



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA
ELECTROFISIOLOGÍA

**MODULACIÓN NICOTÍNICA DE LA ENTRADA GABAÉRGICA SOBRE LAS
CÉLULAS SEROTONINÉRGICAS DEL NÚCLEO DORSAL DEL RAFÉ EN RATA**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DRA. EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA

FABIOLA HERNÁNDEZ VÁZQUEZ

TUTOR: DR. LUCIAN STEFAN MIHAILESCU (FACULTAD DE MEDICINA)

COMITÉ TUTORAL:

DRA. MARÍA ELVIRA GALARRAGA PALACIO (INSTITUTO DE FISIOLOGÍA
CELULAR)

DR. JOSÉ JESÚS GARCÍA COLUNGA (INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA)

MÉXICO D.F. FEBRERO DE 2015



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.

Índice

Agradecimientos	4
Agradecimientos y dedicatorias personales	5
Resumen	6
Summary	7
Introducción	8
1. La serotonina y el núcleo dorsal del rafé	8
1.1 Funciones del NDR	10
1.2 Aferencias del NDR	11
1.3 Eferencias del NDR	13
2. Receptores a serotonina	15
3. Características de las neuronas serotoninérgicas del NDR	16
3.1 Características morfológicas	16
2.2 Características electrofisiológicas	17
2.3 Características farmacológicas	17
4. Características de las neuronas GABAérgicas del NDR	19
5. Modulación GABAérgica sobre las células serotoninérgicas del NDR	22
6. Receptores nicotínicos (nAChRs)	25
7. La nicotina y el NDR	28
Planteamiento del problema	30
Objetivo general	30
Objetivos particulares	30
Hipótesis	31
Materiales y Métodos	32
Preparación de rebanadas de cerebro	32
Registros electrofisiológicos	33
Administración de drogas	33
Inmunohistoquímica	34
Fármacos	35

Análisis de datos	35
Las neuronas serotoninérgicas del NDR y la entrada GABAérgica en estas neuronas	37
<i>Identificación de las neuronas serotoninérgicas del NDR</i>	37
<i>Las corrientes postsinápticas inhibitorias espontáneas (sIPSCs) registradas en células serotoninérgicas son de origen GABAérgico</i>	39
<i>La frecuencia de generación de las sIPSCs y las mIPSCs es diferente en células serotoninérgicas del NDR</i>	41
Efecto de la nicotina sobre las sIPSCs en células 5-HT del NDR	42
<i>La nicotina incrementa la frecuencia de las sIPSCs</i>	42
Tipo de nAChR involucrado en la respuesta por nicotina	45
<i>El aumento en la frecuencia en las sIPSCs es mediado por receptores nicotínicos de tipo $\alpha 7$</i>	45
Papel del Ca^{2+} extra- e intracelular y su relación con la activación de los nAChRs por nicotina	49
<i>El efecto de la nicotina sobre las sIPSCs depende de la liberación de Ca^{2+} intracelular</i>	49
Discusión	55
<i>Regulación de la entrada excitatoria e inhibitoria sobre las neuronas serotoninérgicas del NDR</i>	55
<i>La nicotina incrementa la frecuencia de las sIPSCs a través de nAChRs presinápticos de tipo $\alpha 7$</i>	57
<i>La activación del nAChR $\alpha 7$ induce la liberación de Ca^{2+} intracelular</i>	59
Referencias	64

Agradecimientos

Agradezco al Doctorado en Ciencias Biomédicas mi formación y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de beca 205457 por el apoyo económico que me brindó.

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Electrofisiología de la Facultad de Medicina en la Universidad Nacional Autónoma de México a cargo del Dr. Lucian Stefan Mihailescu. Agradezco su tutoría y a la Facultad de Medicina de la UNAM, por permitirme llevar a cabo este proyecto.

También quiero agradecer a la Dra. Elvira Galarraga Palacio y al Dr. José Jesús García Colunga, quienes formaron parte de mi comité tutorial y contribuyeron de manera importante a mi formación académica.

Quiero agradecer a los miembros del jurado de mi examen de grado: Dr. José Bargas Díaz, Dr. Rafael Gutiérrez Aguilar, Dr. Humberto Nicolini Sánchez y al Dr. Francisco Rafael Fernández de Miguel, quienes contribuyeron al mejoramiento de esta tesis.

Este trabajo fue apoyado por los proyectos DGAPAUNAM-IN220112 del Dr. Mihailescu y DGAPA-UNAM-IN212313 del Dr. Salvador Hernández.

Agradecimientos y dedicatorias personales

Esta tesis va dedicada a ti Gabriel, porque me acompañaste en este camino desde el inicio y hasta el final. Gracias por estar ahí para abrazarme cuando las cosas no salían bien, por apoyarme en las decisiones que no siempre han sido las mejores, por darme fortaleza para seguir, por ayudarme, por compartir mis triunfos... en fin, por amarme y estar siempre ahí.

Quiero agradecer también el apoyo de mis padres: gracias Pita por tu cariño, por tu apoyo y por tu manera de demostrarme tu amor. Gracias Beto, por brindarme el gusto de compartir este logro contigo. Gracias a mis hermanos Laura y Humberto, que siempre están ahí ayudándome. A mis sobrinos Lenin, Michelle, Yoahli y Yaihl, no se detengan y sepan que las metas se pueden alcanzar.

Quiero agradecer especialmente a Julieta, quien además de ser una excelente amiga y persona, me enseñó a ser una buena electrofisióloga y sin la cual seguramente hoy no estaría presentando estos resultados. Sus enseñanzas me han inspirado a ser una mejor investigadora y a saber que se puede intentar un registro fallido más de diez veces y aun así, todavía sonreír.

A mis amigos y compañeros del laboratorio: Toñita, Alline, Karen, Teresita y Diego, quienes siempre me apoyaron. Gracias al Dr. Salvador Hernández, quien ayudó también a mi formación.

A mis amigos de siempre, Nancy y Beto, Aldo, Raquel, Nancyna, Rafa y Tere, Daniel, Rocío, Luz, Mariana, Irais y Piña... Dicen que los amigos son la familia que uno escoge y no podría estar más de acuerdo. A mi amigo del doctorado: Arturo, quien me ayudó a estudiar para la materia más complicada del doctorado: Biofísica.

A mis estudiantes de biología, de los cuales además de enseñarles, he aprendido mucho.

A los que desafortunadamente ya no están conmigo: Lourdes Montes: siempre te admiré por tu sonrisa y tu fortaleza ante la vida; mis queridísimos Tía Vira, Tía Con y Tío Güicho, ojalá pudiera compartir esto con ustedes.

A mis gatos: Minina, Botitas, Káiser, Chaparro, Frijol, Batman, Caramelo y Oxford, quienes con su lengua rasposa o con un ronroneo siempre están ahí para animarme y enseñarme que la vida es mejor a su lado.

Finalmente quiero dedicar esta tesis a todos los estudiantes de posgrado, porque aunque a veces las cosas no salen bien... siempre hay una luz al final del camino.

Resumen

Las neuronas serotoninérgicas del núcleo dorsal del rafe (NDR) reciben aferencias excitatorias del *locus coeruleus*, del cerebro anterior y de los núcleos pedunculopontinos. También reciben aferencias inhibitorias GABAérgicas del hipotálamo lateral, la habénula y la sustancia gris periacueductal, así como de interneuronas en el propio NDR. Estas neuronas expresan receptores nicotínicos (nAChRs) de tipo $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$, cuya estimulación aumenta el disparo y la liberación de serotonina. Además, la nicotina aumenta la entrada noradrenérgica y glutamatérgica sobre las células serotoninérgicas. Sin embargo, el efecto de la nicotina sobre la entrada GABAérgica en estas células ha sido poco estudiado. Por ello, el objetivo fue investigar el papel de la nicotina sobre las corrientes postsinápticas inhibitorias espontáneas (sIPSCs) GABAérgicas en células serotoninérgicas del NDR, así como el tipo de nAChR activado. Se utilizó la técnica de *patch clamp* en configuración de célula completa. Las sIPSCs se registraron a -70 mV y en presencia de CNQX y APV para bloquear las corrientes glutamatérgicas. La administración de nicotina (1 μ M) aumentó la frecuencia de sIPSCs en las células serotoninérgicas tanto con o sin TTX (1 μ M). El efecto estimulador de la nicotina fue reproducido por PNU-282987, agonista específico de los nAChRs de tipo $\alpha 7$ y bloqueado por la metilicacotina, antagonista específico del mismo receptor. La administración de PNU-120596, un modulador alostérico de los nAChR, exacerbó la respuesta de la nicotina. El incremento en la frecuencia de sIPSCs inducido por nicotina fue independiente de la activación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VGCCs), pero dependiente de la activación de la liberación de Ca^{2+} intracelular inducida por Ca^{2+} (CICR). Estos resultados muestran que la nicotina incrementa la entrada GABAérgica de las neuronas serotoninérgicas del NDR a través de receptores nicotínicos de tipo $\alpha 7$ presinápticos. Los resultados de este trabajo se publicaron en la revista *Journal of neurophysiology*, bajo el título "Nicotine increases GABAergic input on rat dorsal raphe serotonergic neurons through alpha7 nicotinic acetylcholine receptor". 15; 112(12): 3154-3163, doi: 10.1152/jn.00223.2014. Epub 2014 Sep 17.

Summary

The dorsal raphe nucleus (DRN) contains large populations of serotonergic neurons. This nucleus receives GABAergic inhibitory afferents from many brain areas and from interneurons in the same nucleus. Both GABAergic and serotonergic DRN neurons express functional nicotinic acetylcholine receptors. Previous studies have demonstrated that nicotine increases serotonin release, as well as neuron discharge rate by stimulating postsynaptic nicotinic receptors (nAChRs), and by increasing glutamate and noradrenaline release inside the nucleus. However, the influence of nicotine on the GABAergic input to serotonergic neurons was poorly investigated. Therefore, the aim of this work was to determine the effect of nicotine on GABAergic inhibitory postsynaptic spontaneous currents (sIPSCs) of serotonergic neurons and the subtype of nAChR involved in this response. Experiments were performed in coronal slices obtained from young Wistar rats (18-21 postnatal days). GABAergic currents were recorded from post hoc identified serotonergic neurons using the whole-cell voltage patch clamp technique. Administration of nicotine increased inhibitory currents frequency in 72% identified serotonergic neurons. This effect was not reproduced by the $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptor agonist RJR-2403 and was not influenced by TTX. It was mimicked by the selective agonist for $\alpha 7$ nicotinic receptor, PNU-282987, and exacerbated by the positive allosteric modulator of the same receptor, PNU-120596. The nicotine-induced increase in GABAergic currents frequency was independent on voltage-gated calcium channels (VGCCs) and dependent on calcium-induced calcium release (CICR). These results demonstrate that nicotine increases the GABAergic input to most serotonergic neurons in DRN, by activating $\alpha 7$ nicotinic receptors and producing calcium intracellular release in GABAergic terminals.

Introducción

1. La serotonina y el núcleo dorsal del rafé

La serotonina (5- hidroxitriptamina o 5-HT) es una molécula de señalización cerebral presente tanto en invertebrados como en vertebrados y de amplia distribución en el sistema nervioso central (Welsh y Moorhead, 1960). En los mamíferos, el sistema serotoninérgico se origina en la línea media del romboencéfalo y en la formación reticular, donde las neuronas serotoninérgicas forman 9 núcleos denominados B1 a B9 (Figura 1) (Dahlström y Fuxe, 1964). Los nueve núcleos se incluyen a su vez en dos grupos: rostral y caudal. La subdivisión rostral comprende el núcleo caudal linear (B8), el núcleo rafé mediano (B5, B8 y B9) y núcleo dorsal del rafé (B6 y B7). La porción caudal comprende el núcleo rafé oscuro (B2), el núcleo rafé pálido (B1 y B4), el núcleo rafé magno (B3), las neuronas de la médula ventrolateral y el núcleo intermedio reticular (B1/B3), así como el área postrema (Jacobs y Azmitia, 1992).

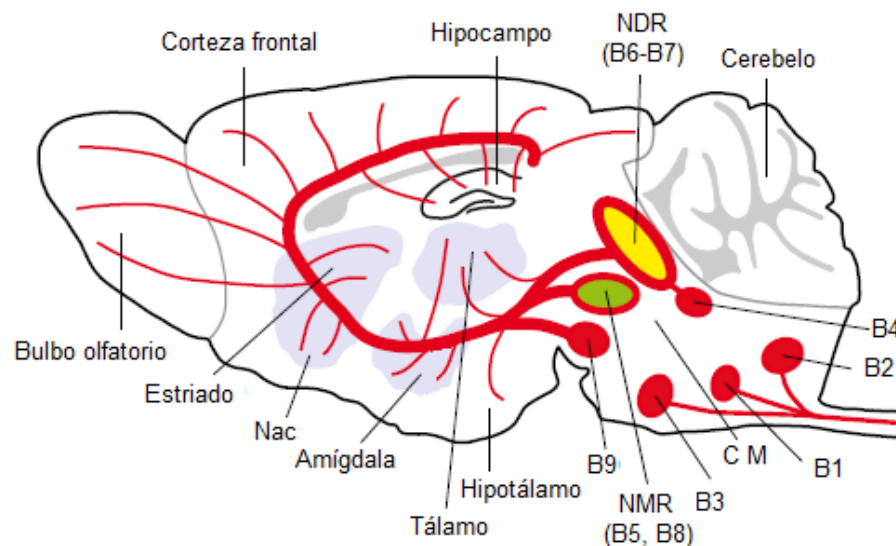


Figura 1. Localización anatómica de los núcleos serotoninérgicos del rafé en el cerebro de ratona. Nac- núcleo *accumbens*, NDR- núcleo dorsal del rafé, NMR núcleo mediano del rafé. Modificado de Lesch y Waider, 2012.

Dentro de los núcleos B1 a B9, el núcleo dorsal del rafé (NDR) es el que contiene la mayor población de neuronas serotoninérgicas en el cerebro. En el cerebro de rata, y con respecto a las coordenadas de bregma, se encuentra de -6.92 a -7.64 mm (región rostral), de -7.73 a -8.45 mm (región media) y de -8.54 a -9.26 mm (región caudal) (Abrams *et al.*, 2004; Paxinos y Watson, 1998) (Figura 2).

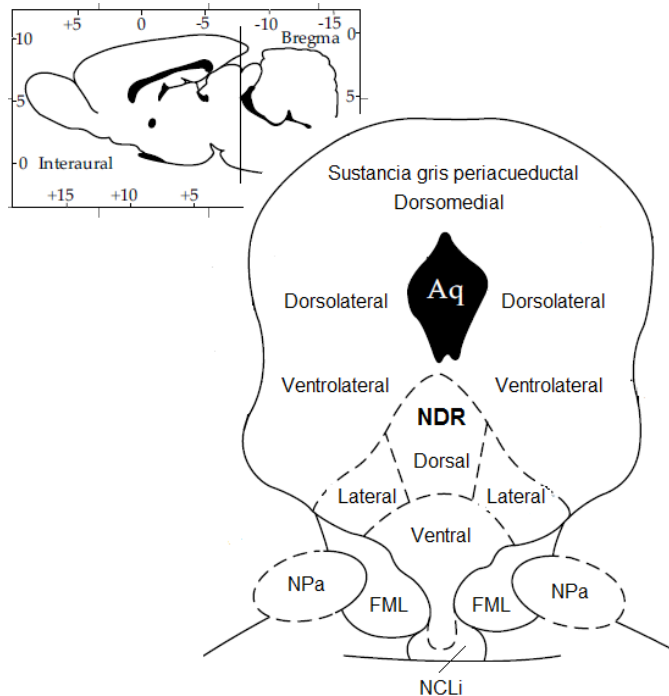


Figura 2. Localización anatómica del núcleo dorsal del rafé (NDR). El NDR se encuentra entre el acueducto (Aq) y el fascículo medial longitudinal (FML). Se divide en tres regiones: dorsal, lateral y ventral. La mayoría de las neuronas serotoninérgicas se encuentran en la línea media de las regiones dorsal y ventral. NPa: núcleo paratroqueal, NCLi: Núcleo caudal lineal. Modificado de Paxinos y Watson, 1998.

