - F curves (Fig. 3F). A higher increase of the inward rectifying current could also be observed after nicotine administration in the Adx + CSR group (Fig. 4B and C, voltage clamp experiments, $n = 5$) compared to the control group (Fig. 4A and C, $n = 5$). Nicotine's inhibitory effects observed in 5-HT neurons of Adx + CSR rats were long lasting, with a mean value of 35.3 ± 9 min ($n = 9$).

3.6. 5-HT DRN neurons obtained from Adx + CSR rats showed increased serotonin-dependent inward rectifying current

In this experimental group a total of 5 identified 5-HT neurons were recorded from 5 sham-operated rats and 5 neurons from 4 Adx + CSR rats. All recordings were performed in voltage clamp mode, according to the protocol described in Section 2.2.

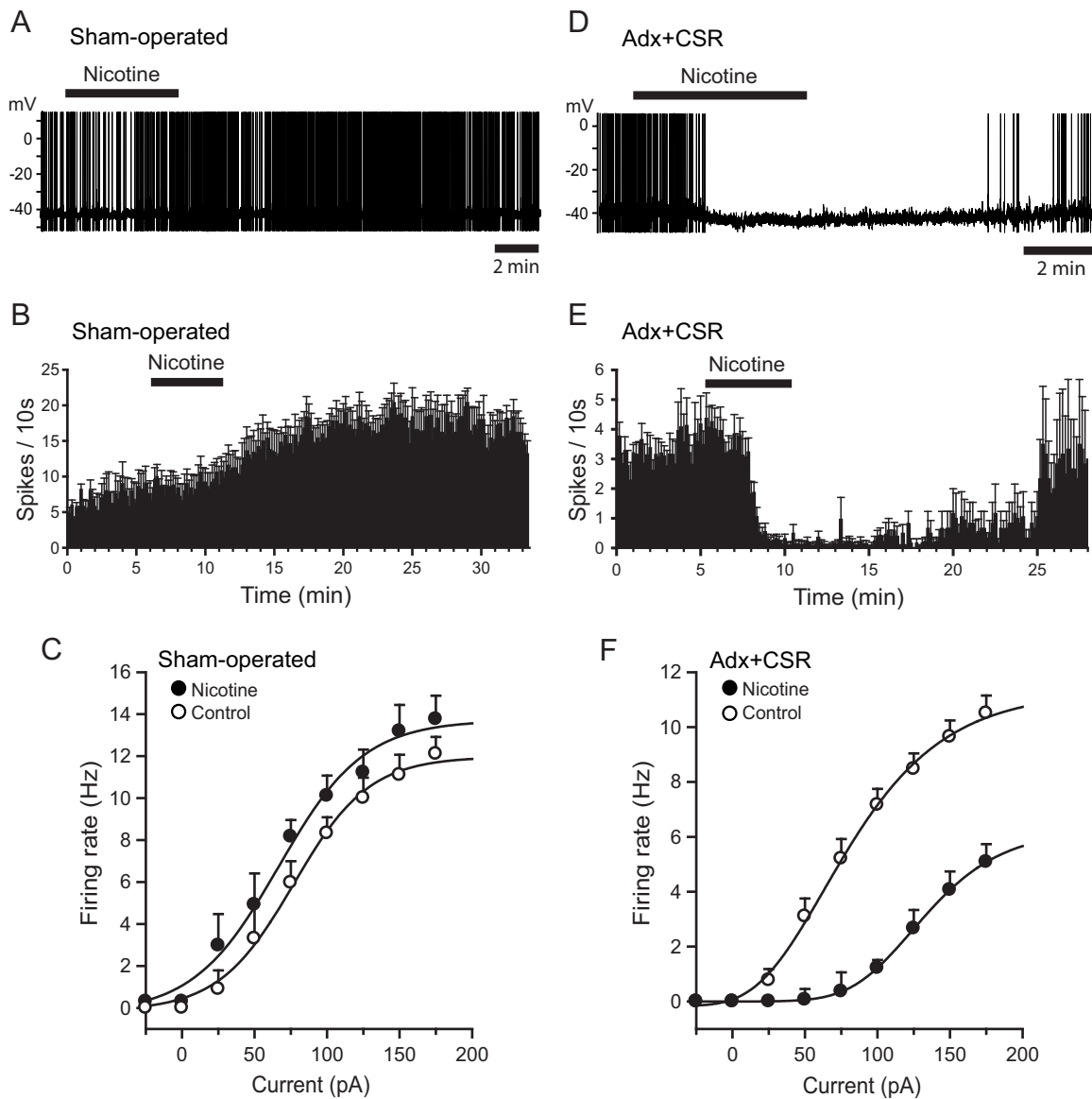


Fig. 3. Comparative effects of nicotine on identified 5-HT DRN neurons obtained from sham-operated and Adx+CSR rats. (A) Stimulatory effect of bath application of nicotine ($1 \mu\text{M}$) on the firing rate of a 5-HT DRN neuron from the sham-operated group. (B) Frequency histogram showing the increase in firing rate induced by nicotine ($1 \mu\text{M}$) in neurons obtained from sham-operated rats; data represent means \pm SEM ($n=15$). (C) Upward shift of the intensity–frequency curves of 5-HT DRN neurons from sham-operated rats ($n=7$) after nicotine administration (closed circles). (D) Inhibitory effect of nicotine ($1 \mu\text{M}$) on the firing rate of a 5-HT DRN neuron from the Adx+CSR group. (E) Frequency histogram showing the transitory inhibition of the firing rate induced by nicotine ($1 \mu\text{M}$) in Adx+CSR neurons; data represent means \pm SEM ($n=9$). (F) Downward shift of the intensity–frequency curves obtained from Adx+CSR 5-HT DRN neurons ($n=7$) after nicotine administration (closed circles).

Fig. 4 illustrates the potassium inward rectifying current generated by 5-HT ($3 \mu\text{M}$), in 5-HT DRN neurons obtained from sham-operated (Fig. 4D and F, $n=5$) and Adx+CSR animals (Fig. 4E and F, $n=5$). It can be observed that in 5-HT DRN neurons from Adx+CSR group, serotonin produced a significantly higher inward rectifying current than in sham-operated animals. Thus, the hyperpolarizing step of -125 mV produced a serotonin-dependent inward rectifying current of $55.03 \pm 17.90 \text{ pA}$ ($n=5$) in sham-operated animals and $149.86 \pm 18.48 \text{ pA}$ ($n=5$) in Adx+CSR animals (Fig. 4F). Please note the high similarity between the increases of the inward rectifying currents induced by serotonin ($3 \mu\text{M}$) and nicotine ($1 \mu\text{M}$) in 5-HT DRN neurons from the Adx+CSR neurons.

3.7. Blocking 5-HT_{1A} receptors converts nicotine's inhibitory effects upon 5-HT DRN neurons into stimulatory ones

In this experimental group a total of 12 identified 5-HT neurons were recorded from 9 sham-operated rats and 12 neurons from 8 Adx+CSR rats.