El NDR en el humano contiene aproximadamente $235,000 \pm 13,000$ neuronas (Baker *et al.*, 1990), de las cuales $165,000 \pm 34,000$ (o $70 \pm 14\%$) son serotoninérgicas (Baker *et al.*, 1991). (Baker *et al.*, 1990; Jacobs and Azmitia, 1992). En el cerebro de rata, el total de neuronas del NDR es de aproximadamente 35,000, de las cuales un tercio de ellas es de naturaleza 5HTérgica (Descarries *et al.*, 1982). Diversos estudios (Aghajanian y Gallager,

1975; Michelsen et al., 2008; van der Kooy y Hattori, 1980) han demostrado que todas ellas proyectan de una manera topográficamente organizada hacia diversas partes del cerebro y están relacionadas con diversas funciones. El restante 30% de las neuronas que se encuentran en este núcleo son de naturaleza GABAérgica (Belin et al., 1979), glutamatérgica (Kaneko et al., 1990), dopaminérgica (Lindvall y Björklund, 1974) y de algunos neuropéptidos como la sustancia P (Hökfelt et al., 1978), el neuropéptido Y (Pau et al., 1998), la encefalina (Uhl et al., 1979), el factor liberador de corticotropina (CRF, por sus siglas en inglés) (Commons et al., 2003), entre otros.

1.1 Funciones del NDR

El sistema serotoninérgico está relacionado con la regulación autonómica (Azmitia, 1999; Lovick, 1997), la regulación de la temperatura corporal (Hale et al., 2011), el control cardiovascular (Bradley et al., 2002) y el control de la respiración (Hilaire et al., 2010). Este sistema se ha asociado también con las respuestas al estrés (Lowry, 2002), ya sea facilitando o inhibiendo la secreción de glucocorticoides dependiendo del tipo de estresor o del circuito involucrado en la respuesta por el estresor (Saphier et al., 1995). Se ha reportado que el disparo de las neuronas serotoninérgicas del NDR cambia dependiendo de la fase del sueño o vigilia en la que se encuentra el animal. Durante la vigilia, las neuronas serotoninérgicas disparan de una manera regular y constante, mientras que en el sueño de ondas lentas, su disparo disminuye y, durante el sueño de movimientos rápidos de los ojos (MOR), se encuentran prácticamente silentes (Gervasoni et al., 2000; Portas et al., 2000).

La activación de las neuronas serotoninérgicas está relacionada con ciertas actividades cerebrales complejas como el aprendizaje y la memoria (Meneses, 2013), ya que la administración de L-triptofano, el precursor de la 5-HT, facilita la

consolidación de la memoria (Haider *et al.*, 2006). La actividad de estas neuronas también se ha asociado con conductas de impulsividad en ratas (Carli *et al.*, 2006), conductas de agresividad (Audero *et al.*, 2013, Petrov *et al.*, 1994), así como el control afectivo (Dayan y Huys, 2009).

Por otro lado, el NDR inerva estructuras límbicas relacionadas con la patofisiología de la ansiedad (Azmitia y Segal, 1978; Vertes, 1991). La activación de la vía serotoninérgica que proyecta hacia la amígdala, y la corteza prefrontal facilita las respuestas defensivas para la distinción entre amenazas, como la evitación y las conductas de evaluación de riesgo (Deakin y Graeff, 1991). La activación de la vía que va hacia la columna dorsal de la sustancia gris periacueductal inhibe la respuesta de escape ante un peligro, una reacción conductual que se ha relacionado con los ataques de pánico (McNaughton y Gray, 2000; Blanchard *et al.*, 2003). De esta manera, un mal funcionamiento en el sistema serotoninérgico se ha relacionado con diversos trastornos psiquiátricos como la depresión (Bhagwagar *et al.*, 2002), la ansiedad (Sena *et al.*, 2003), la agresión (Passamonti *et al.*, 2012), la enfermedad de Alzheimer (Rodríguez *et al.*, 2012), el autismo (Cook y Leventhal, 1996) entre otros.

1.2 Aferencias del NDR

Las neuronas serotoninérgicas del NDR reciben aferencias tanto excitatorias como inhibitorias de diversas regiones cerebrales, las cuales regulan la actividad de las neuronas serotoninérgicas. La principal aferencia proviene del propio NDR, así como de otros núcleos del rafé, incluyendo las áreas B9, el núcleo lateral paragigantocelular y el núcleo mediano (Jacobs y Azmitia, 1992).

Dentro de las aferencias excitatorias, se sabe que regiones como el *locus coeruleus (LC)* (Peyron *et al.*, 1996), el núcleo hipogloso, perihipogloso y el núcleo del tracto solitario (NTS) (Aghajanian y Wang, 1977; Sakai *et al.*, 1977; Jacobs y Azmitia, 1992) mandan proyecciones adrenérgicas hacia el NDR. Además, el NDR recibe aferencias glutamatérgicas excitatorias de la corteza prefrontal, la habénula, la amígdala, el hipotálamo, el núcleo parabraquial y el núcleo laterodorsal tegmental. (Celada *et al.*, 2001, Lee *et al.*, 2003; Stern *et al.*, 1981). Asimismo, el NDR recibe aferencias dopaminérgicas de la *sustantia nigra (SN)*, el área ventral tegmental (AVT) (Aghajanian y Wang, 1977; Kalén *et al.*, 1985) y el hipotálamo (Jacobs y Azmitia, 1992; Peyron *et al.*, 1995).

Las aferencias inhibitorias GABAérgicas que inervan el NDR provienen de diversas estructuras incluyendo el hipotálamo lateral, el área lateral preóptica, el área hipotalámica posterior, la *SN pars reticulata*, el AVT, la sustancia gris periacueductal, las partes rostrales y caudales del mismo NDR, el núcleo central de la amígdala, así como el núcleo reticular pontino (Gervasoni *et al.*, 2000). Conjuntamente, el NDR recibe aferencias glicinérgicas provenientes del área gris periacueductal ventral y ventrolateral (Rampon *et al.*, 1999).

Por otro lado, el NDR recibe aferencias colinérgicas provenientes del núcleo vestibular superior, a través del fascículo medial longitudinal (Kalén *et al.*, 1985; Jacobs y Azmitia, 1992) y de los núcleos pedunculopontino y laterodorsal tegmental (Woolf y Butcher, 1989). Además, se han descrito entradas hipotalámicas al NDR que se originan principalmente en el área preóptica y el núcleo hipotalámico lateral (Sakai *et al.*, 1977), constituidas por fibras histaminérgicas y peptidérgicas (Bárbara *et al.*, 2002; Krieger, 1983). Por último, las entradas de la sustancia gris periacueductal suministran varios neuropéptidos, entre los que se encuentran: encefalina, del núcleo interpeduncular y la sustancia gris periacueductal (Khachaturian, 1983); sustancia P, de la

habénula medial y el septum medial (Mantyh *et al.*, 1984); galanina, de la sustancia gris periacueductal (Skofitsch y Jacobowitz, 1985); angiotensina II, del núcleo hipotalámico dorsomedial (Fuxe *et al.*, 1976); neuropéptido Y, de los núcleos hipotalámicos paraventricular y arqueado (Kombian y Colmers, 1992); somatostatina, del núcleo olfatorio anterior, el núcleo del lemnisco lateral y la sustancia gris periacueductal (Finley *et al.*, 1982); colecistoquinina del núcleo olfatorio y el hipotálamo lateral (Vanderhaeghen *et al.*, 1980), entre otros.

1.3 Eferencias del NDR

Las neuronas serotoninérgicas del NDR proyectan a diferentes áreas del cerebro de una manera organizada topográficamente. Las neuronas de la región rostral del NDR proyectan principalmente a estructuras del cerebro anterior, mientras que las de las regiones caudales proyectan hacia estructuras posteriores como el cerebelo y la médula espinal. Las primeras eferencias del NDR que se descubrieron fueron las que inervan la SN y el caudado-putamen (CP) (van der Kooy y Hattori, 1980). Posteriormente, se descubrieron axones de las neuronas serotoninérgicas que proyectan hacia el hipocampo y la corteza entorrinal (Köhler y Steinbusch, 1982); la corteza prefrontal y el núcleo *accumbens* (Van Bockstaele *et al.*, 1993); el núcleo paraventricular del tálamo y el núcleo parabraquial (Petrov *et al.*, 1992); el núcleo central de la amígdala (Petrov *et al.*, 1994), y el núcleo vestibular (Halberstadt y Balaban, 2006).

Algunos estudios han clasificado las eferencias del NDR en tres vías ascendentes: vía ascendente dorsal, vía ascendente media y vía ascendente ventral; debido a que cada región inerva diferentes áreas cerebrales (Michelsen *et al.*, 2008). La vía ascendente dorsal inerva al estriado y al globo pálido y proviene del NDR medio y rostral (Vertes, 1991). La vía ascendente media, que inerva principalmente a la SN, y en menor medida al CP (van der Kooy y Hattori, 1980). La vía ascendente ventral, que inerva varias áreas cerebrales: los núcleos talámicos e hipotalámicos

(Bobillier *et al.*, 1976), la habénula lateral (Sim y Joseph, 1993), el septum (Köhler *et al.*, 1982), el núcleo basolateral y central de la amígdala (Vertes, 1991), la corteza cerebral (Bobillier *et al.*, 1976), el hipocampo (Segal y Lendis, 1974), el bulbo olfatorio (Halaris *et al.*, 1976) y el plexo supraependimal (Aghajanian y Gallager, 1975). Las tres vías eferentes del NDR se presentan en la Figura 3.

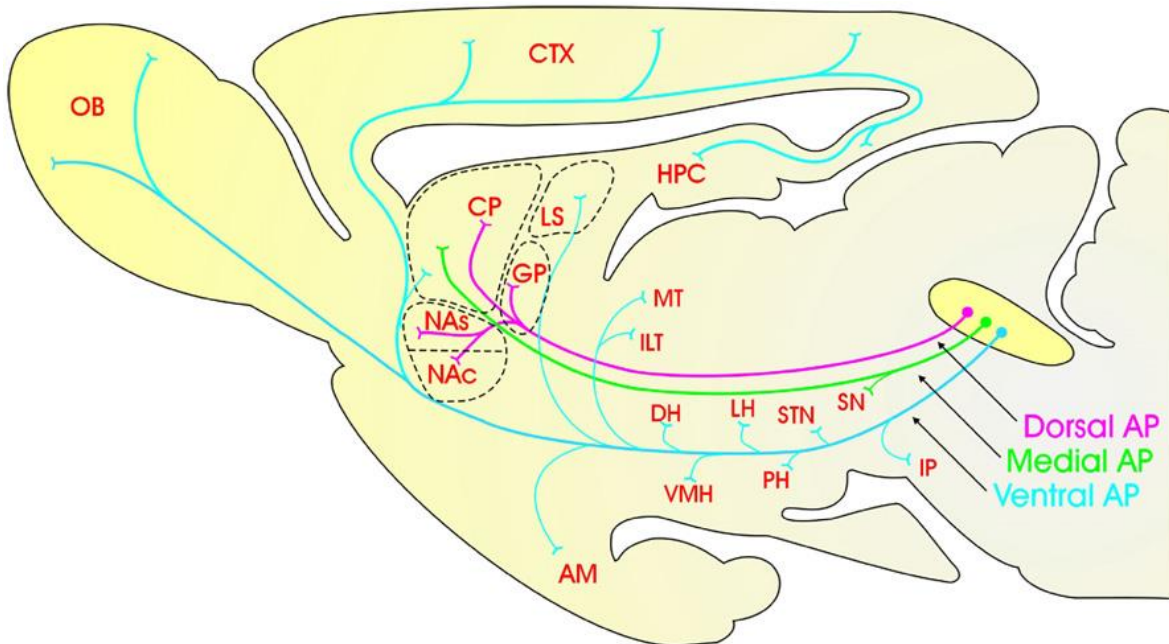


Figura 3. Eferencias del núcleo dorsal del rapé. Las células serotoninérgicas del núcleo dorsal del rapé mandan sus proyecciones a diversas áreas cerebrales. Dorsal AP - vía ascendente dorsal, Medial AP- vía ascendente media, Ventral AP- vía ascendente ventral. AM= amígdala, CP= núcleo cuadado-putamen, CTX= corteza, DH= hipotálamo dorsal, GP= globo pálido, HPC= hipocampo, ILT= núcleo intralaminar talámico, IP= núcleo interpeduncular, LH= hipotálamo lateral, LS= septum lateral, MT= núcleo talámico de la línea media, NAc= núcleo *accumbens* (core), NAs= núcleo *accumbens* (shell), OB= bulbo olfatorio, PH= hipotálamo posterior, SN sustancia nigra, STN= núcleo subtalámico, VMH= hipotálamo ventromedial. Tomado de Michelsen *et al.*, 2008.

2. Receptores a serotonina

Los efectos de la serotonina dependen del receptor al que se una y, en mamíferos, se conocen 7 familias: 5-HT₁ (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}), 5-HT₂ (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}), 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅ (5-HT_{5A}, 5-HT_{5B}), 5-HT₆ y 5-HT₇ (Pytliak *et al.*, 2011). A excepción del 5-HT₃, que forma un canal catiónico pentamérico, todos los demás son receptores acoplados a proteínas G que inician una cascada de segundos mensajeros después de su activación (Barnes y Sharp, 1999). Los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT_{1B} son inhibidores y normalmente se encuentran en la propia célula serotoninérgica, de ahí el nombre de “autorreceptores”. Estos receptores están acoplados a una proteína Gi, la cual inhibe a la adenilato ciclasa y la síntesis de AMPc, reduciendo la excitabilidad neuronal (Barnes y Sharp, 1999). Los receptores 5-HT_{1A} se encuentran principalmente en el soma, mientras que los 5-HT_{1B} en las dendritas (Riad *et al.*, 2000). En contraste, los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} son excitatorios, ya que estimulan la actividad de la proteína cinasa C (PKC) e inducen la liberación de Ca²⁺ intracelular, incrementando la excitabilidad neuronal (Barnes y Sharp, 1999). El 5-HT_{2A} se encuentra principalmente en neuronas que no son serotoninérgicas (Cornea-Hebert *et al.*, 1999).

Los receptores de tipo 5-HT₃ se encuentran en abundancia en la neocorteza y otras regiones del telencéfalo, como la corteza olfativa, el hipocampo y la amígdala. Su expresión se da principalmente en las interneuronas GABAérgicas (Morales y Bloom, 1997) y median las respuestas excitatorias rápidas, debido a que, como se mencionó anteriormente, son canales catiónicos. Su bloqueo con el uso de antagonistas específicos se ha asociado con acciones terapéuticas en la esquizofrenia (Sirota *et al.*, 2000) y la ansiedad (Higgins y Kilpatrick, 1999). Los receptores 5-HT₄ se encuentran principalmente en el tubérculo olfatorio y los ganglios basales (Waeber *et al.*, 1994) y se ha reportado que la activación de estos produce efectos duales (aumento o disminución) en las corrientes evocadas

por GABA en las neuronas piramidales de la corteza prefrontal (Cai *et al.*, 2000). Los receptores 5-HT₅ se han encontrado en el hipocampo, la habénula media y el rafé (Erlander *et al.*, 1993). Sin embargo, son los menos estudiados y se conoce poco acerca de su papel en la neurotransmisión. Los receptores 5-HT₆ se encuentran en el estriado ventral, el núcleo *accumbens*, el tubérculo olfativo y el estriado dorsal (Gérard *et al.*, 1997). Se ha reportado que los antagonistas de estos receptores mejoran la memoria y el aprendizaje en la enfermedad de Alzheimer (Upton *et al.*, 2008). La expresión de los receptores 5-HT₇ se ha encontrado en el tálamo, el hipotálamo y en los núcleos del rafé (Martín-Cora y Pazos, 2004). Sin embargo, la función de estos receptores no se conoce del todo.

3. Características de las neuronas serotoninérgicas del NDR

3.1 Características morfológicas

Las neuronas serotoninérgicas se localizan principalmente en la línea media del NDR (Dahlström y Fuxe) y cerca de capilares sanguíneos (Descarries *et al.*, 1982). En el humano, estas neuronas pueden tener cuatro formas: circulares, ovoides, fusiformes o triangulares (Baker *et al.*, 1990), mientras que en la rata, pueden ser circulares de pequeño tamaño, fusiformes de tamaño medio a grande, bipolares, fusiformes o multipolares grandes (Díaz- Cintra *et al.*, 1981, Hale y Lowry, 2011; Steinbusch *et al.*, 1981). El tamaño del cuerpo celular es de 25-30 μm y generalmente se encuentran formando grupos (Harandi *et al.*, 1987). Los diferentes tipos de neuronas serotoninérgicas se encuentran distribuidas de diferente manera en el NDR, lo que podría reflejar una especialización neuroquímica o funcional (Nakahama *et al.*, 1981). Su árbol dendrítico se caracteriza por ser muy grande ($>1000 \mu\text{m}$) y por la presencia de varicosidades (Calizo *et al.*, 2011). Sus axones, también con varicosidades, son largos y atraviesan varias subregiones del NDR, desde partes ventrales hasta la sustancia gris periacueductal (Allers y Sharp, 2003).

2.2 Características electrofisiológicas

Diversos estudios (Beck *et al.*, 2004, Crunelli *et al.*, 1983; Kirby *et al.*, 2003; Vandermaelen y Aghajanian, 1983) han demostrado características electrofisiológicas distintivas de las células serotoninérgicas del NDR. En rebanadas de cerebro, estas células se encuentran silentes debido a la desaparición de la entrada noradrenérgica proveniente del LC (Li *et al.*, 1998). Ante un pulso de corriente despolarizante, las células serotoninérgicas del NDR disparan de una manera lenta y constante y a una baja frecuencia (4-10 Hz). Tanto su potencial de acción como su posthiperpolarización duran 3-5 ms y ~ 350 ms, respectivamente. Asimismo, presentan una inflexión en la fase repolarizante del potencial de acción debido a una entrada de Ca^{2+} (Vandermaelen y Aghajanian, 1983). Las células serotoninérgicas del NDR presentan una resistencia de entrada de entre 450 y 650 M Ω y una constante de tiempo (τ) de entre 45 y 60 ms (Calizo *et al.*, 2011). Su potencial de membrana se encuentra en ~ -65 mV y el umbral de disparo en ~ -27 mV (Beck *et al.*, 2004; Shikanai *et al.*, 2012). Algunas de las características electrofisiológicas de las neuronas serotoninérgicas se presentan en la Figura 4.

2.3 Características farmacológicas

Por varias décadas fue aceptado que la característica que definía a las neuronas serotoninérgicas era su inhibición por la aplicación de 5-HT, debido a la activación de receptores de tipo 5-HT_{1A} presentes en estas neuronas (Sotelo *et al.*, 1990). La administración de 5-CT, un agonista de los receptores 5-HT_{1A}, produce una hiperpolarización debida a un aumento en la conductancia de K⁺, así como una disminución de la resistencia de las células serotoninérgicas (Calizo *et al.*, 2011). Sin embargo, otros estudios demostraron que el receptor 5-HT_{1A} también puede

estar presente en otros tipos neuronales como en las células piramidales del hipocampo o en neuronas de la corteza prefrontal, por lo que el efecto inhibitorio de la 5-HT fue descartado como un parámetro único de identificación farmacológica de este tipo neuronal (Andrade y Nicoll, 1987; Riad *et al.*, 2000). Más aún, las neuronas serotoninérgicas del NDR expresan también los receptores de tipo 5-HT_{1B} y 5-HT_{1D}, cuya activación disminuye la liberación de 5-HT (Davidson y Stamford, 1995).

El disparo de las células serotoninérgicas del NDR es estimulado por agonistas de receptores de tipo α_1 adrenérgicos, como norepinefrina o fenilefrina (Vandermaelen y Aghajanian, 1983). Al contrario, el bloqueo de estos receptores impide el disparo espontáneo de las neuronas serotoninérgicas (Baraban *et al.*, 1978). De manera similar, la administración de AMPA (ácido-alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico) o NMDA (N-metil D-aspartato) aumenta la actividad de las neuronas serotoninérgicas (Gartside *et al.*, 2007); mientras que la administración de ácido quinurénico, antagonista de estos receptores, disminuye su actividad (Kalén *et al.*, 1989).

La administración de antagonistas de receptores GABA_A o de receptores a glicina inducen un aumento en el disparo de estas neuronas (Gervasoni *et al.*, 2000). Asimismo, la administración de antagonistas de receptores a histamina de tipo H₁ y H₂ también produce un aumento en la frecuencia de disparo de las neuronas serotoninérgicas del NDR (Lakoski y Aghajanian, 1983).

Se ha reportado que la administración de agonistas y antagonistas de neuropéptidos también tiene efectos sobre las neuronas serotoninérgicas del NDR. La administración de galanina produce una hiperpolarización debido a un aumento en la conductancia de K⁺ (Xu *et al.*, 1998), mientras que la estimulación

de los receptores a corticotropina (CRF) de tipo CRF-R2 produce una corriente entrante despolarizante en estas neuronas nérgicas(Kirby *et al.*, 2008). Asimismo, la administración de DAMGO, un agonista de receptores mu, aumenta la liberación de 5-HT (Tao y Auerbach, 2002). En conjunto, las evidencias anteriores indican que la actividad de disparo de las neuronas serotoninérgicas es modulada por múltiples tipos de neurotransmisores.

4. Características de las neuronas GABAérgicas del NDR

A pesar de que el NDR se considera serotoninérgico, aproximadamente del 25 al 30% del total de sus neuronas son GABAérgicas (Johnson, 1994). La existencia de neuronas GABAérgicas en este núcleo se demostró primero por marcaje de autorradiografía y por recaptura de GABA (Belin *et al.*, 1979; Gamrani *et al.*, 1979). Posteriormente, estudios utilizando anticuerpos contra la enzima para síntesis de GABA, ácido glutámico descarboxilasa (GAD, por sus siglas en inglés), y para la GABA-transaminasa o GABA-T, la enzima para su degradación (Nagai *et al.*, 1983; Nanopoulos *et al.*, 1982) mostraron también la existencia de neuronas GABAérgicas en el NDR.

Las neuronas GABAérgicas del NDR presentan varias diferencias con respecto a las serotoninérgicas del mismo núcleo. Una característica importante es que su cuerpo celular es más pequeño que el de las neuronas serotoninérgicas (8-10 μm en comparación con 25-30 μm de las serotoninérgicas) (Harandi *et al.*, 1987; Johnson, 1994). Además, su localización anatómica dentro del NDR es diferente con respecto a las neuronas serotoninérgicas. Aunque algunas neuronas GABAérgicas se encuentran en la línea media, como las células serotoninérgicas, su localización está confinada principalmente en las partes laterales del NDR (Allers y Sharp, 2003; Calizo *et al.*, 2011; Gocho *et al.*, 2012; Shikanai *et al.*, 2012). Asimismo, las neuronas GABAérgicas se encuentran distribuidas en una

mayor densidad en las partes caudales que en las rostrales del NDR, mientras que las serotoninérgicas tienen una distribución opuesta (Calizo *et al.*, 2011) (Figura 4).

Las características electrofisiológicas de las neuronas GABAérgicas del NDR han sido poco exploradas. En diversos estudios, las neuronas del NDR han sido divididas en serotoninérgicas y no serotoninérgicas (Beck *et al.*, 2004; Kirby *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2001; Marinelli *et al.*, 2004), que son presuntamente GABAérgicas, lo que no necesariamente es cierto, ya que en el NDR existen poblaciones de neuronas glutamatérgicas, dopaminérgicas y peptidérgicas, entre otras. Sin dejar de tomar en cuenta dicha limitación, se ha reportado que la frecuencia de disparo de las neuronas no serotoninérgicas ante pulsos despolarizantes de corriente de 200 pA es de 25 ± 5 Hz (Galindo-Charles *et al.*, 2008). De acuerdo con este resultado, Allers y Sharp (2003), utilizando un anticuerpo contra GAD, muestran que las neuronas GABAérgicas tienen una frecuencia de disparo mucho mayor que las neuronas serotoninérgicas (Figura 4). Además de esta característica, las neuronas GABAérgicas del NDR presentan un potencial de acción de 1.78 ± 0.22 ms de duración y de 45.3 ± 5.59 mV de amplitud (Shikanai *et al.*, 2012). La resistencia eléctrica de estas células es de 944 ± 75 M Ω (Challis *et al.*, 2013), presentan un potencial de reposo de -52.1 ± 17.1 mV y un umbral de disparo de -24.0 ± 7.0 mV (Shikanai *et al.*, 2012). Asimismo, en comparación con las neuronas serotoninérgicas, las cuales son silentes en la preparación de rebanada de cerebro, del 40 al 60% de las neuronas GABAérgicas presentan actividad espontánea, con un promedio de 6.6 ± 1.1 Hz (Challis *et al.*, 2013; Meléndez *et al.*, comunicación personal). Las características electrofisiológicas de las neuronas serotoninérgicas y GABAérgicas, así como su distribución anatómica dentro del NDR se observan en las Figuras 4 y 5.

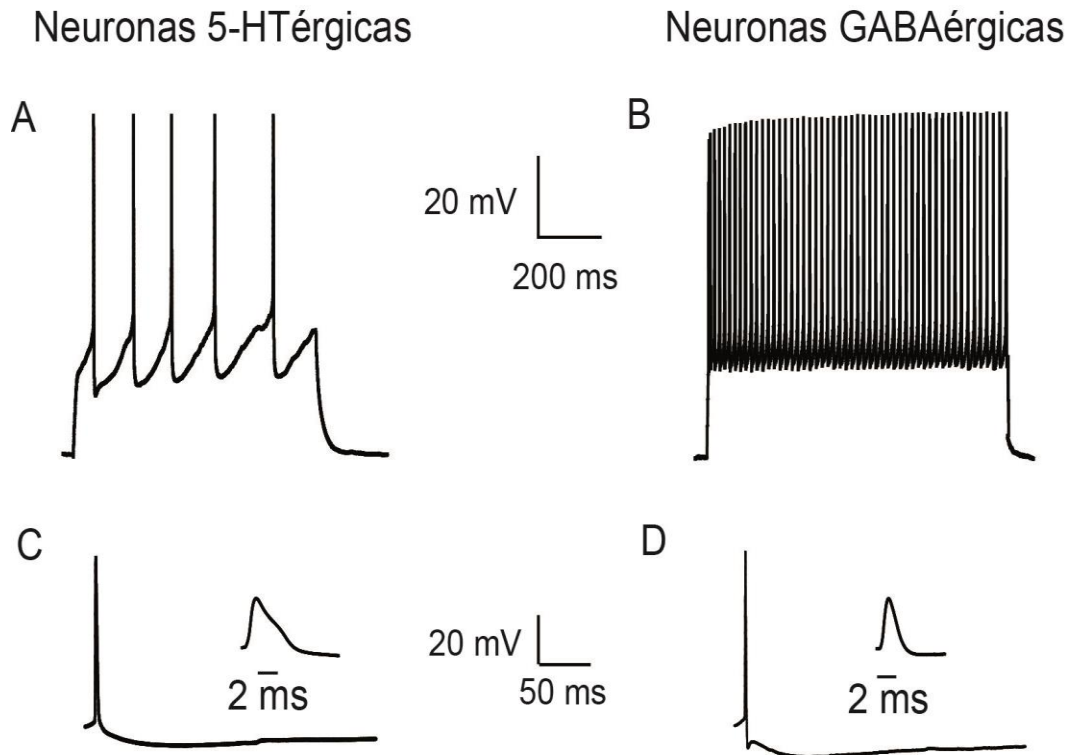


Figura 4. Características electrofisiológicas de las células serotoninérgicas (5-HTérgicas) y GABAérgicas del NDR. Trazos en fijación de corriente en respuesta a un pulso despolarizante de 175 pA de una neurona serotoninérgica (A) y una neurona GABAérgica (B). Es importante notar la menor frecuencia de disparo en las neuronas serotoninérgicas (4-10 Hz) y la mayor duración del potencial de acción (3.5 ms, inserto) con respecto a las neuronas GABAérgicas (frecuencia de disparo: 25-30 Hz, duración del potencial de acción: 2 ms, inserto). La mayoría de las neuronas GABAérgicas presentan una ligera despolarización en la fase de posthiperpolarización (D) que no está presente en las neuronas serotoninérgicas (C). Ampliando la base de tiempo se observan los potenciales de la misma neurona serotoninérgica (C, inserto) y GABAérgica (D, inserto). En este mismo inserto, puede observarse la inflexión en la fase repolarizante del potencial de acción presente sólo en las neuronas serotoninérgicas.

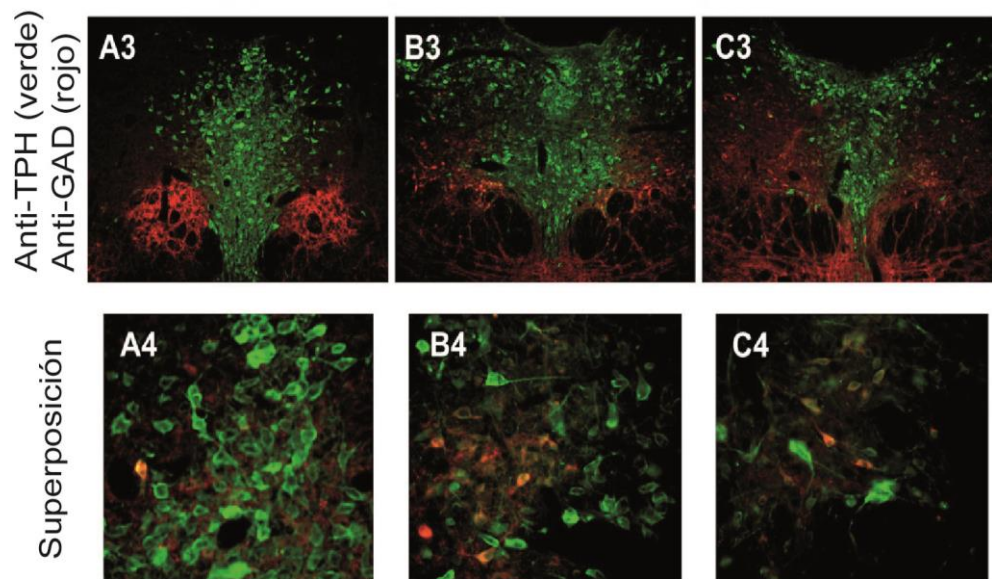


Figura 5. Inmunohistoquímica de las células serotoninérgicas y GABAérgicas del NDR.