In brain slices obtained from sham-operated animals, bath administration of the selective 5-HT_{1A} receptor blocker WAY100635 (25 nM) increased the firing frequency of all 5-HT DRN neurons studied by a mean value of 1.2 times (from $0.76 \pm 0.14 \text{ Hz}$ up to 0.91 ± 0.06 , $n=6$). In presence of WAY100635 (25 nM), nicotine ($1 \mu\text{M}$) significantly increased the firing rate of all 5-HT DRN neuron up to $3.87 \pm 0.25 \text{ Hz}$ ($n=6$) (continuous current clamp,

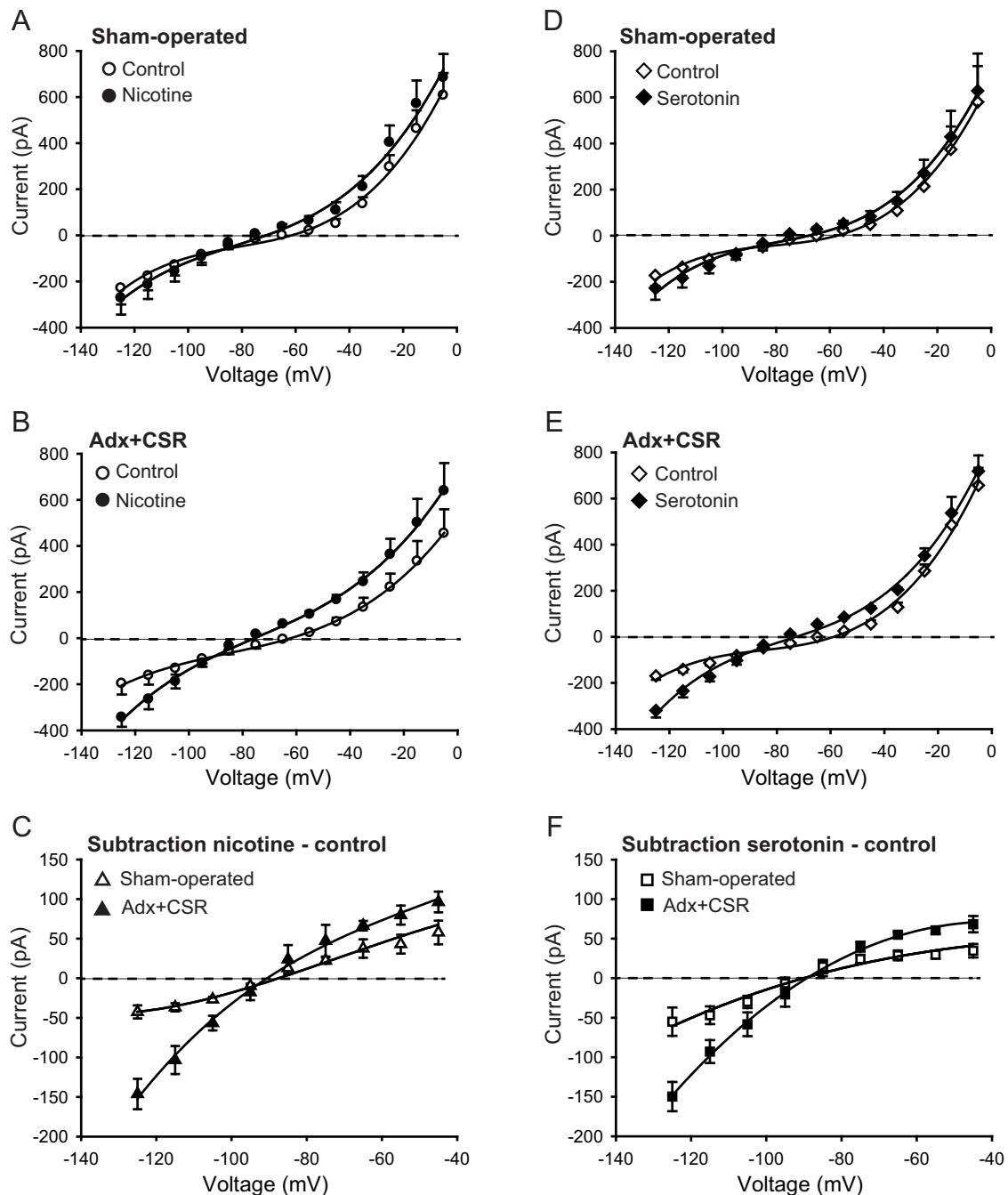


Fig. 4. Both nicotine ($1 \mu\text{M}$) and serotonin ($3 \mu\text{M}$) increase in the inward rectifier current in 5-HT DRN neurons from Adx+CSR rats. (A) Current–voltage curve showing a small increase of the inward rectifying current produced by nicotine ($1 \mu\text{M}$) in a 5-HT DRN neuron from the sham-operated group. The results are presented as means \pm SEM ($n=5$) (B) Current–voltage curve showing an increase in the inward rectifying current produced by nicotine ($1 \mu\text{M}$) in a 5-HT DRN neuron from the Adx + CSR group (closed circles). The results are presented as means \pm SEM ($n=5$). (C) Nicotine-induced currents in 5-HT DRN neurons from sham-operated (open triangles) and Adx + CSR groups: note the increase in the inward rectifying current in the Adx + CSR group. Results are presented as means \pm SEM ($n=5$). (D) Current–voltage curve indicating a reduced effect of serotonin ($3 \mu\text{M}$) upon the inward rectifying current 5-HT DRN neurons from the sham-operated group. The results are presented as means \pm SEM ($n=5$). (E) Current–voltage curve indicating an increase in the inward rectifier current by serotonin ($3 \mu\text{M}$) in 5-HT DRN neurons from the Adx + CSR group. The results are presented as means \pm SEM ($n=5$). (F) Inward rectifying current induced by serotonin ($3 \mu\text{M}$) in 5-HT DRN neurons from sham-operated (open squares) and Adx + CSR groups. Please note the similarity between serotonin and nicotine effects (Fig. 4C). The curves were obtained by subtracting the values of the inward rectifying current obtained before serotonin administration from the values obtained after serotonin administration in both sham-operated and Adx + CSR groups. Results are presented as means \pm SEM ($n=5$).

Fig. 5A and C), a frequency 5.1 times higher than control. In comparison, in absence of WAY100635, nicotine ($1 \mu\text{M}$) increased the firing rate of 5-HT DRN neurons by only 2.34 times (from 0.71 ± 0.11 up to 1.69 ± 0.2 Hz, $n=15$).