Inmunohistoquímica de las neuronas serotoninérgicas (verde) y GABAérgicas (rojo) del NDR utilizando un anticuerpo contra TPH (triptófano hidroxilasa) y GAD (ácido glutámico descarboxilasa), respectivamente. Las neuronas serotoninérgicas se encuentran distribuidas principalmente en la línea media y partes rostrales del rafé, mientras que las GABAérgicas se encuentran en las alas laterales y en las partes caudales del mismo núcleo. Las características electrofisiológicas fueron amablemente proporcionadas por Meléndez *et al* (comunicación personal) y la fotografía de inmunohistoquímica proviene de Calizo *et al* (2011).

5. Modulación GABAérgica sobre las células serotoninérgicas del NDR

Algunas terminales GABAérgicas hacen contacto con las neuronas serotoninérgicas del NDR. Algunas de estas terminales provienen de áreas cerebrales lejanas y otras del mismo NDR (Harandi *et al.*, 1997; Gervasoni *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1992). Además, la entrada GABAérgica al NDR y específicamente su entrada sobre las neuronas serotoninérgicas, regula respuestas fisiológicas como la respiración, la termorregulación y diversas funciones autónomas (Broadbelt *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2000; Serrats *et al.*, 2005).

En las neuronas GABAérgicas del NDR, se ha reportado la presencia de receptores de tipo 5-HT_{2A/2C}, cuya estimulación induce una corriente entrante que despolariza a estas neuronas (Boothman *et al.*, 2006; Gocho *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2000). Como ya se mencionó, algunas neuronas GABAérgicas hacen sinapsis con las serotoninérgicas del NDR, por lo tanto, su estimulación por la 5-HT induce una inhibición en las neuronas serotoninérgicas. Por otro lado, las neuronas GABAérgicas expresan receptores 5-HT₇, cuya activación inhibe la liberación de GABA y, por tanto, desinhibe a las neuronas serotoninérgicas del NDR (Roberts *et al.*, 2004).

Además de los mecanismos antes mencionados, las neuronas GABAérgicas modulan la actividad de las serotoninérgicas a través de una vía indirecta. Las neuronas GABAérgicas reciben aferencias glutamatérgicas de la habénula lateral y la corteza prefrontal (Varga *et al.*, 2001). La estimulación de estas áreas cerebrales induce una inhibición sobre las neuronas serotoninérgicas a través de la estimulación de las células GABAérgicas del NDR (Challis *et al.*, 2013). La representación esquemática de las relaciones entre las neuronas GABAérgicas y serotoninérgicas del NDR se muestra en la Figura 6.

6. Receptores nicotínicos (nAChRs)

Los efectos de la nicotina se deben a la interacción de ésta con los receptores nicotínicos, presentes en todo el sistema nervioso central y periférico, cuyo agonista natural es la acetilcolina (ACh) (Albuquerque *et al.*, 2009; Dani y Bertrand, 2007). Los nAChRs son proteínas pentaméricas que pertenecen a la familia de receptores de canales iónicos operados por ligando, en la cual se incluyen también los receptores GABA_A, 5-HT₃ y los receptores a glicina (Corringer *et al.*, 2000). Como todos los receptores de esta familia, los nAChRs presentan cuatro dominios transmembranales y una porción extracelular hidrofílica donde se encuentra el sitio de unión a ACh o nicotina (Unwin, 2005). Una vez que el agonista se une al nAChR, los dominios de cada subunidad sufren un cambio conformacional que da como resultado la apertura del poro central, permitiendo el paso de iones (Na⁺, K⁺ o Ca²⁺) por unos cuantos ms; después de ese tiempo, el canal se cierra y pasa a un estado no conductor (Giniatullin *et al.*, 2005). La exposición crónica a bajas concentraciones de nicotina (como en el caso de los fumadores) induce una desensibilización del receptor, lo que implica que el canal permanezca en un estado cerrado, necesitando concentraciones mayores del agonista para poder activarse (Picciotto *et al.*, 2008). Aunque todos los nAChRs pueden presentar desensibilización, el grado de ésta depende del tipo de nAChR. Asimismo, la exposición crónica a nicotina, además de causar desensibilización del receptor, induce un aumento en el número de nAChRs, proceso conocido como “regulación a la alta” (Benwell *et al.*, 1988; Wonnacott, 1990).

Los receptores nicotínicos forman una familia heterogénea debido a las posibles combinaciones funcionales de sus subunidades ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta 4$) (Gotti, 2004). Las propiedades farmacológicas y electrofisiológicas de los nAChRs varían dependiendo de las subunidades que formen el receptor. Las subunidades más comúnmente expresadas en el cerebro son las $\alpha 4$, $\beta 2$ y las $\alpha 7$, las cuales se encuentran principalmente formando

nAChRs de tipo $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ (Paterson y Nordberg, 2000). Los nAChRs se pueden localizar en el soma, las dendritas, las regiones preterminales del axón, las terminales axónicas y en los axones mielinizados de las neuronas (Albuquerque *et al.*, 1995; MacDermott *et al.*, 1999). Incluso, se ha reportado la presencia de nAChRs en los astrocitos, donde regulan la liberación de neurotransmisores (Shen *et al.*, 2012).

Los receptores de tipo $\alpha 4\beta 2$ están formados generalmente por dos subunidades “ α ” y tres “ β ” ($(\alpha 4)_2 (\beta 2)_3$), aunque también se pueden encontrar tres subunidades “ α ” y dos “ β ” ($(\alpha 4)_3 (\beta 2)_2$) (Anand y Lindstrom, 1990, Nelson *et al.*, 2003). De las dos posibles combinaciones, el primero es el que tiene la mayor afinidad por nicotina (Clementi *et al.*, 2000) y el más sensible a la regulación a la alta (Flores *et al.*, 1992). La activación de estos receptores en la presinapsis aumenta la liberación de neurotransmisores en el cerebro, como la dopamina, la acetilcolina, el GABA y la noradrenalina (Jensen *et al.*, 2005; Sher *et al.*, 2004). Se encuentran en varias áreas cerebrales como el núcleo del rafé magno, el NDR, el LC y la sustancia gris periacueductal, donde regulan diversas funciones (Bitner *et al.*, 1998; Cucchiario y Commons, 2003; Cucchiario *et al.*, 2005; Galindo-Charles *et al.*, 2008; Nakamura y Jang, 2010). Los receptores $\alpha 4\beta 2$ se han asociado con la dependencia y auto-administración a drogas. En un estudio llevado a cabo por Picciotto y colaboradores (1998) se demostró que la auto administración de nicotina se reduce en ratones *knockout* de la subunidad $\beta 2$, mientras que la sobreexpresión de la subunidad $\alpha 4$ induce tolerancia, dependencia y sensibilización a la nicotina (Tapper *et al.*, 2004). Asimismo, la expresión y algunas mutaciones en este tipo de nAChR se han asociado con algunos trastornos psiquiátricos como la enfermedad de Alzheimer y la epilepsia. Se ha encontrado una reducción en los niveles de ARNm de las subunidades $\alpha 4$ y $\beta 2$ en los cerebros de pacientes con Alzheimer (Jürgensen y Ferreira, 2010; Perry *et al.*, 2000). Además, en ratones, las mutaciones en la subunidad $\alpha 4$ del nAChR se han relacionado con un fenotipo epiléptico (Steinlein y Bertrand, 2010). Los receptores

$\alpha 4\beta 2$ se han asociado también con la modulación del dolor: los ratones *knockout* de las subunidades $\alpha 4$ y $\beta 2$ muestran una reducción en el efecto antinociceptivo de la nicotina (Marubio *et al.*, 1999)

Los nAChRs de tipo $\alpha 7$ se conocen desde hace muchos años debido a su afinidad por la α -bungarotoxina y el curare (Morley *et al.*, 1979). Las características importantes de este receptor son su alta permeabilidad al Ca^{2+} (incluso a niveles comparables con la de los receptores NMDA de glutamato) y la rápida desensibilización cuando son expuestos a los agonistas (Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004; McGehee *et al.*, 1995; Séguéla *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 2011). Dicha desensibilización podría representar un mecanismo de protección celular contra la citotoxicidad producida por el exceso de Ca^{2+} intracelular (Papke *et al.*, 2000). Asimismo, estos receptores tienen un tiempo corto de apertura (~ 100 μs), una gran conductancia (de 71 a 105 pS) (Lukas y Bencherif, 1992) y una baja afinidad por los agonistas (Lukas y Bencherif, 1992; Zwart *et al.*, 2008). Además de la localización sináptica, se ha demostrado que estos receptores pueden presentarse en sitios alejados de la sinapsis (receptores extrasinápticos) (Adams *et al.*, 2001; Hunt y Schmidt, 1978; Ullian y Sargent, 1995), lo que los hace ser principales blancos de la ACh que se encuentra en lugares distantes del espacio sináptico (Vizi y Lendvai, 1999). Debido a su localización, su cinética y la alta permeabilidad al Ca^{2+} , estos receptores tienen funciones importantes en cuanto a la adicción a drogas y la regulación de la liberación de neurotransmisores (McGehee y Role, 1996). Han sido implicados en procesos como el desarrollo y mantenimiento de neuritas y sinapsis (Pugh y Berg, 1994), potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés) (Hunter *et al.*, 1994), ataques epilépticos (Miner *et al.*, 1984) y viabilidad o muerte neuronal (Renshaw, 1994).

Con todo lo anterior, se puede afirmar que la activación de los nAChRs regula la excitabilidad neuronal y modula la transmisión sináptica a través de mecanismos

directos o indirectos. Los efectos directos incluyen la activación de nAChRs somatodendríticos provocando la despolarización neuronal. Los mecanismos indirectos involucran la activación de nAChRs altamente permeables a Ca^{2+} , ubicados en las terminales, lo que activa cascadas de señalización, la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} del retículo (CICR, por sus siglas en inglés) o la exocitosis del neurotransmisor.

7. La nicotina y el NDR

Existe una regulación importante por la nicotina sobre la transmisión serotoninérgica. La nicotina aumenta la liberación de 5-HT en diversas áreas cerebrales. Ribeiro y colaboradores (1993) mostraron que la nicotina, administrada subcutáneamente y junto con fluoxetina (inhibidor de la recaptura de 5-HT), aumenta la liberación de 5-HT en la corteza. En el NDR, la nicotina aumenta tanto el disparo como la liberación de 5-HT (Mihailescu *et al.*, 1998). Este mecanismo es a través de la estimulación directa de nAChRs de tipo $\alpha 7$ o $\alpha 4\beta 2$ (Galindo-Charles *et al.*, 2008). La liberación de 5-HT inducida por la nicotina es mayor cuando estas células muestran bajos niveles de actividad, lo que sugiere que la nicotina puede aumentar la liberación de 5-HT a través de mecanismos presinápticos. Esta hipótesis se comprobó posteriormente por Li y colaboradores (1998) y por Garduño y colaboradores (2012) mostrando que la nicotina aumenta la liberación de adrenalina y glutamato en el NDR a través de receptores $\alpha 7$ o $\alpha 4\beta 2$, respectivamente.

En ratas anestesiadas, la administración sistémica de nicotina induce una inhibición transitoria de la mayoría de las neuronas serotoninérgicas del NDR (Engberg *et al.*, 2000). Esta inhibición se bloquea con WAY-100635, un antagonista de receptores 5-HT_{1A}, indicando que la nicotina aumenta la liberación de 5-HT dentro del NDR. Un estudio reciente demostró que el receptor que

participa en este mecanismo es $\alpha 4\beta 2$ (Frías-Dominguez *et al.*, 2013). Además, el efecto de la nicotina sobre las neuronas serotoninérgicas del NDR de ratas en libre movimiento depende de la fase del ciclo de sueño-vigilia en la que se encuentren las ratas. La nicotina aumenta el disparo de las neuronas serotoninérgicas durante el sueño MOR, pero no tiene efecto durante la fase de no-MOR o vigilia (Guzmán-Marín *et al.*, 2001).

El NDR es un substrato neuroanatómico importante de los efectos ansiolíticos producidos por la nicotina. La administración de dosis bajas de nicotina (2.5 a 10 ng) directamente en el NDR induce un efecto ansiolítico en la prueba de interacción social (Cheeta *et al.*, 2001). El efecto ansiolítico de la nicotina se antagoniza por administración de WAY-100635; lo que indica que es mediado por un aumento en la liberación de 5-HT, actuando sobre autorreceptores 5-HT_{1A} (Sprouse y Aghajanian, 1987). Al contrario, las ratas en síndrome de abstinencia por nicotina muestran respuestas ansiogénicas en las pruebas de interacción social, el laberinto de brazos elevados y las pruebas de campo oscuro (Barnes *et al.*, 1990; Cheeta *et al.*, 2001). Esta conducta ansiosa se revierte con la administración sistémica de antagonistas de receptores 5-HT₃ en ratones (Barnes *et al.*, 1990) o mejora parcialmente con la administración de buspirona, antagonista parcial de 5-HT_{1A}, en humanos (West *et al.*, 1991). Por otro lado, estudios en humanos han demostrado que la nicotina mejora los síntomas de pacientes con depresión (Salín-Pascual *et al.*, 1998). Además, la nicotina mejora la cognición y la atención tanto en ratas, como en humanos (Wesnes y Warburton, 1978). Los trabajos mencionados anteriormente indican que la nicotina juega un papel importante sobre el sistema serotoninérgico en diversas conductas.

Planteamiento del problema

La actividad de las neuronas serotoninérgicas del NDR es modulada por aferencias inhibitorias GABAérgicas, así como por la propia liberación de 5-HT en el núcleo. La nicotina aumenta tanto el disparo de las neuronas serotoninérgicas del NDR, como la liberación de 5-HT en varias regiones del cerebro. Estos efectos se deben a la activación de nAChRs de tipo $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$ somáticos, así como a la activación de nAChRs de tipo $\alpha 7$ en terminales adrenérgicas y de $\alpha 4\beta 2$ en terminales glutamatérgicas. Sin embargo, hasta el momento se desconoce el efecto de la nicotina sobre la entrada GABAérgica de las células serotoninérgicas del NDR, así como el subtipo de nAChR presente en las aferencias GABAérgicas.

Objetivo general

Investigar el papel de la nicotina sobre las corrientes postsinápticas inhibitorias espontáneas (sIPSCs) y miniatura (mIPSCs) de origen GABAérgico en células serotoninérgicas del NDR.

Objetivos particulares

- 1) Demostrar que las sIPSCs registradas en las células serotoninérgicas del NDR son de origen GABAérgico.
- 2) Investigar si las corrientes inhibitorias dependen del disparo de neuronas GABAérgicas.
- 3) Registrar la frecuencia de las sIPSCs y mIPSCs en condiciones control y en presencia de nicotina.

- 4) Identificar el tipo de nAChR presente en las terminales GABAérgicas mediante el uso de agonistas, antagonistas y moduladores alostéricos específicos para nAChRs.
- 5) Estudiar el papel de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VGCCs) y de la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} en el efecto de la nicotina sobre las sIPSCs.
- 6) Determinar la naturaleza serotoninérgica de todas las células registradas utilizando un anticuerpo contra 5-HT.

Hipótesis

Las terminales GABAérgicas en el NDR expresan nAChRs cuya estimulación modula la frecuencia de las sIPSCs registradas en las neuronas serotoninérgicas de este núcleo.

Materiales y Métodos

Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio del Instituto Nacional de Salud (NIH, por sus siglas en inglés) (Publicación No. 85-23, 1985) y aprobados por el Comité Institucional de Cuidado Animal de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Preparación de rebanadas de cerebro

Se utilizaron ratas Wistar macho de 18-21 días de edad, las cuales fueron anestesiadas con isoflurano y sacrificadas por decapitación. Sus cerebros se extrajeron para posteriormente colocarlos en una solución de sacarosa a una temperatura de 4°C y pH de 7.35. Se obtuvieron rebanadas coronales del núcleo dorsal del rafe, con un espesor de 350 μm , con la ayuda de un vibratomo (Vibratomo 1500 Comp., *St Luis, MO*). Estas rebanadas permanecieron inmersas en líquido cefalorraquídeo artificial (solución extracelular) y con burbujeo continuo con carbógeno (95% O_2 + 5% CO_2), de 40 min a una hora antes del registro electrofisiológico. Luego, las rebanadas se colocaron en una cámara de registro, instalada en un microscopio óptico (Olympus BX51), dotado con un sistema de visualización en infrarrojo. Las rebanadas estuvieron continuamente perfundidas con solución extracelular a una temperatura controlada de 33°C. La composición (en mM) de la solución extracelular fue de: NaCl 124, KCl 2.69, KH_2PO_4 1.25, MgSO_4 2, NaHCO_3 26, dextrosa 10 y CaCl_2 2. El pH de la solución se ajustó a 7.35 con HCl.

Registros electrofisiológicos

Para el registro de la actividad eléctrica y las corrientes de membrana de las células del NDR, se utilizó la técnica de *patch clamp* en configuración de célula completa. El registro se llevó a cabo en la modalidad de fijación de voltaje o de corriente con la ayuda de un amplificador Multiclamp 700A (*Axon Instruments*). La señal fue filtrada a 5 kHz y digitalizada utilizando una interfase Digidata 1322A (*Axon Instruments*). Las neuronas del NDR fueron visualizadas mediante un sistema de microscopía y video en infrarrojo con un objetivo de inmersión en agua 60X. La imagen del microscopio se observó en un monitor mediante una cámara CCD. Las micropipetas utilizadas para el registro se obtuvieron en un estirador (*Sutter Instruments, Comp, Novato CA*) con una resistencia de 4-7 M Ω medida ya con la solución interna. La solución interna estuvo compuesta (en mM) de: Gluconato K 70, KCl 70, NaCl 5, MgCl₂ 1, HEPES 10, EGTA 0.02, ATP 2, GTP 0.3 y biocitina al 0.1 % para marcar la célula registrada. El pH de la solución se ajustó a 7.35 con Trizma Base. Las corrientes postsinápticas inhibitorias (sIPSCs) se registraron en fijación de voltaje, a un potencial de -70 mV en presencia de CNQX (10 μ M) y APV (50 μ M) para bloquear las corrientes postsinápticas glutamatérgicas y a una temperatura de 33 °C. Las corrientes postsinápticas inhibitorias miniatura (mIPSCs) se registraron de igual manera pero añadiendo TTX (1 μ M) a la solución de perfusión. La resistencia en serie se monitoreó durante todo el experimento y si ésta excedía el 10% de la del inicio, la célula se desechó. Después del registro electrofisiológico, las rebanadas se fijaron en paraformaldehído al 4% y 1% de ácido pícrico en PBS 0.1 M, a un pH de 7.35 hasta procesarlas.

Administración de drogas

Las sIPSCs se registraron siempre en presencia de CNQX (10 μ M) y APV (50 μ M) durante al menos 10 minutos para obtener la frecuencia basal de las mismas

(control). Posteriormente, se administró bicuculina (10 μ M), nicotina (1 μ M) o antagonistas específicos para los nAChRs y sus efectos se registraron durante un lapso de 8 a 10 min, con el posterior lavado de la última droga administrada durante al menos 15 min. En el caso de las drogas que pudieran alterar el efecto de la nicotina (antagonistas de los nAChRs, el modulador alostérico positivo PNU-120596, TTX, bloqueadores de la CICR o de los VGCCs) una de estas drogas se administró y se registraron sus efectos sobre las IPSCs durante 10 min; después, se agregó nicotina y sus efectos se registraron durante 10 min. La reversibilidad de los efectos de la nicotina se comprobó por un registro de 15 min durante el lavado de la droga.

Inmunohistoquímica

El procedimiento inmunohistoquímico se realizó al menos una semana después del registro electrofisiológico. Las rebanadas fueron lavadas por 10 minutos en solución salina amortiguadora con fosfato y potasio (KPBS) para quitar el paraformaldehído. Después, dichas rebanadas se incubaron en sacarosa al 30% por una hora y se prepararon rebanadas de 40 μ m en un vibratomo. A continuación, las rebanadas se incubaron durante 24 horas en solución de PBS tritón X-100 y estreptavidina conjugada a CY₃ (1mg/ml, diluido 1:1200) con el fin de revelar la marca la neurona registrada. Cada una de las rebanadas fue observada al microscopio de fluorescencia hasta que se encontró la que contenía la marca de biocitina. Posteriormente, la rebanada con la célula marcada se incubó de 24 a 48 horas a 4°C con un anticuerpo primario contra 5-HT y después por dos horas con un anticuerpo secundario conjugado a fluoresceína (diluido 1:2000). Finalmente, la rebanada se colocó en un portaobjetos con un medio de montaje y se examinó en el mismo microscopio de fluorescencia, en presencia de un filtro para fluoresceína, para corroborar que la célula registrada fuera serotoninérgica.

Fármacos

Todos los fármacos se disolvieron en la solución extracelular y se administraron en perfusión. La tetrodotoxina (TTX), el ácido DL-2-amino-5-phosponovalerico (APV); 6-cyano-2,3-dihydroxy-7-nitroquinoxalina (CNQX); la bicuculina, la metilcaconitina (MLA); el hidrobromuro de dihidro- β -eritroidina (DH β E); la N-(5-cloro-2,4-dimetoxifenil)-N'-(5-metil-3-isoxazolil)-urea (PNU-120596), el 1,4-dihidro-2,6-dimetil-4-(3-nitrofenil)-3,5- ácido piridinedicarboxílico de etilo (nitrendipina) y la biocitina se adquirieron de Sigma Aldrich RBI Co. (St Louis MO). La tapsigargina, la rianodina, el (E)-N-Metil-4-(3-piridinil)-3-buten-1-amino oxalato (RJR-2403) y la N-(3R)-1-Azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl-4-clorobenzamida (PNU-282987) se obtuvieron de Tocris Bioscience (Ellisville, MO). La ω -Agatoxina-TK y ω -conotoxina-GVIA se obtuvieron de *Peptide Institute* (Japón) y *Alomone Labs* (Israel), respectivamente.

Análisis de datos

El análisis de los registros electrofisiológicos se llevó a cabo utilizando los programas Clampfit 10 (*Molecular Devices*) y *Mini Analysis* (Synaptosoft, Decatur GA). El programa *Mini Analysis* se utilizó para detectar las sIPSCs y las mIPSCs, así como su frecuencia y amplitud. Los eventos se detectaron automáticamente, pero posteriormente se llevó a cabo una revisión manual de cada uno de ellos. Se construyeron histogramas de frecuencia del acumulado de sIPSCs en 10 s para cada una de las células registradas. Debido a que las frecuencias basales de las sIPSCs registradas de cada una de las células fueron heterogéneas, los cambios en su frecuencia durante la administración de drogas se expresaron como porcentajes de la frecuencia control. De esta manera, los histogramas de frecuencias de las sIPSCs se normalizaron con respecto al valor control. Se utilizó el programa Sigma Plot 11.0 para la obtención de gráficas y el análisis estadístico. Los datos están expresados como el promedio \pm el error estándar de la media. Las comparaciones estadísticas entre los grupos se realizaron mediante las pruebas

de Mann Whitney (en el caso de muestras independientes) y Wilcoxon (para muestras dependientes). La fracción acumulada de intervalo y amplitud de eventos se comparó utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnoff. Un valor de $p < 0.05$ se tomó como estadísticamente significativo.

Resultados

Las neuronas serotoninérgicas del NDR y la entrada GABAérgica en estas neuronas

Identificación de las neuronas serotoninérgicas del NDR

Se registró un total de 105 células en la línea media del NDR (bregma -7.80 a -8.00 mm), ya que ahí se encuentra la mayor cantidad de neuronas serotoninérgicas (Allers y Sharp, 2003; Calizo *et al.*, 2011; Shikanai *et al.*, 2012). Además, se registraron preferentemente neuronas que se encontraban formando grupos, debido a que las neuronas serotoninérgicas del NDR se encuentran agrupadas (Harandi *et al.*, 1987; Jacobs y Azmitia, 1992). Se observaron tanto las características electrofisiológicas de las neuronas registradas, como la presencia de 5-HT en ellas mediante inmunohistoquímica llevada a cabo *post hoc*.

Las características electrofisiológicas de las neuronas serotoninérgicas del NDR han sido ampliamente descritas (Beck *et al.*, 2004, Crunelli *et al.*, 1983; Kirby *et al.*, 2003; Vandermaelen y Aghajanian, 1983). Todas las células que se registraron en este trabajo cumplieron con los criterios electrofisiológicos previamente reportados por estos autores: una baja tasa de disparo en respuesta a la aplicación de un pulso de corriente despolarizante de 175 pA (4-10 Hz, Figura 7A); potenciales de acción y posthiperpolarizaciones de larga duración (4.32 ± 0.163 ms y 347 ± 22.7 ms; n=83, respectivamente); así como una inflexión en la fase repolarizante del potencial de acción (Figura 7A, inserto). La baja tasa de disparo de 7.24 ± 0.33 Hz (n=15), se observa en la Figura 7B, donde se graficó la frecuencia de disparo en función de la intensidad de la corriente, siendo 175 pA la máxima corriente aplicada.

Otra característica que contribuyó a la identificación de las neuronas serotoninérgicas del NDR fue que se encontraban silentes, debido a que, en rebanadas, no está presente la entrada adrenérgica proveniente del LC (Beck *et al.*, 2004; Li *et al.*, 1998). Para corroborar la naturaleza serotoninérgica de las células registradas, se realizaron posteriormente pruebas de inmunohistoquímica. La Figura 7C muestra una de las células marcada con biocitina (en rojo), positiva a 5-HT (en verde) y la superposición, indicando que la célula registrada fue serotoninérgica. Las células que no cumplieron con las características electrofisiológicas mencionadas previamente o con el resultado positivo de la inmunohistoquímica fueron descartadas.

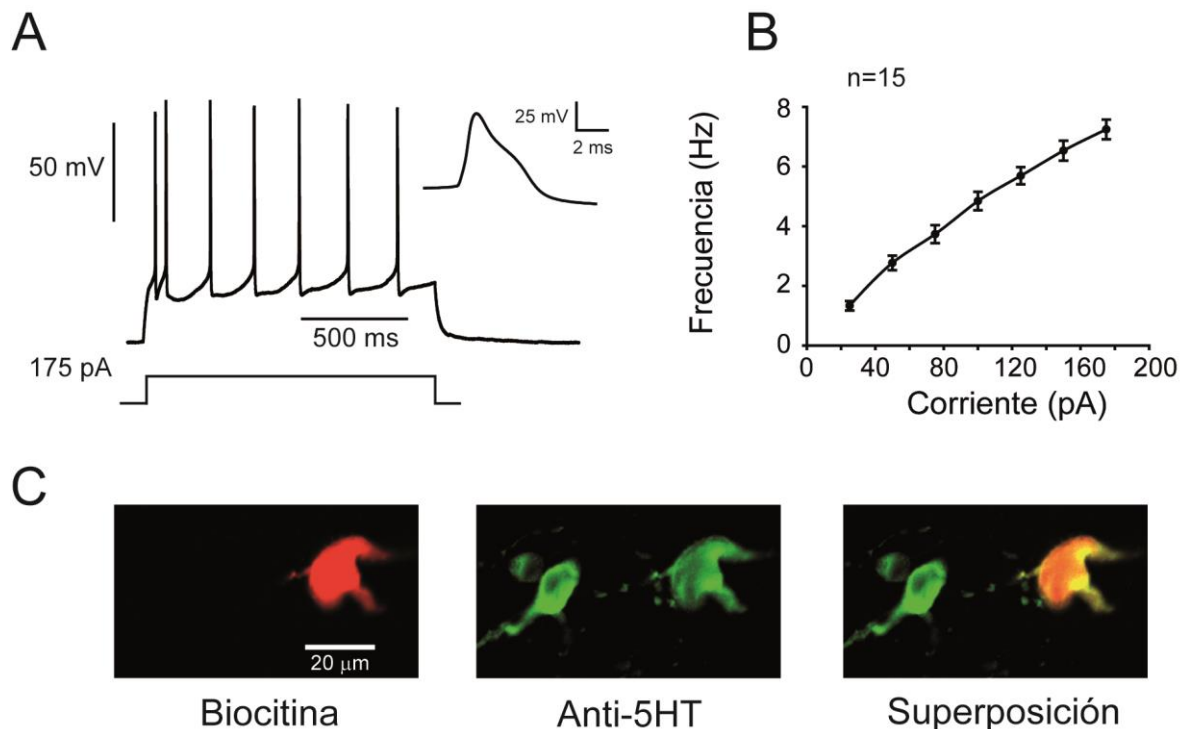


Figura 7. Identificación electrofisiológica e inmunohistoquímica de una neurona serotoninérgica en el NDR. (A) Registros en fijación de corriente de una neurona serotoninérgica en respuesta a una inyección de corriente de 175 pA. En el inserto se observa el potencial de acción aumentando la línea de tiempo, donde puede observarse la inflexión en la fase repolarizante del potencial de acción. (B) Frecuencia de disparo en función de la corriente despolarizante inyectada. Los datos fueron obtenidos de 15 neuronas serotoninérgicas. (C) Microfotografía que muestra la misma célula registrada con la marca de biocitina (izquierda), positiva para 5-HT (en medio) y la superposición (derecha).