In slices obtained from Adx + CSR animals, WAY100635 (25 nM) induced an increase in firing rate of all 5-HT neurons studied, by a mean value of 1.77 times (from 0.72 ± 0.21 up to 1.28 ± 0.25 , $n=6$,

(continuous current clamp recordings). In presence of WAY100635 (25 nM), nicotine ($1 \mu\text{M}$) induced in an increase in firing frequency of all 5-HT DRN neurons by 2.91 times, up to 2.10 ± 0.42 , $n=6$ (Fig. 5B and C). The importance of the 5-HT_{1A} receptor stimulation in the inhibitory effects of nicotine upon 5-HT DRN neurons in Adx + CSR preparations is illustrated by Fig. 5D. Administration of nicotine produced a complete inhibition of the firing

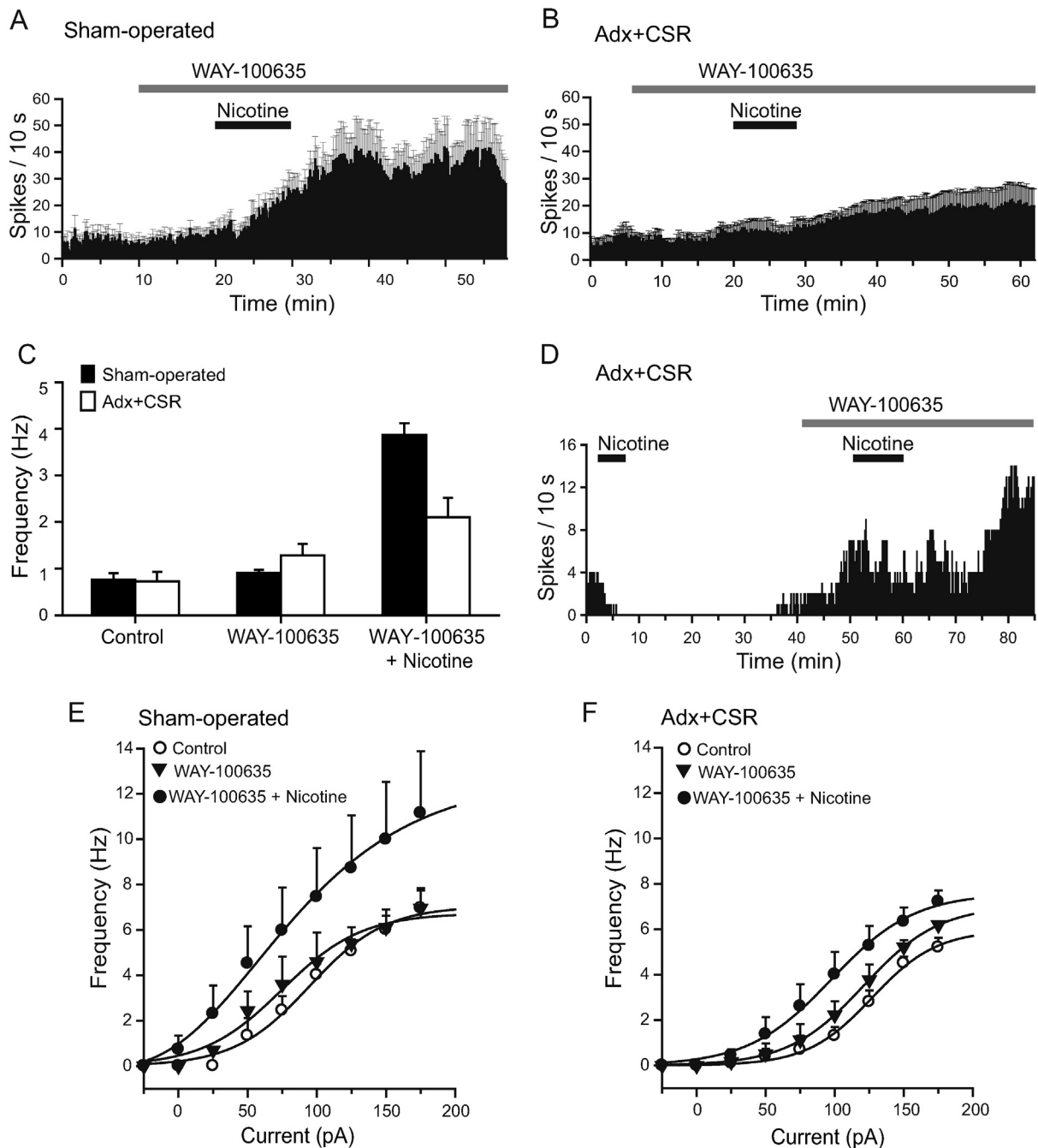


Fig. 5. The selective 5-HT_{1A} receptor blocker, WAY100635 (25 nM) suppressed nicotine-induced inhibitory effect upon 5-HT DRN neurons obtained from Adx + CSR rats. (A) In the presence of WAY100635, nicotine (1 μ M) increased the firing rate of 5-HT DRN neurons obtained from sham-operated rats (frequency histogram, results are expressed as means \pm SEM, $n = 6$). (B) Nicotine, in presence of WAY100635, increases the firing rate of Adx + CSR 5-HT DRN neurons (frequency histogram, results expressed as means \pm SEM, $n = 6$); (C) firing frequency of 5-HT DRN neurons obtained from sham-operated (black bars) and Adx + CSR rats (white bars) in three conditions: control, after WAY100635 and after WAY100635 + nicotine ($n = 6$ for each group). (D) Frequency histogram of a 5-HT DRN neuron obtained from an Adx + CSR rat. The administration of nicotine in absence of WAY100635 produces the inhibition of the firing rate that recovers after approx. 30 min. Adding WAY100635 to the perfusate induces an increase in firing rate. In presence of WAY100635, nicotine induces a transient decrease in firing rate followed by a sustained increase. (E) In 5-HT DRN neurons from sham-operated animals, WAY100635 25 nM (open circles) and the combination of nicotine (1 μ M) and WAY100635 (25 nM, closed triangles) displaced upwards and to the left the intensity–frequency curve ($n = 6$). (F) Intensity–frequency curves obtained from Adx + CSR 5-HT DRN neurons; WAY100635 produced a shift upwards and to the left of the intensity–frequency curve (open circles), an further incremented by combining WAY100635 with nicotine (closed triangles) ($n = 6$).

activity of a 5-HT DRN neuron. After removing nicotine from the perfusate, the spontaneous firing activity recovered. Bath administration of WAY100635 (25 nM) produced an increase in firing rate and the addition of nicotine (1 μ M) further augmented the firing rate.

The statistical analysis of the changes in firing frequency induced by nicotine in presence of WAY100635 in sham-operated

and Adx + CSR animals was performed using the two-way repeated measures of ANOVA. This analysis indicated that: (1) nicotine associated with WAY100635 significantly increased the firing rate of 5-HT DRN neurons in Adx + CSR and sham-operated groups; (2) the increases in firing rate induced by WAY100635 in the Adx + CSR and sham-operated groups were statistically significant; (3) the increase in firing rate induced by nicotine combined with