Las corrientes postsinápticas inhibitorias espontáneas (sIPSCs) registradas en células serotoninérgicas son de origen GABAérgico

Las sIPSCs se registraron en fijación de voltaje a un potencial de mantenimiento de -70 mV y siempre en presencia de CNQX y APV para bloquear las corrientes glutamatérgicas. Para aumentar la amplitud de las corrientes inhibitorias, se utilizó una solución interna con una alta concentración de cloro (ver “Materiales y Métodos”). La Figura 8A muestra el registro representativo de las sIPSCs en presencia de solución extracelular (Figura 8A, trazo superior), después de haber administrado CNQX (10 μ M) y APV (50 μ M) para bloquear las corrientes glutamatérgicas (Figura 8A, trazo medio) y con la subsecuente administración de bicuculina (Figura 8A, trazo inferior). Puede observarse que tras la administración de CNQX y APV, la frecuencia de las corrientes sinápticas disminuyó, mientras que después de la administración de bicuculina, antagonista de receptores GABA_A, las sIPSCs desaparecen por completo, confirmando su origen GABAérgico. En la Figura 8B se observa el histograma de frecuencias de las sIPSCs sin la administración de algún fármaco, después de la administración de CNQX y APV y la subsecuente administración de bicuculina, mostrando el bloqueo total de las sIPSCs. En otros experimentos (n=4), se utilizó otro antagonista de receptores GABA_A, gabazina o SR-95531, y se obtuvo el mismo resultado.

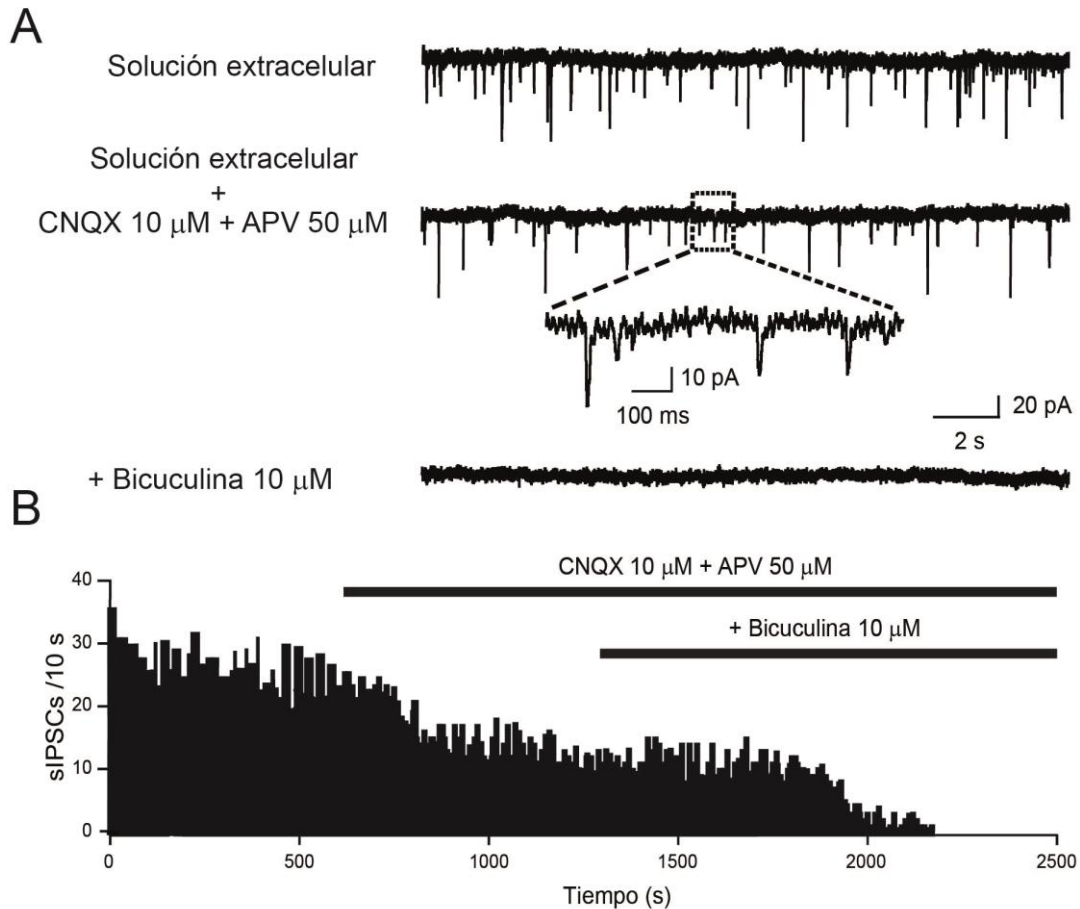


Figura 8. Las corrientes postsinápticas inhibitorias espontáneas (sIPSCs) en células serotoninérgicas son mediadas por la estimulación de receptores GABA_A. (A) Registro de las sIPSCs en fijación de voltaje (a -70 mV) en ausencia de cualquier fármaco (trazo superior) y después del bloqueo de las corrientes glutamatérgicas con CNQX (10 μ M) y APV (50 μ M) (trazo medio). En el cuadro de línea punteada se muestra una región de este trazo aumentando la escala de tiempo. La administración de bicuculina (10 μ M), antagonista de receptores GABA_A, abolió por completo la frecuencia de las sIPSCs. (B) Histograma de frecuencias de las sIPSCs en presencia de solución extracelular; después de la administración de CNQX y APV, y la subsecuente administración de bicuculina, mostrando la completa abolición de las sIPSCs.

La frecuencia de generación de las sIPSCs y las mIPSCs es diferente en células serotoninérgicas del NDR

Para determinar si las corrientes inhibitorias GABAérgicas registradas en las células serotoninérgicas dependían del disparo de las neuronas GABAérgicas, se registraron y analizaron las sIPSCs y las mIPSCs antes y después de la administración de TTX. Se registró un total de 14 células serotoninérgicas y se observó que en el 71 % de ellas, la frecuencia de las IPSCs disminuyó significativamente tras la administración de TTX (prueba de Wilcoxon, $Z = -2.803$, $p = 0.002$, $n = 10$). En el restante 29 %, no se encontraron diferencias significativas entre la frecuencia de las sIPSCs y las mIPSCs (prueba de Wilcoxon, $Z = -1.826$, $p = 0.125$, $n = 4$) (Figura 9).

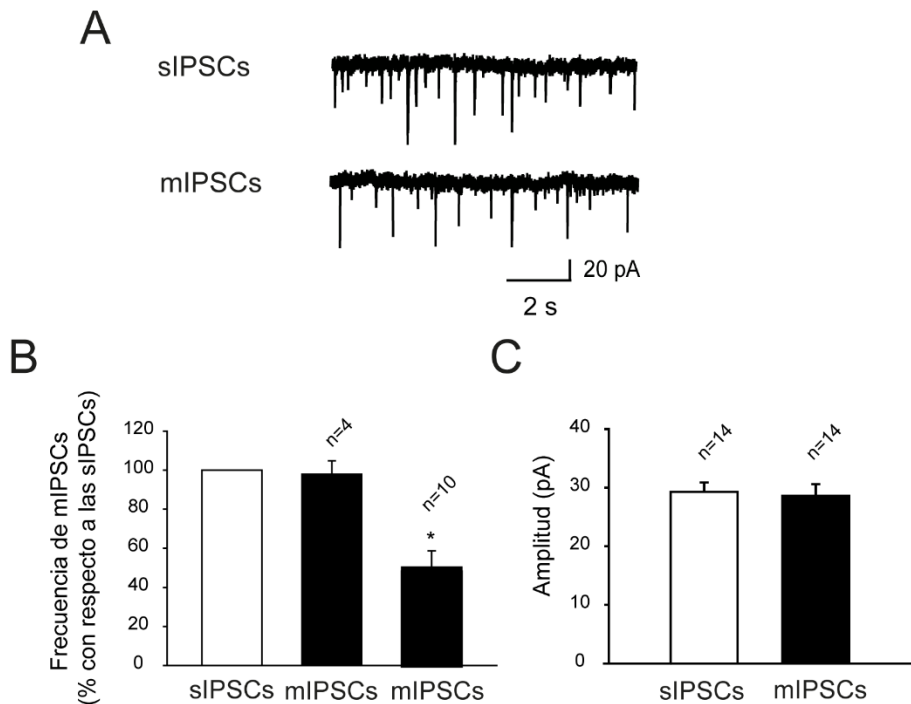


Figura 9. La frecuencia de las sIPSCs y mIPSCs es diferente en células serotoninérgicas del NDR. (A) Registro de sIPSCs y mIPSCs GABAérgicas en fijación de voltaje. La frecuencia de las mIPSCs es significativamente menor que las sIPSCs en la mayoría (10/14) de las células serotoninérgicas (B), pero la amplitud de los eventos no cambia (C). “*” indica la diferencia entre grupos ($p < 0.05$).

En la Figura 9A se muestra el registro representativo de las sIPSCs y las mIPSCs para el grupo que mostró una disminución en la frecuencia de las corrientes inhibitorias después de la administración de TTX. En la Figura 9B se muestran los dos grupos (donde no cambió la frecuencia y donde hubo disminución de ésta) expresados en porcentaje con respecto a la frecuencia de las

sIPSCs. Cuando se observaron las amplitudes de las sIPSCs y las mIPSCs, se encontró que éstas no eran diferentes (Figura 9C). Estos resultados muestran que existe actividad espontánea de disparo en las células GABAérgicas del NDR en rebanadas; además, existe liberación espontánea de este neurotransmisor.

Efecto de la nicotina sobre las sIPSCs en células 5-HT del NDR

La nicotina incrementa la frecuencia de las sIPSCs

La concentración sanguínea de nicotina después de fumar un cigarro es de $1\mu\text{M}$ (Henningfield *et al.*, 1993). Por ello, en el presente estudio se utilizó esta concentración para estudiar los efectos de la nicotina sobre la frecuencia de las sIPSCs en 18 células serotoninérgicas del NDR. Los resultados muestran que la nicotina aumentó la frecuencia de las sIPSCs en un 75% en 13 neuronas, disminuyó la frecuencia de las sIPSCs en 3 y no tuvo efecto en 2 células. Dado que el principal efecto de la nicotina fue aumentar la frecuencia de las sIPSCs, se presentan únicamente los resultados obtenidos de células en donde hubo un aumento en la frecuencia de las sIPSCs por nicotina. En la Figura 10A se muestra el registro de una neurona serotoninérgica en condiciones control (registro superior), el aumento en la frecuencia de las sIPSCs con nicotina (registro medio) y el regreso de la frecuencia de las sIPSCs al valor basal después del lavado de nicotina (registro inferior). En la Figura 10B se muestra que la nicotina disminuye el intervalo entre eventos y, por lo tanto, aumenta la frecuencia de las sIPSCs. La

Figura 10C muestra la fracción acumulada de la amplitud de eventos, donde se puede ver que la nicotina no cambia la amplitud de las sIPSCs. Un cambio en la frecuencia, pero no en la amplitud de las sIPSCs está relacionado con un efecto presináptico de la droga. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el efecto de la nicotina es presináptico. La administración de TTX no afectó el aumento en la frecuencia de corrientes inhibitorias inducido por nicotina (mIPSCs) (prueba de Wilcoxon, $Z = -2.36$; $p = 0.018$), corroborando también el efecto presináptico de la nicotina (Figura 10D). El aumento por nicotina de la frecuencia de las sIPSCs y de las mIPSCs no fue estadísticamente diferente (prueba de Wilcoxon, $Z = -0.832$; $p = 0.43$), sugiriendo, de igual manera, que el aumento en la liberación de GABA, inducido por nicotina, no depende del potencial de acción, sino de un efecto presináptico (Figura 10D).

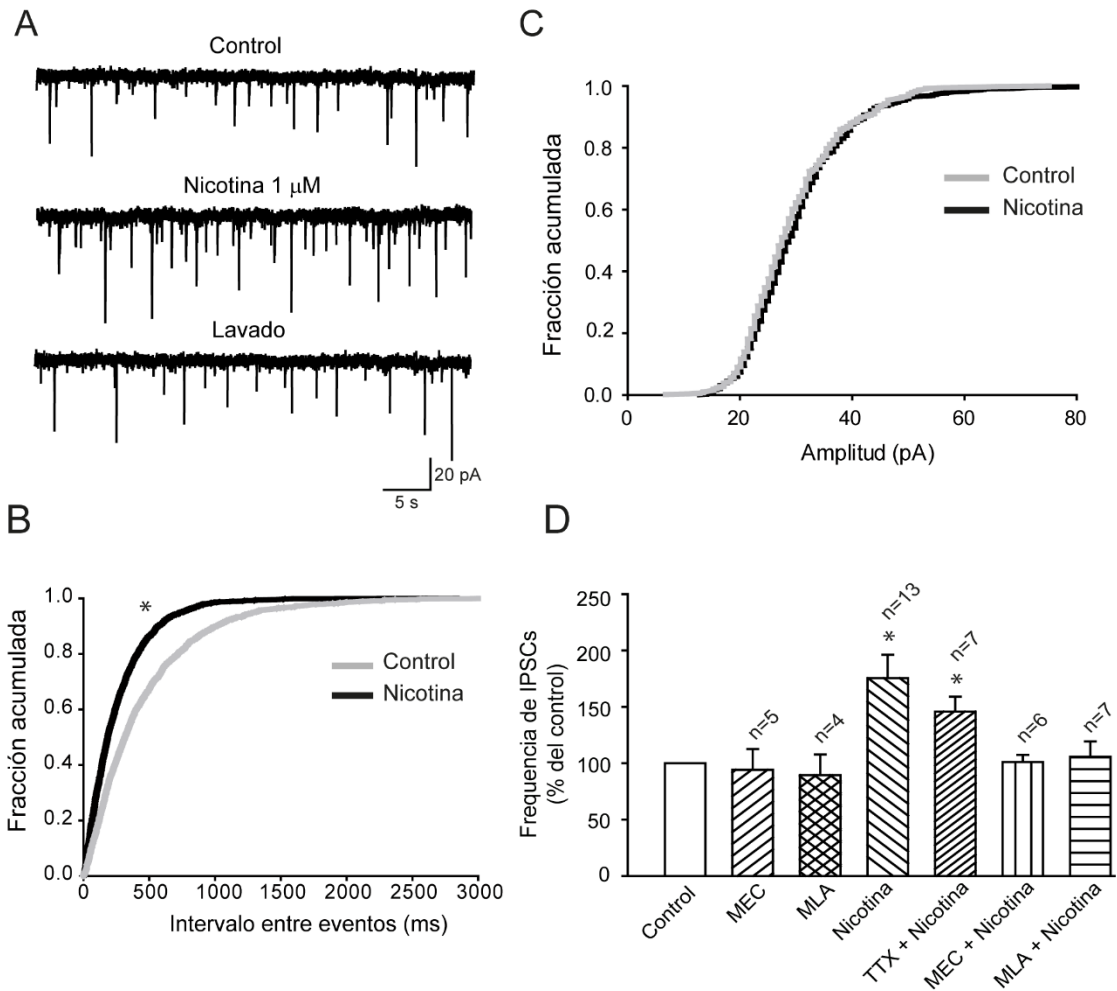


Figura 10. La nicotina aumenta la frecuencia de las sIPSCs en la mayoría de las células serotoninérgicas del NDR. (A) Registro de las sIPSCs GABAérgicas en condiciones control (trazo superior) y después de la administración de nicotina (1 μ M): se observa que la nicotina produce un aumento en la frecuencia de las sIPSCs GABAérgicas (trazo medio). Después del lavado de nicotina, la frecuencia de las sIPSCs regresó a condiciones basales (trazo inferior). Las gráficas de fracción acumulada muestran un aumento en el intervalo entre eventos después de la administración de nicotina (B), sin cambio en la amplitud de estos (C). (D) La administración de mecamilamina (MEC, 50 μ M) o metilcaconitina (MLA, 20 nM) no afectó la frecuencia de las IPSCs *per se*, pero bloqueó el efecto inducido por la nicotina. Se observó un aumento significativo en las IPSCs por nicotina en presencia de TTX. Los datos se expresan como porcentaje con respecto al grupo control. “*” indica la diferencia con respecto al grupo control ($p < 0.05$).