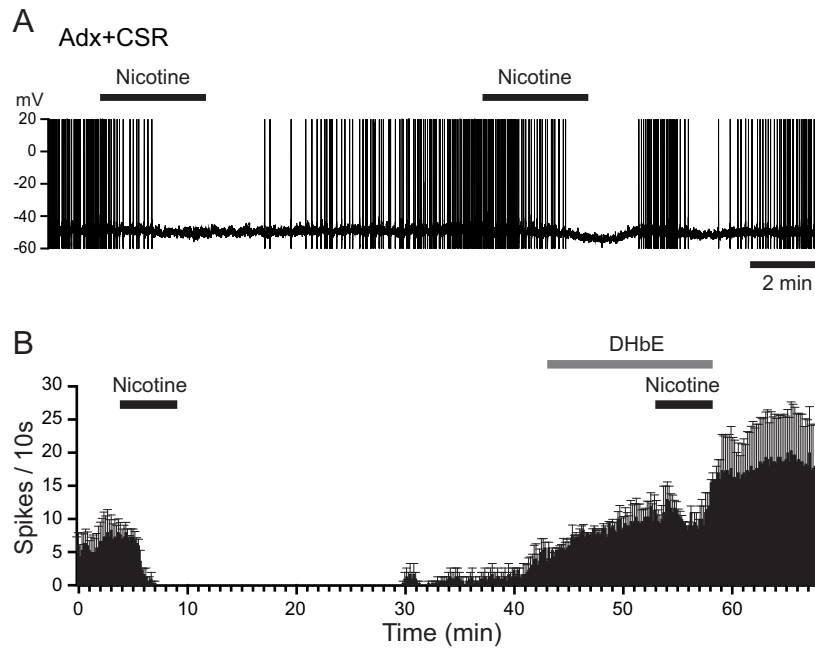


Fig. 6. Dihydro- β -erythroidine (DH β E), a selective antagonist at α 4 β 2 nAChRs, blocks the inhibitory effects of nicotine upon 5-HT DRN neurons obtained from Adx + CSR rats. (A) Brief (3 min), repeated administrations of nicotine (1 μ M) produced reproducible inhibitory effects on the firing of an identified 5-HT DRN neurons obtained from an Adx + CSR rat. (B) Frequency histogram showing that prolonged (8 min) administration of nicotine (1 μ M) produces a long-lasting inhibition of 5-HT DRN neuron firing. After recovery, administration of DH β E 100 (nM) blocked the inhibitory effect of nicotine (1 μ M). The results are presented as means \pm SEM ($n = 5$).

WAY100635 in the sham-operated group was significantly higher than in the Adx + CSR group.

In slices obtained from both sham-operated (Fig. 5E) and Adx + CSR animals (Fig. 5F), WAY100635 (25 nM) diminished the threshold current necessary for inducing neuronal firing and increased the firing frequency per depolarizing step of I - F curves recorded in current clamp mode, which resulted in a displacement to the left and upwards of these curves. Adding nicotine (1 μ M) to WAY100635 (25 nM), induced a further displacement to the left and upwards of the I - F curves (Fig. 5E and F). The Three Way Analysis of Variance of the I - F curves obtained from 5-HT neurons of sham-operated and Adx + CSR animals indicated that: (1) both WAY100635 and nicotine produced significant increases in firing rate as compared to controls and to each other ($DF = 2$, $F = 25.52$, $P < 0.001$). (2) The I - F curves obtained from sham-operated and Adx + CSR animals were significantly different ($DF = 1$, $F = 19.18$, $P < 0.05$).

3.8. Blocking α 4 β 2 nAChRs prevents nicotine's inhibitory effects on 5-HT DRN neurons from Adx + CSR rats

In this experimental group a total of 12 identified 5-HT neurons were recorded from 10 sham-operated rats and 12 neurons from 9 Adx + CSR rats. All experiments were performed in current clamp mode with continuous recordings.

Pre-treatment of brain slices obtained from sham-operated animals with DH β E (100 nM), a selective α 4 β 2 nAChR blocker, did not suppress nicotine's stimulatory effects on dorsal raphe neuron firing frequency ($n = 6$) (not shown). In slices obtained from Adx + CSR rats, pre-treatment with DH β E (100 nM) converted nicotine's inhibitory effects on 5-HT DRN neurons in stimulatory ones ($n = 6$). In Fig. 6A, an administration of nicotine lasting approx. 3 min produced, short-lasting inhibitory effects on the firing rate of a 5-HT DRN neuron. In Fig. 6B, obtained by averaging data from 5 experiments, administrations of nicotine lasting approx. 8 min produced long-lasting (≈ 30 min) inhibitions of the firing rate of identified 5-HT DRN neurons. Administration DH β E prevented the inhibition of

5-HT DRN neurons induced by nicotine. In contrast, MLA (a selective α 7 nAChR blocker, 10 nM) did not block the nicotine's inhibitory effects on 5-HT DRN neuron firing rate (data not shown).

4. Discussion

4.1. Effects of corticosterone on body weight gain

We used the experimental model of bilateral adrenalectomy associated with subcutaneous administration of corticosterone in pellets. This procedure resulted in plasma corticosterone levels of ≈ 100 ng/ml, associated with a 75% decrease in body weight gain during a 14 days period. Similar results were reported by Akana et al. (1985) using bilateral adrenalectomy and 50 mg corticosterone pellets. The lower corticosterone content of their pellets resulted in lower plasma corticosterone levels (80 ng/ml) and in a smaller decrease in body weight gain ($\sim 25\%$).

Akana et al. (1985) also demonstrated that plasma corticosterone levels higher than 75 ng/ml diminish the rate of body weight increase due to a decrease in food intake produced by a decrease in appetite. More recently, Donner et al. (2012) explained the decrease in the rate of body weight gain induced by corticosterone through an increase in the catabolism of lipids and muscular proteins.

Although the plasma corticosterone levels in Adx + CSR were measured only in the morning, we infer that these levels were similar during all day, due to the high values obtained and by analogy with other studies using a similar experimental model (Akana et al., 1985). Therefore we consider that the experimental model we used reproduced the flat profile of plasma glucocorticoids levels observed in patients with major depression (Weber et al., 2000).

4.2. Lack of effect of corticosterone replacement therapy on intrinsic properties of DRN 5-HT neurons

The data of our study indicate that several properties of 5-HT DRN neurons (action potential duration, spike amplitude, after

hyperpolarization duration and amplitude, membrane resistance and intensity–frequency relationship) were not significantly modified by flat plasma corticosterone levels.

Activation of glucocorticoid receptors of hippocampal CA1 pyramidal cells enhanced gene-mediated transcription of high voltage activated L- and P-type but not N-type Ca^{2+} channels (Nair et al., 1998), which led to increases in the amplitude of depolarization-induced Ca^{2+} currents and to activation of Ca^{2+} -dependent K^+ channels. As a consequence, the amplitude and duration of the fast and slow post hyperpolarizations increased and the firing frequency produced by application of depolarizing stimuli decreased (Joels and Kloet, 1989). This type of effect was not observed in our experiments, probably because 5-HT DRN neurons express mostly N-type and N-type-like Ca^{2+} channels (which are not upregulated by corticosterone) but do not express P-type and few L-type Ca^{2+} channels (Penington and Fox, 1995). Another possible explanation is that 5-HT DRN neurons release continuously small amounts of serotonin inside DRN, which inhibit their own Ca^{2+} channels by activating 5-HT_{1A} autoreceptors (Penington et al., 1991).

4.3. The prevalence of the inhibitory response of 5-HT DRN neurons to nicotine is increased in Adx + CSR rats

Previous studies, as well as the present one, indicated that nicotine, applied to brain slices from control animals, induces more frequently the stimulation (65–100% of cells) than the inhibition (0–30% of cells) of 5-HT DRN neurons (Li et al., 1998; Mihailescu et al., 1998, 2002; Chang et al., 2011). The stimulatory effect of nicotine on 5-HT DRN neurons is direct, mediated by somatodendritic $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nAChRs (Galindo-Charles et al., 2008) and indirect, dependent on glutamate (Garduño et al., 2012; Chang et al., 2011) and noradrenaline release in the DRN (Li et al., 2008). The inhibitory effect of nicotine on 5-HT DRN neurons is dependent on somatodendritic release of serotonin, which then acts on 5-HT_{1A} autoreceptors to hyperpolarize 5-HT DRN neurons (Li et al., 1998; Mihailescu et al., 1998, 2002).

In the present study, application of nicotine increased the firing rate of all 5-HT DRN neurons studied in the sham group, whereas it produced prolonged inhibitory effects in 75% of the 5-HT DRN neurons in brain slices obtained from Adx + CSR rats. Pre-treatment of 5-HT DRN neurons with the selective 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY100635 changed this inhibitory effect of nicotine into a stimulatory one. Moreover, in 5-HT DRN neurons from the Adx + CSR group, nicotine increased the inward rectifying current, an effect considered characteristic for activation of 5-HT_{1A} autoreceptors (Penington et al., 1993). These data indicate that the inhibitory effect of nicotine was due to serotonin release, which stimulated somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors (Penington et al., 1991).

Therefore, the mechanism of nicotine-induced inhibition of 5-HT DRN neurons observed in Adx + CSR rats is not different from the one observed in normal animals. It had however a higher intensity in Adx + CSR rats. The difference may be explained by corticosterone-induced increase in affinity of 5-HT_{1A} receptor (Bellido et al., 2004), by an increased synthesis of serotonin, since corticosterone increases the activity of type 1 (Abumaria et al., 2008) and type 2 (Malek et al., 2007; Donner et al., 2012) tryptophan hydroxylase and by a corticosterone-dependent decrease in serotonin re-uptake (Baganz et al., 2010).

The increase in firing rate of 5-HT DRN neurons produced by nicotine was significantly higher in sham-operated than in Adx + CSR rats. This suggests the presence of another mechanism that reduces the stimulatory effects of nicotine on 5-HT DRN neurons. A recent study from our laboratory (Garduño et al., 2012) indicated that one of the stimulatory mechanisms of nicotine upon 5-HT DRN neurons is an increase in their glutamatergic input. On the other hand, in a recent study of Wang et al. (2012), it was

shown that glucocorticoids decrease the glutamatergic input to 5-HT neurons by stimulating a membrane, G-protein coupled, postsynaptic receptor of 5-HT DRN neurons. However this inhibitory mechanism is a rapid, non-genomic one. It would be of interest to determine if chronic exposure to glucocorticoids also decreases the glutamatergic input to 5-HT DRN neurons. On the other hand, in the study of Judge et al. (2004), phenylephrine (a selective agonist at α_1 -adrenoreceptors) produced a smaller stimulatory effect in 5-HT DRN neurons chronically exposed to high and flat levels of corticosterone than in 5-HT DRN neurons exposed to low plasma corticosterone levels. Li et al. (1998) reported that nicotine stimulatory effect upon 5-HT DRN neurons depends, at least in part, on presynaptic release of noradrenaline inside DRN. Therefore the smaller stimulatory effect of nicotine upon 5-HT DRN neurons from Adx + CSR rats may be due to a reduced stimulatory effect of released noradrenaline in presence of flat levels of plasma corticosterone.

4.4. The function of 5-HT_{1A} autoreceptors is increased in Adx + CSR rats

The inward rectifying potassium current induced by serotonin was significantly higher in Adx + CSR than in sham-operated rats. Therefore, in our experimental model the function of 5-HT_{1A} autoreceptors was increased. This finding is the opposite of the one issuing from other studies. Thus, chronic *via oral* administration of corticosterone in intact rats reduced the inhibitory response of 5-HT DRN neurons to serotonin (Fairchild et al., 2003). Leitch et al. (2003) reported that chronic corticosterone administration through subcutaneous pellets decreased the inhibitory effect 8-OH-DPAT (a specific agonist of 5-HT_{1A} receptors) on serotonin release in the rat hippocampus. Likewise, administration of high doses of corticosterone to intact mice (Man et al., 2002) produced desensitization of somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors. However, in the study of Judge et al. (2004), pellet administration of corticosterone in adrenalectomised rats produced an increased function of 5-HT_{1A} autoreceptors when plasma corticosterone levels were flat and elevated. This study was performed in brain slices obtained from adrenalectomised rats implanted with 70 mg corticosterone pellets, an experimental model equal to ours. Analyzing of the available data in the literature, we noticed that the desensitization of 5-HT_{1A} autoreceptors in presence of high levels of corticosterone was always observed in studies in which the animals were not adrenalectomised (Fairchild et al., 2003; Leitch et al., 2003), whereas in the studies in which adrenalectomy was performed (Judge et al., 2004; present study), there was an increase in 5-HT_{1A} receptor function. Adrenalectomy does not suppress only the production of corticosteroids but also the production of adrenaline. Recent studies indicated that stimulation of peripheral $\beta 2$ and $\beta 3$ -adrenoreceptors (Tsuiki et al., 2000; Claustre et al., 2008) increases the synthesis of serotonin in the DRN and other areas of the brain, very likely by increasing the transfer of L-tryptophan from the peripheral to the cerebral circulation through the large neutral amino acid transporter of the blood–brain barrier (Edwards et al., 1989). We hypothesize here that in adrenalectomised rats there is a lower synthesis and release of serotonin due to lower tryptophan availability, which leads to lower levels of extracellular serotonin, and therefore to a higher excitability of 5-HT_{1A} autoreceptors.

An additional explanation for the increased function of 5-HT_{1A} autoreceptors observed in our experiments is that corticosterone strongly increases the affinity of 5-HT_{1A} receptors for their agonists (Bellido et al., 2004). Likewise, corticosterone increases the activity of both type 1 (Abumaria et al., 2008) and type 2 (Malek et al., 2007) tryptophan hydroxylase in 5-HT DRN neurons, thus leading to an increase in the synthesis of serotonin. Moreover, it was also shown

that corticosterone decreases serotonin re-uptake in the hippocampus by inhibiting the organic cation transporter 3 (OCT3) (Baganz et al., 2010), which is expressed in the DRN (Amphoux et al., 2006). A corticosterone-dependent increase in 5-HT_{1A} receptor expression may be excluded since high levels of corticosterone decrease (Saenz del Burgo et al., 2013) or do not change (Fairchild et al., 2003; Neumaier et al., 2000) 5-HT_{1A} mRNA autoreceptor expression. Likewise, an increase in α 4 β 2 affinity or number may be excluded since glucocorticoids decrease the currents induced by stimulation of nAChRs (Shi et al., 2002) and do not alter α 4 β 2 nAChRs expression (Robinson et al., 1996). It was shown that chronic corticosterone diminishes the expression of mRNA encoding for type 2 subunit of inward rectifying potassium channels (Fairchild et al., 2003), which decreases the effect of 5-HT_{1A}-receptor stimulation.