La administración de mecamilamina (MEC, 50 μ M) o metillicaconitina (MLA, 20nM), un antagonista no selectivo de nAChRs y un antagonista selectivo de nAChRs de tipo α 7 respectivamente, no tuvo efecto *per se* sobre la frecuencia de las sIPSCs. Sin embargo, en presencia de cualquiera de estos antagonistas, la nicotina no tuvo el efecto estimulador sobre la frecuencia de las sIPSCs antes observado (Figura 10D), confirmando que este efecto es mediado por nAChRs.

Tipo de nAChR involucrado en la respuesta por nicotina

El aumento en la frecuencia en las sIPSCs es mediado por receptores nicotínicos de tipo α 7

Con el objetivo de identificar el tipo de nAChR involucrado en la respuesta producida por la nicotina, se utilizaron dos agonistas específicos para nAChRs: RJR-2403, para los nAChRs de tipo α 4 β 2 y PNU-282987, para los nAChRs de tipo α 7. Se observó que el RJR-2403 (100 nM) no produjo cambio en la frecuencia de las sIPSCs. Esto se puede ver tanto en el registro directo de sIPSCs (Figura 11A), como en el histograma de frecuencias (Figura 11B). Por el contrario, la administración de PNU-282987 (100 nM) produjo un incremento significativo del 92% (prueba de Wilcoxon, Z= 2.201; p= 0.028) en la frecuencia de las sIPSCs con respecto al control (Figuras 11C y 11D). Este mismo agonista aumentó en un 56% la frecuencia de las mIPSCs (prueba de Wilcoxon, Z= -2.202; p=0.028). Sin embargo, el aumento producido por PNU-282987 en ausencia y presencia de TTX no fue significativamente diferente (prueba de Mann-Whitney, Z= 1.121; p= 0.31), sugiriendo que la activación del nAChR no depende del potencial de acción de las neuronas GABAérgicas (Figura 11E).

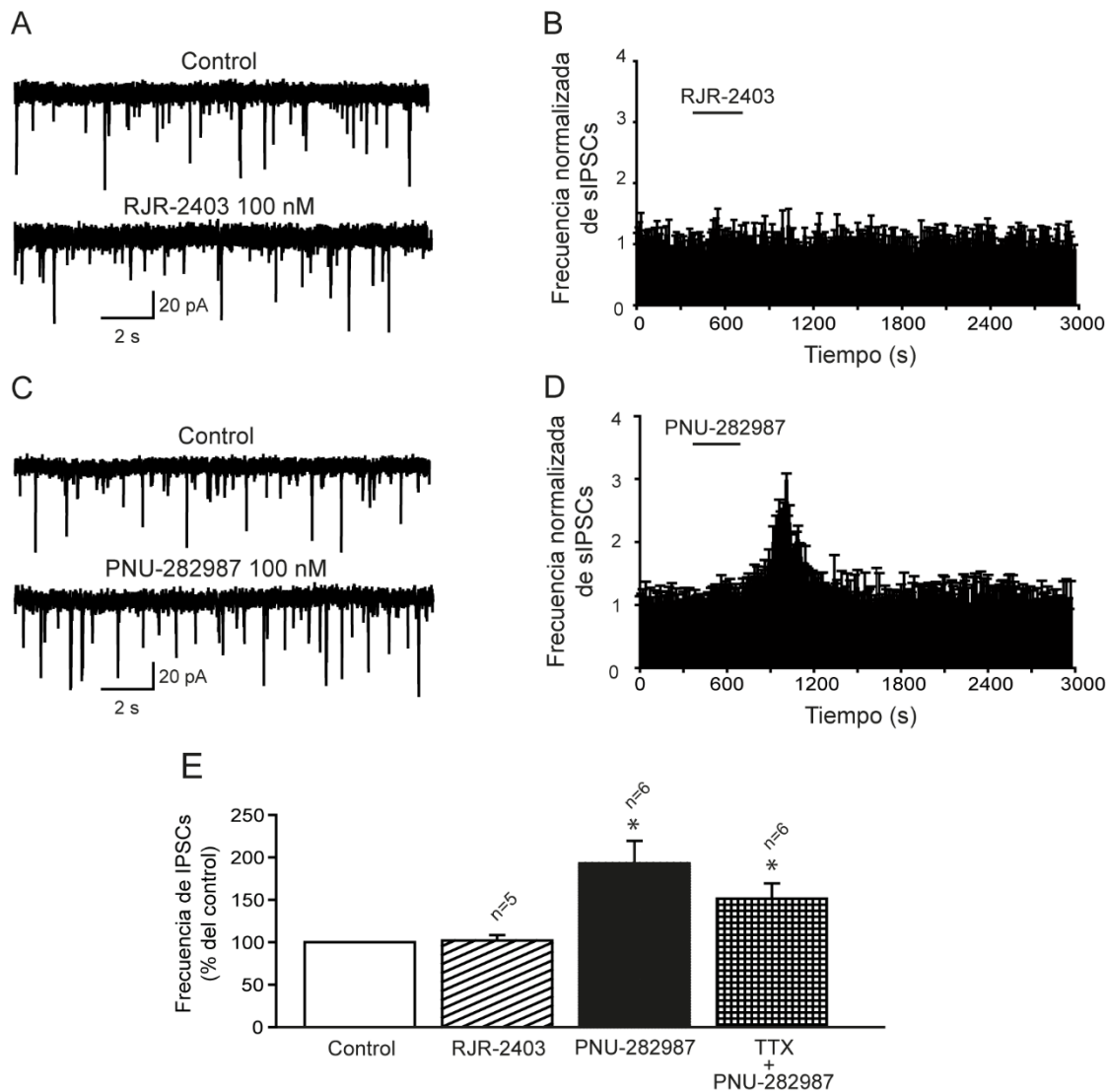


Figura 11. El aumento en la frecuencia de las sIPSCs producido por la nicotina se realiza a través de nAChRs de tipo $\alpha 7$. (A) La administración de RJR-2403 (100 nM), un agonista específico de nAChRs de tipo $\alpha 4\beta 2$, no modificó la frecuencia de las sIPSCs. Lo mismo se puede observar en el histograma de frecuencias (B). En contraste, el PNU-282987 (100 nM), un agonista específico para nAChRs de tipo $\alpha 7$, aumentó significativamente la frecuencia de las sIPSCs (C). (D) Histograma de frecuencias donde se muestra el curso temporal del aumento en la frecuencia de las sIPSCs inducido por PNU-282987. (E) Histograma de frecuencias mostrando el efecto de RJR-2403, PNU-282987 y de TTX + PNU-282987 sobre la frecuencia de las sIPSCs. Los datos se expresan como porcentaje con respecto al grupo control (promedio \pm SEM). “*” indica una diferencia significativa con respecto al grupo control ($p < 0.05$).

Los resultados obtenidos en este grupo experimental muestran que el aumento en la frecuencia de las sIPSCs GABAérgicas inducido por la nicotina es a través de la activación de nAChRs de tipo $\alpha 7$. Como se observó anteriormente, el efecto del agonista específico para el nAChR de tipo $\alpha 7$ sobre la frecuencia de las sIPSCs es muy corto. Esto puede deberse a que este subtipo de nAChRs desensibiliza rápidamente (Alkondon *et al.*, 1997, Galzi *et al.*, 1991). Por ello, se utilizó PNU-120596, un modulador alostérico positivo específico para nAChRs de tipo $\alpha 7$, el cual potencia el efecto de los agonistas al prevenir la desensibilización del receptor (para revisión ver Bertrand y Gopalakrishnan, 2007). En la Figura 12A se muestra el registro representativo de las sIPSCs en condiciones control (trazo superior), después de la administración de PNU-120596 (trazo medio) y la consecuente administración de nicotina (trazo inferior). La administración de PNU-120596 por sí misma no modificó ni la frecuencia ni la amplitud de las sIPSCs (Figura 12A). Este resultado concuerda con los reportados previos (Hurst *et al.*, 2005). Sin embargo, la administración del agonista (en este caso la nicotina) en presencia de PNU-120596 indujo un aumento significativo tanto en la frecuencia (Figura 12B) como en la amplitud (Figura 12C) de las sIPSCs. En comparación con el aumento en la frecuencia de las sIPSCs inducido por nicotina, la administración de PNU-120596 más nicotina tuvo un efecto mucho mayor (Figura 12D). Con este resultado y los anteriores, se comprueba que el nAChR activado por nicotina, y responsable del aumento en la frecuencia de las sIPSCs, es de tipo $\alpha 7$.

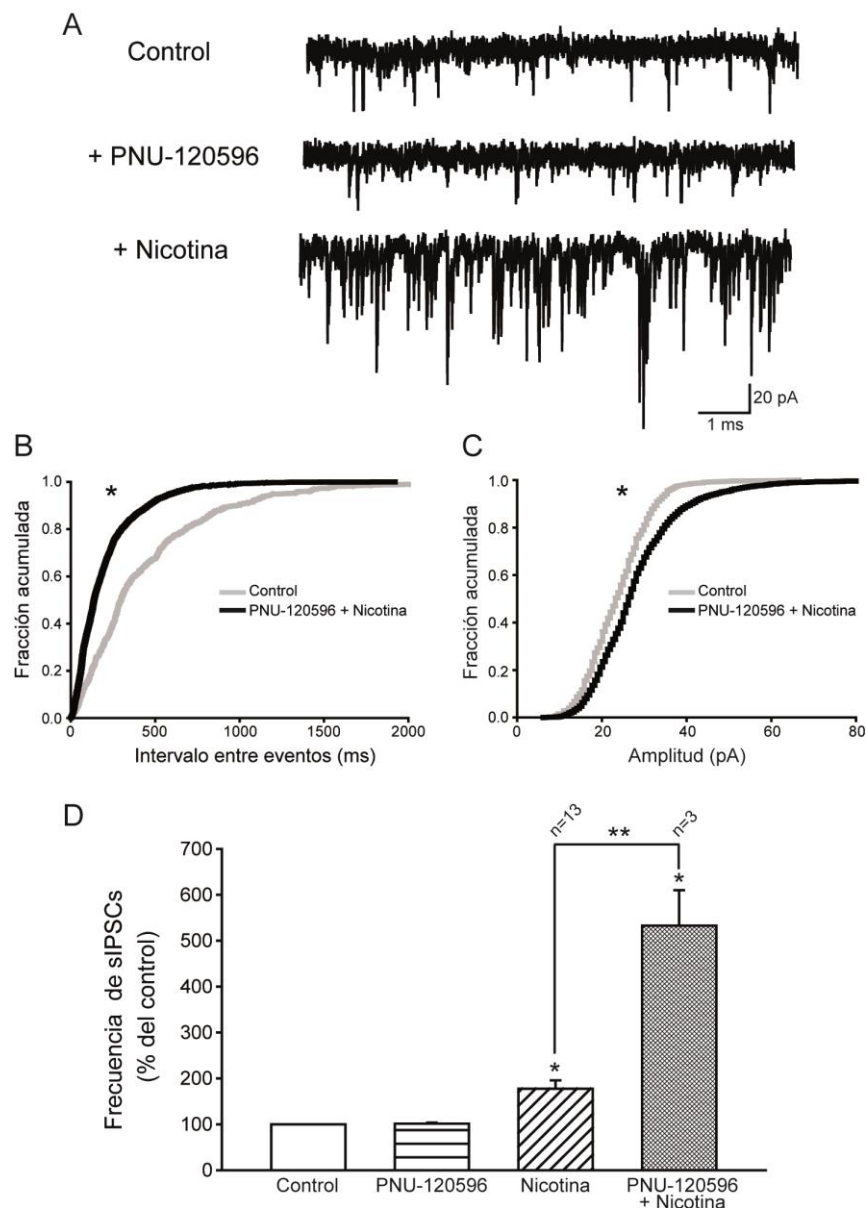


Figura 12. El modulador alostérico positivo, PNU-120596, amplifica el efecto inducido por nicotina sobre las sIPSCs. (A) Registro en fijación de voltaje en condiciones control (trazo superior), después de la administración de PNU-120596 (trazo medio) y con la subsecuente administración de nicotina (trazo inferior). La administración de PNU-120596 junto con nicotina indujo una disminución significativa en el intervalo entre eventos (B) y un aumento en la amplitud de las sIPSCs (C). Histograma de frecuencias donde se muestra el efecto del PNU-120596, la nicotina, o la mezcla de PNU-120596 y nicotina sobre la frecuencia de las sIPSCs. “***” indica una diferencia significativa con respecto al grupo control ($p < 0.05$). “**” indica una diferencia significativa entre el grupo de células que recibió sólo nicotina y el grupo de células tratado con PNU-120596 más nicotina ($p < 0.05$).

Papel del Ca^{2+} extra- e intracelular y su relación con la activación de los nAChRs por nicotina

El efecto de la nicotina sobre las sIPSCs depende de la liberación de Ca^{2+} intracelular

Entre los subtipos de receptores nicotínicos, los $\alpha 7$ permiten el paso de una mayor cantidad de Ca^{2+} al interior de la célula (Alkondon *et al.*, 1997; Fucile, 2004). Cuando se activan estos receptores, la entrada de Ca^{2+} puede activar a los VGCCs y/o inducir la liberación de Ca^{2+} de las pozas intracelulares, fenómeno llamado liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} o CICR, por sus siglas en inglés (Berridge, 1998). Para investigar si la activación del nAChR de tipo $\alpha 7$ en las terminales GABAérgicas del NDR inducía CICR, se utilizó rianodina (100 μM), para bloquear los receptores a rianodina del retículo sarcoplásmico (RS) o tapsigargina (10 μM), bloqueador de la bomba de Ca^{2+} del RS.

Cuando las rebanadas se incubaron con rianodina o tapsigargina por 15 minutos, ninguna de estas drogas alteró significativamente la frecuencia de las sIPSCs (prueba de Wilcoxon para rianodina: $Z = -0.249$, $p < 0.87$, $n = 4$; para tapsigargina: $Z = -0.365$, $p = 0.87$, $n = 4$) (Figura 13A, inserto y 13B, inserto). Sin embargo, cuando la nicotina se administró después de alguna de estas dos drogas, no se presentó su efecto estimulador sobre la frecuencia de las sIPSCs (Figura 13A y 13B). En la Figura 13C se muestra el histograma de frecuencias que resume el efecto de las drogas que bloquean la CICR y la administración de nicotina. Estos resultados sugieren que se requiere de la liberación del Ca^{2+} del RS para que la nicotina aumente la entrada GABAérgicas de las neuronas serotoninérgicas.