4.5. Nicotine-induced serotonin release is mediated by α 4 β 2 nAChRs

The inhibition of 5-HT DRN neurons by nicotine was prevented by their pre-treatment with DH β E, a selective antagonist at α 4 β 2 nAChRs. This suggests that nicotine-induced 5-HT release is dependent on stimulation of α 4 β 2 nAChRs. The presence of α 4 β 2 nAChRs subtype in DRN 5-HT neurons was demonstrated by both immunocytochemical (Bitner et al., 2000) and electrophysiological studies (Galindo-Charles et al., 2008). It should be mentioned that previous studies suggested that nicotine-induced 5-HT release is dependent on both α 7 and α 4 β 2 nAChRs (Ma et al., 2005) or on non- α 7 nAChRs (Li et al., 1998). However, consistent with our data, behavioral studies indicated that intra-raphé administration of nicotine increases 5-HT release inside the DRN, an effect antagonized by DH β E (Seth et al., 2002, for review).

4.6. Possible clinical implications of the present study

A legitimate question is if Adx + CSR rats may be considered an animal model of depression. According to our data, to the date no behavioral studies were performed in rats with this experimental model. However, recent studies (Donner et al., 2012; Gourley and Taylor, 2009; Lee et al., 2010) have demonstrated that chronic (2 weeks to 1 month), *p.o.* administration of low doses (5–7 mg/kg per day) of corticosterone in rats and mice produces a persistent, long-lasting depressive-like state characterized by anhedonic- and helpless-like behaviors. Pellet (Leitch et al., 2003) and *per oral* (Donner et al., 2012; Gourley et al., 2008) administration of corticosterone produced similar effects on plasma corticosterone levels, hypothalamic-pituitary-adrenal activity rhythm, body and adrenal weight. For these reasons, we infer that Adx + CSR rats may represent an experimental model of depression.

An increased prevalence of the inhibitory responses to nicotine of 5-HT DRN neurons from Adx + CSR rats suggests that nicotine should worsen a depressive state associated with high and flat corticosterone levels by inhibiting the activity of 5-HT DRN neurons. In reality however the opposite occurs: the incidence of smoking is twice as high in patients with major depression than in normal population and smoking cessation induces severe depressive episodes in persons with a history of depression (Glassman et al., 1990). Several explanations may be given for this contradictory situation. Firstly, nicotine's antidepressant effects depend also on increased releases of dopamine and noradrenaline from neurons located in the ventro tegmental area and locus coeruleus, respectively (Fowler et al., 2008). Unfortunately, to the present there are no studies concerning the effects of high and flat plasma levels of corticosterone on nicotine stimulatory effects on dopamine and noradrenaline release. Secondly, in the present study, nicotine administration was performed in rats that were not previously exposed to nicotine and therefore possess non-desensitized nAChRs. A study of the

nicotine effects upon 5-HT DRN neurons obtained from Adx + CSR rats previously exposed to nicotine would be of interest. Thirdly, depression is frequently associated with anxiety and this association worsens the outcome of depression (Goldberg and Fawcett, 2012). Direct or indirect stimulation of 5-HT_{1A} autoreceptors generates a state of anxiolysis (Seth et al., 2002, for review). It may be speculated that stimulation of 5-HT_{1A} autoreceptors by nicotine-induced serotonin release will alleviate depressive symptoms by inhibiting 5-HT release in various area of the brain.

5. Conclusions

The results of the present study indicate that changing the daily pattern of plasma corticosterone levels from oscillatory to flat increases the prevalence of nicotine inhibitory effects upon 5-HT DRN neurons. The inhibition of 5-HT DRN neurons in Adx + CSR rats was due to increased function of 5-HT_{1A} autoreceptors, a conclusion that is in agreement with the one issuing from the study of Judge et al. (2004) who used a experimental model similar to ours. Intra-raphé increase in 5-HT release was mediated by stimulation of α 4 β 2 nAChRs of 5-HT neurons.

Conflict of interest

There are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Grant No. 45032M to Stefan Mihailescu and by Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) Grants No. IN220112 to Stefan Mihailescu and IN212313 to Salvador Hernandez. We thank Lorena Alline Becerril-Melendez for technical support. We would also like to thank Posgrado en Ciencias Biológicas UNAM for they help in the formation of Carmen Frías Domínguez as a PhD.

References

- Abumaria, N., Ribic, A., Anacker, C., Fuchs, E., Flügge, G., 2008. Stress upregulates TPH1 but not TPH2 mRNA in the rat dorsal raphe nucleus: identification of two TPH2 mRNA splice variants. *Cellular and Molecular Neurobiology* 28, 331–342.
- Akana, S.F., Cascio, C.S., Shinsako, J., Dallman, M.F., 1985. Corticosterone: narrow range required for normal body and thymus weight and ACTH. *American Journal of Physiology* 249, R527–R532.
- Amphoux, A., Vialou, V., Drescher, E., Brüss, M., Mannoury La Cour, C., Rochat, C., Millan, M.J., Giros, B., Bönisch, H., Gautron, S., 2006. Differential pharmacological *in vitro* properties of organic cation transporters and regional distribution in rat brain. *Neuropharmacology* 50, 941–952.
- Baganz, N., Horton, R., Martin, K., Holmes, A., Daws, L.C., 2010. Repeated swim impairs serotonin clearance via a corticosterone-sensitive mechanism: organic cation transporter 3, the smoking gun. *Journal of Neuroscience* 30, 15185–15195.
- Bellido, I., Harnsson, A.C., Gómez-Luque, A.J., Andbjør, B., Agnati, L.F., Fuxe, K., 2004. Corticosterone strongly increases the affinity of dorsal raphe 5-HT_{1A} receptors. *Neuroreport* 15, 1457–1459.
- Bitner, R.S., Nikkel, A.L., 2002. Alpha-7 nicotinic receptor expression by two distinct cell types in the dorsal raphe nucleus and locus coeruleus of rat. *Brain Research* 938 (1–2), 45–54.
- Bitner, R.S., Nickel, A.L., Curzon, P., Donnelly-Roberts, D.L., Puttfarcken, P.S., Namovic, M., Jacobs, I.C., Meyer, M.D., Decker, M.W., 2000. Reduced nicotine-mediated antinociception following *in vivo* antisense knock-down in rat. *Brain Research* 871, 66–74.
- Boden, J.M., Fergusson, D.M., Horwood, L.J., 2010. Cigarette smoking and depression: tests of causal linkages using a longitudinal birth cohort. *British Journal of Psychiatry* 196, 440–446.
- Breslau, N., Kilbey, M.M., Andreski, P., 1992. Nicotine withdrawal symptoms and psychiatric disorders: findings from an epidemiological study of young adults. *American Journal of Psychiatry* 149, 464–469.
- Chang, B., Daniele, C.A., Gallagher, K., Madonia, M., Mitchum, R.D., Barrett, L., Vezina, P., McGehee, D.S., 2011. Nicotinic excitation of serotonergic projections from dorsal raphe to the nucleus accumbens. *Journal of Neurophysiology* 106, 801–808.

- Claustre, Y., Leonetti, M., Santucci, V., Bougault, I., Desvignes, C., Rouquier, L., Aubin, N., Keane, P., Busch, S., Chen, Y., Palejwala, V., Tocci, M., Yamdagni, P., Didier, M., Avenet, P., Le Fur, G., Oury-Donat, F., Scatton, B., Steinberg, R., 2008. Effects of the beta3-adrenoceptor (Adrb3) agonist SR58611A (amibegron) on serotonergic and noradrenergic transmission in the rodent: relevance to its antidepressant/anxiolytic-like profile. *Neuroscience* 156, 353–364.
- Covey, L.S., Glassman, A.H., Stetner, F., 1990. Depression and depressive symptoms in smoking cessation. *Comprehensive Psychiatry* 31, 350–354.
- Descarries, L., Watkins, K.C., Garcia, S., Beaudet, A., 1982. The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautographic study. *Journal of Comparative Neurology* 207, 239–254.
- Diwan, A., Castine, M., Pomerleau, C., Meador-Woodruff, J., Dalack, G., 1998. Differential prevalence of cigarette smoking in patients with schizophrenic vs mood disorders. *Schizophrenia Research* 33, 113–118.
- Djuric, V., Dunn, E., Overstreet, D., Dragomir, A., Steiner, M., 1999. Antidepressant effect of ingested nicotine in female rats of flinders resistant and sensitive lines. *Physiology and Behavior* 67, 533–537.
- Donner, N.C., Montoya, C.D., Lukkes, J.L., Lowry, C.A., 2012. Chronic non-invasive corticosterone administration abolishes the diurnal pattern of tph2 expression. *Psychoneuroendocrinology* 37, 645–661.
- Drevets, W.C., Frank, E., Price, J.C., Kupfer, D.J., Holt, D., Greer, P.J., Huang, Y., Gautier, C., Mathis, C., 1999. PET imaging of serotonin 1A receptor binding in depression. *Biological Psychiatry* 46 (10), 1375–1387.
- Edwards, D.J., Sorisio, D.A., Knopf, S., 1989. Effects of the beta2-adrenoceptor agonist clenbuterol on tyrosine and tryptophan in plasma and brain of the rat. *Biochemical Pharmacology* 38, 2957–2965.
- Engberg, G., Hajos, M., 1994. Nicotine-induced activation of locus coeruleus neurons – an analysis of peripheral versus central induction. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 349, 443–446.
- Fairchild, G., Leitch, M.M., Ingram, C.D., 2003. Acute and chronic effects of corticosterone on 5-HT_{1A} receptor-mediated autoinhibition in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology* 45, 925–934.
- Ferguson, D.M., Lynskey, M.T., Horwood, L.J., 1996. Comorbidity between depressive disorders and nicotine dependence in a cohort of 16-year-olds. *Archives of General Psychiatry* 53, 1043–1047.
- Fowler, C.D., Arends, M.A., Kenny, P.J., 2008. Subtypes of nicotinic acetylcholine receptors in nicotine reward, dependence, and withdrawal: evidence from genetically modified mice. *Behavioural Pharmacology* 19, 461–484.
- Galindo-Charles, L., Hernandez-Lopez, S., Galarraga, E., Tapia, D., Bargas, J., Garduño, J., Frías-Domínguez, C., Drucker-Colín, R., Mihailescu, S., 2008. Serotonergic dorsal raphe neurons possess functional postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors. *Synapse* 62, 601–615.
- Gardier, A., 2005. Mechanism of action of antidepressant drugs: importance of genetically modified mice in the pharmacological in vivo approach. *Thérapie* 60, 469–476.
- Garduño, J., Galindo-Charles, L., Jiménez-Rodríguez, J., Galarraga, E., Tapia, D., Mihailescu, S., Hernandez-Lopez, S., 2012. Presynaptic α 4 β 2 nicotinic acetylcholine receptors increase glutamate release and serotonin neuron excitability in the dorsal raphe nucleus. *Journal of Neuroscience* 32, 15148–15157.
- Gillespie, C.F., Nemeroff, C.B., 2005. Hypercortisolemia and depression. *Psychosomatic Medicine* 67 (Suppl. 1), S26L S28.
- Glassman, A.H., Helzer, J.E., Covey, L.S., Cottler, L.B., Stetner, F., Tipp, J.E., Johnson, J., 1990. Smoking, smoking cessation, and major depression. *JAMA* 264, 1546–1549.
- Gold, P.W., Chrousos, G.P., 2002. Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRF/NE states. *Molecular Psychiatry* 7 (3), 254–275.
- Goldberg, D., Fawcett, J., 2012. The importance of anxiety in both major depression and bipolar disorder. *Journal of the Dental Auxiliaries* 29 (6), 471–478.
- Gourley, S.L., Taylor, J.R., 2009. Recapitulation and reversal of a persistent depression-like syndrome in rodents. *Current Protocol in Neuroscience*, Chapter 9: Unit 9.32.
- Gourley, S.L., Wu, F.J., Taylor, J.R., 2008. Corticosterone regulates pERK1/2 map kinase in a chronic depression model. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1148, 509–514.
- Grady, S.R., Marks, M.J., Collins, A.C., 1994. Desensitization of nicotine-stimulated [³H]dopamine release from rat striatal synaptosomes. *Journal of Neurochemistry* 62, 1390–1398.
- Holsboer, F., 2000. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology* 23, 477–501.
- Ishikawa, M., Ohdo, S., Watanabe, H., Hara, C., Ogawa, N., 1995. Alteration in circadian rhythm of plasma corticosterone in rats following socio-psychological stress induce by communication box. *Physiology and Behavior* 57 (1), 41–47.
- Joels, M., Kloet, E.R., 1989. Effects of glucocorticoids and norepinephrine on the excitability in the hippocampus. *Science* 245, 1502–1505.
- Judge, S., Ingram, C.D., Gartside, S.E., 2004. Moderate differences in circulating corticosterone alter receptor-mediated regulation of 5-hydroxytryptamine neuronal activity. *Journal of Psychopharmacology* 18, 475–483.
- Laaris, N., Haj-Dahmane, S., Hamon, M., Lanfumey, L., 1995. Glucocorticoid receptor-mediated inhibition by corticosterone of 5-HT_{1A} autoreceptor functioning in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology* 34 (9), 1201–1210.
- Lee, R.S., Tamashiro, K.L., Yang, X., Purcell, R.H., Harvey, A., Willour, V.L., Huo, Y., Rongione, M., Wand, G.S., Potash, J.B., 2010. Chronic corticosterone exposure increases expression and decreases deoxyribonucleic acid methylation of Fkbp5 in mice. *Endocrinology* 151 (9), 4332–4343.
- Leitch, M.M., Ingram, C.D., Young, A.H., McQuade, R., Gartside, S.E., 2003. Flattening the corticosterone rhythm attenuates 5-HT_{1A} autorceptor function in the rat: relevance for depression. *Neuropsychopharmacology* 28, 119–125.
- Li, X., Rainnie, D.G., McCarley, R.W., Greene, R.W., 1998. Presynaptic nicotinic receptors facilitate monoaminergic transmission. *Journal of Neuroscience* 18 (5), 1904–1912.
- Ma, Z., Strecker, R.E., McKenna, J.T., Thakkar, M.M., McCarley, R.W., Tao, R., 2005. Effects on serotonin of (–)nicotine and dimethylphenylpiperazinium in the dorsal raphe and nucleus accumbens of freely behaving rats. *Neuroscience* 135 (3), 949–958.
- Malek, Z.S., Sage, D., Pévet, P., Raison, S., 2007. Daily rhythm of tryptophan hydroxylase-2 messenger ribonucleic acid within raphe neurons is induced by corticoid daily surge and modulated by enhanced locomotor activity. *Endocrinology* 148 (11), 5165–5172.
- Man, M.S., Young, A.H., McAllister-Williams, R.H., 2002. Corticosterone modulation of somatodendritic 5-HT_{1A} receptor function in mice. *Journal of Psychopharmacology* 16 (3), 245–252.
- Meyer, J.S., Micco, D.J., Stephenson, B.S., Krey, L.C., McEwen, B.S., 1979. Subcutaneous implantation method for chronic glucocorticoid replacement therapy. *Physiology and Behavior* 22 (5), 867–870.
- Mihailescu, S., Palomero-Rivero, M., Meade-Huerta, P., Maza-Flores, A., Drucker-Colín, R., 1998. Effects of nicotine and mecamlamine on rat dorsal raphe neurons. *European Journal of Pharmacology* 360, 31–36.
- Mihailescu, S., Guzmán-Marín, R., Drucker-Colín, R., 2001. Nicotine stimulation of dorsal raphe neurons: effects on laterodorsal and pedunculopontine neurons. *European Neuropsychopharmacology* 11 (5), 359–366.
- Mihailescu, S., Guzmán-Marín, R., Domínguez, M.C., Drucker-Colín, R., 2002. Mechanisms of nicotine actions on dorsal raphe neurons. *European Journal of Pharmacology* 452, 77–82.
- Nair, S.M., Werkman, T.R., Craig, J., Finnell, R., Joëls, M., Eberwine, J.H., 1998. Corticosteroid regulation of ion channel conductances and mRNA levels in individual hippocampal CA1 neurons. *Journal of Neuroscience* 18 (7), 2685–2696.
- Neumaier, J.F., Sexton, T.J., Hamblin, M.W., Beck, S.G., 2000. Corticosteroids regulate 5-HT 1A but not 5-HT 1B receptor mRNA in rat hippocampus. *Molecular Brain Research* 82, 65–73.
- Parsey, R.V., Ogden, R.T., Miller, J.M., Tin, A., Hesselgrave, N., Goldstein, E., Mikhno, A., Milak, M., Zanderigo, F., Sullivan, G.M., Oquendo, M.A., Mann, J.J., 2010. Higher serotonin 1A binding in a second major depression cohort: modeling and reference region considerations. *Biological Psychiatry* 68 (2), 170–178.
- Penington, N.J., Fox, A.P., 1995. Toxin-insensitive Ca²⁺ current in dorsal raphe neurons. *Journal of Neuroscience* 15 (8), 5719–5726.
- Penington, N.J., Kelly, J.S., Fox, A.P., 1991. A study of the mechanism of Ca²⁺ current inhibition produced by serotonin in rat dorsal raphe neurons. *Journal of Neuroscience* 11, 3594–3609.
- Penington, N.J., Kelly, J.S., Fox, A.P., 1993. Whole-cell recordings of inwardly rectifying K currents activated by 5-HT_{1A} receptors on dorsal raphe neurones of the adult rat. *Journal of Physiology* 469, 387–405.
- Philip, N.S., Carpenter, L.L., Tyrka, A.R., Price, L.H., 2012. The nicotinic acetylcholine receptor as a target for antidepressant drug development. *Scientific World Journal*, 104105.
- Piccio, M.R., Mineur, Y.S., 2013. Molecules and circuits involved in nicotine addiction: the many faces of smoking. *Neuropharmacology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.028>.
- Pidoplichko, V.I., DeBiasi, M., Williams, J.T., Dani, J.A., 1997. Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. *Nature* 390, 401–404.
- Robinson, S.F., Grun, E.U., Pauly, J.R., Collins, A.C., 1996. Changes in sensitivity to nicotine and brain nicotinic receptors following chronic nicotine and corticosterone treatments in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 54, 587–593.
- Saenz del Burgo, L., Cortés, R., Mengod, G., Montaña, M., García del Caño, G., Sallés, J., 2013. Chronic effects of corticosterone on GIRK1-3 subunits and 5-HT_{1A} receptor expression in rat brain and their reversal by concurrent fluoxetine treatment. *European Neuropsychopharmacology* 23 (3), 229–239.
- Salin-Pascual, R.J., Drucker-Colín, R., 1998. A novel effect of nicotine on mood and sleep in major depression. *Neuroreport* 9, 57–60.
- Sargent, P.A., Kjaer, K.H., Bench, C.J., Rabiner, E.A., Messa, C., Meyer, J., Gunn, R.N., Grasby, P.M., Cowen, P.J., 2000. Brain serotonin 1A receptor binding measured by positron emission tomography with [¹¹C]WAY-100635: effects of depression and antidepressant treatment. *Archives of General Psychiatry* 57 (2), 174–180.
- Segaloff, A., 1950. The gradation of effectiveness and absorption of desoxycorticosterone acetate pellets by dilution with cholesterol. *Endocrinology* 47 (5), 320–325.
- Semba, J., Matakai, C., Yamada, S., Nankai, M., Toru, M., 1998. Antidepressant like effects of chronic nicotine on learned helplessness paradigm in rats. *Biological Psychiatry* 43, 389–391.
- Seth, P., Cheeta, S., Tucci, S., File, S.E., 2002. Nicotinic-serotonergic interactions in brain and behaviour. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 71 (4), 795–805.
- Shi, L.J., Liu, L.A., Cheng, X.H., Wang, C.A., 2002. Modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by glucocorticoids. *Acta Pharmacologica Sinica* 23 (3), 237–242.
- Tizabi, Y., Overstreet, D., Rezvani, A., Louis, V., Clark Jr., E., Janowsky, D., Kling, M., 1999. Antidepressant effects of nicotine in an animal model of depression. *Psychopharmacology* 142, 193–199.
- Tsuiki, K., Blier, P., Diksic, M., 2000. Effect of the beta-adrenoceptor agonist fleroxibuterol on serotonin synthesis in the rat brain. *Biochemical Pharmacology* 59 (6), 673–679.

- Vaswani, M., Linda, F.K., Ramesh, S., 2003. Role of selective serotonin reuptake inhibitors in psychiatric disorders: a comprehensive review. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 27 (1), 85–102.
- Vázquez-Palacios, G., Bonilla-Jaime, H., Velázquez-Moctezuma, J., 2005. Antidepressant effects of nicotine and fluoxetine in an animal model of depression induced by neonatal treatment with clomipramine. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 29, 39–46.
- Wang, J., Shen, R.Y., Haj-Dahmane, S., 2012. Endocannabinoids mediate the glucocorticoid-induced inhibition of excitatory synaptic transmission to dorsal raphe serotonin neurons. *Journal of Physiology* 590 (22), 5795–5808.
- Weber, B., Lewicka, S., Deuschle, M., Colla, M., Vecsei, P., Heuser, I., 2000. Increased diurnal plasma concentrations of cortisone in depressed patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85, 1133–1136.