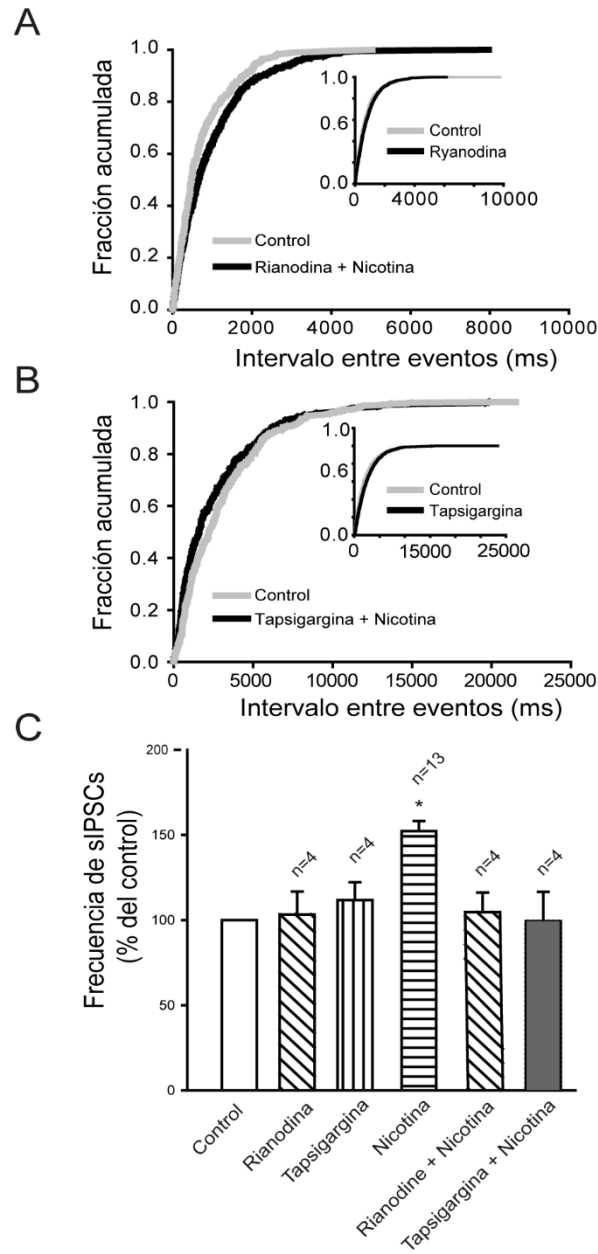


Figura 13. El aumento en la frecuencia de las sIPSCs por nicotina depende de la liberación del Ca^{2+} intracelular. Gráficas de fracción acumulada donde se muestra que la administración de rianodina ($100 \mu\text{M}$) o tapsigargina ($10 \mu\text{M}$) *per se* no produce un cambio en la frecuencia de las sIPSCs (insertos), pero bloquea el efecto de aumento en la frecuencia de las sIPSCs inducido por la nicotina, (A y B). (C) Histograma de frecuencias de las sIPSCs expresado en porcentaje \pm SEM con respecto al grupo control para el efecto de la rianodina o tapsigargina en ausencia y presencia de nicotina. . “*” indica una diferencia significativa con respecto al grupo control ($p < 0.05$).

Por otro lado, se investigó si la activación de los VGCCs era necesaria para que la nicotina llevara a cabo su efecto. Se administró CdCl_2^- , un potente bloqueador de todos los tipos de VGCCs. La administración *per se* de CdCl_2^- indujo una disminución (prueba de Wilcoxon $Z = -2.804$, $p = 0.001$, $n = 4$) en la frecuencia de las sIPSCs (Figura 14D). Sin embargo, al administrar nicotina en presencia de CdCl_2^- , no se encontraron diferencias en la frecuencia de las sIPSCs (Figura 14A). Este resultado sugiere que el efecto de la nicotina depende de la activación de los VGCCs. Para corroborar este efecto, se activó específicamente el nAChR de tipo $\alpha 7$. Cuando se administró PNU-282987, no sólo se encontró que se bloqueaba el efecto inducido por nicotina, sino que incluso se presentó una disminución en la frecuencia de las sIPSCs (prueba de Wilcoxon, $Z = -1.826$, $p = 0.002$, $n = 4$) (Figura 14B).

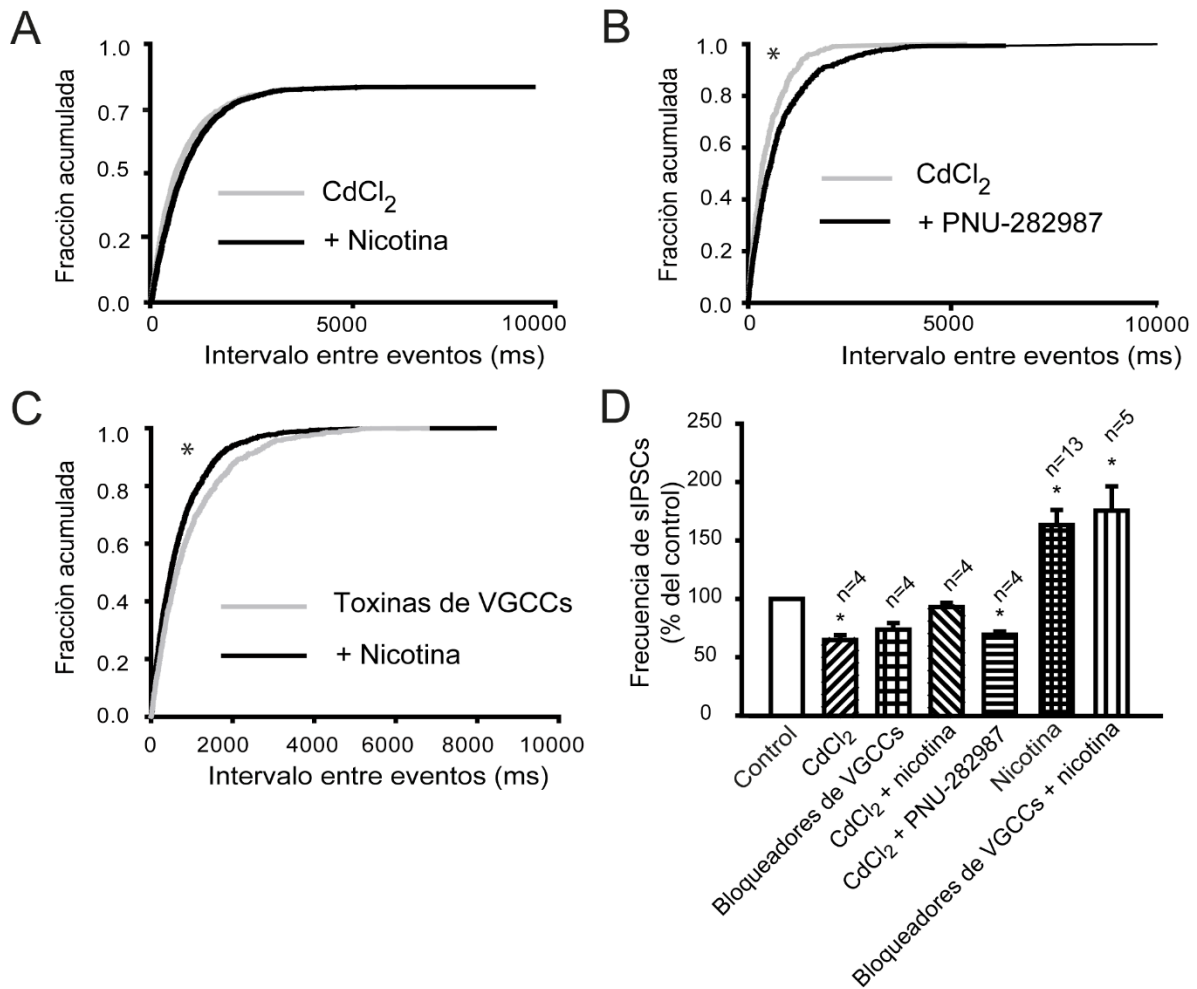


Figura 14. El aumento en la frecuencia de las sIPSCs inducido por la nicotina no depende de la activación de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje. Gráficas de fracción acumulada donde se muestra que la nicotina, en presencia de CdCl₂, no tiene efecto sobre la frecuencia de las sIPSCs (A), pero el PNU-282987 induce una disminución en la frecuencia de las sIPSCs en presencia de CdCl₂ (B). (C) Las toxinas bloqueadoras específicas de los VGCCs (ω -agatoxina-TK, 400 nM; ω -conotoxina-GVIA, 500 nM y nitrendipina, 10 μ M) no bloquearon el efecto de la nicotina. (D) Histograma de frecuencias donde se muestra el efecto del CdCl₂ o de las toxinas bloqueadoras específicas de los VGCCs *per se* y en presencia de nicotina o PNU-282987. “*” indica una diferencia significativa con respecto al grupo control ($p < 0.05$).

Para explicar este resultado se investigó si el CdCl₂ podría tener otro efecto diferente del bloqueo de los VGCCs. Se encontró que ciertos cationes divalentes como el Cd²⁺ o el Zn²⁺ pueden inhibir a los receptores nicotínicos (especialmente a

los de tipo $\alpha 7$) (Eddins *et al.*, 2002), lo que explicaría la disminución en la frecuencia de las sIPSCs inducida por PNU-282987 en presencia de CdCl_2^- . Debido a esto, se procedió a utilizar una mezcla con toxinas específicas para los VGCCs. Esta mezcla contuvo ω -agatoxina-TK (400 nM para bloquear los canales de Ca^{2+} tipo P/Q), ω -conotoxina-GVIA (500 nM para bloquear los canales de Ca^{2+} de tipo N) y nitrendipina (10 μM para bloquear los canales de Ca^{2+} de tipo L). El tratamiento con estas toxinas *per se* disminuyó significativamente la frecuencia de las sIPSCs en un 27% (prueba de Wilcoxon, $Z = -1.826$, $p < 0.032$, $n = 4$; Figura 14D). No obstante, en presencia de estas toxinas, la nicotina aún aumentó la frecuencia de las sIPSCs (prueba de Wilcoxon $Z = -1.826$, $p = 0.038$; Figura 14C), demostrando que no se requiere de la activación de los VGCCs para que la nicotina aumente la frecuencia de las sIPSCs. La Figura 14D muestra el promedio de las sIPSCs con respecto al control en presencia de CdCl_2^- y nicotina o PNU-282987 o de las toxinas bloqueadoras de los VGCCs y nicotina, expresado como porcentaje y comparado con el grupo control. Estos resultados demuestran que el efecto de la nicotina sobre la frecuencia de las sIPSCs es independiente de la activación de los VGCCs, pero dependiente de la activación de la CICR.

Con todos los resultados obtenidos en este trabajo, se construyó un modelo (Figura 15) representando el efecto de la nicotina sobre la entrada GABAérgica de las neuronas serotoninérgicas del NDR. En él se ejemplifica la unión de la nicotina (triángulos naranjas) a su receptor de tipo $\alpha 7$ (en azul), lo que induce la entrada de Ca^{2+} (puntos rojos) a través del receptor. Esta entrada de Ca^{2+} induce la liberación de Ca^{2+} a través de los receptores a rianodina (RyR), lo que genera la liberación de GABA (puntos amarillos) en el botón terminal. El GABA se une a los receptores GABA_A (en rojo) en las neuronas serotoninérgicas del NDR, aumentando la frecuencia de las sIPSCs. Los VGCCs (en verde) no participan en el efecto de la nicotina sobre las terminales GABAérgicas.

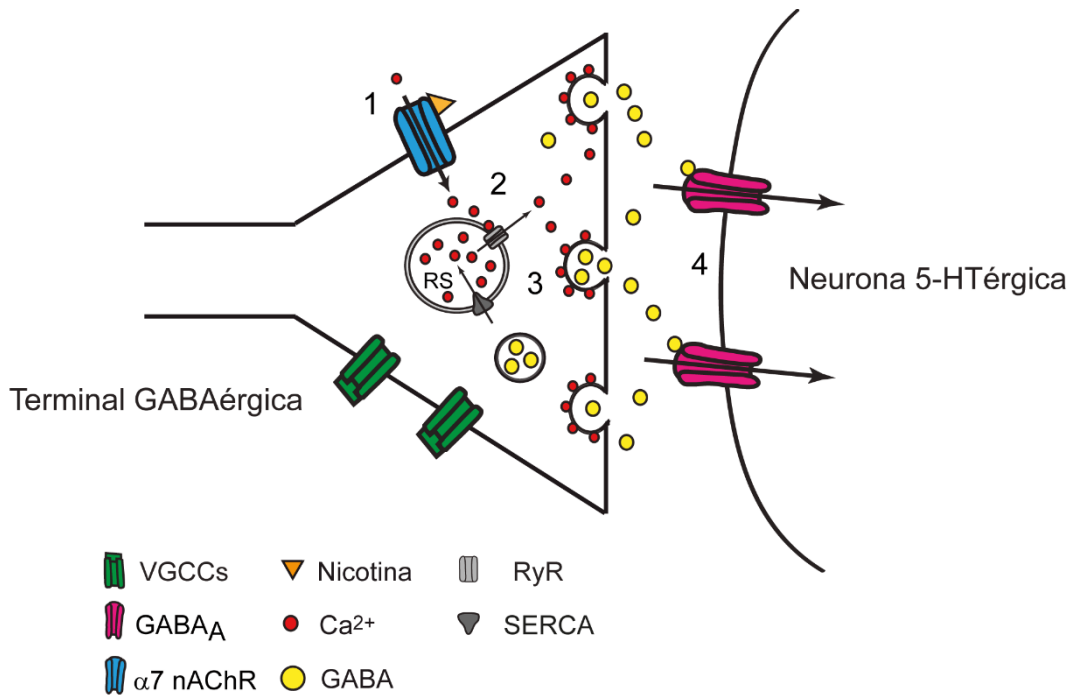


Figura 15. Modelo que resume el efecto de la nicotina sobre las terminales GABAérgicas en el NDR. 1. La nicotina activa los nAChRs de tipo $\alpha 7$ presentes en las terminales GABAérgicas, lo que induce la entrada de Ca^{2+} a través de este receptor. 2. El incremento en el Ca^{2+} intracelular induce la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (RS), fenómeno llamado liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} o CICR. 3. La CICR induce la liberación de GABA de las terminales. 4. GABA se une a los receptores GABA_A, lo que induce un aumento en la frecuencia de las sIPSCs en las neuronas serotoninérgicas. El aumento en la frecuencia de las sIPSCs por nicotina no depende de la activación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VGCCs). RyR= receptores a rianodina; RS= retículo sarcoplásmico; SERCA= ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico.

Discusión

El resultado principal de este trabajo es que la nicotina induce un incremento en la entrada GABAérgica en la mayoría de las neuronas serotoninérgicas del NDR a través de la activación de nAChRs de tipo $\alpha 7$. Este efecto depende de la activación de la liberación de Ca^{2+} intracelular, pero es independiente de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje.

Regulación de la entrada excitatoria e inhibitoria sobre las neuronas serotoninérgicas del NDR

Existen controles excitatorios glutamatérgico y adrenérgico y un control inhibitorio GABAérgico sobre las neuronas serotoninérgicas del NDR. En la corteza, las neuronas GABAérgicas sincronizan la actividad de las neuronas vecinas, controlando de esta manera la vía de salida de esta área cerebral (McBain y Fisahn, 2001). Es posible que las interneuronas GABAérgicas del NDR controlen la actividad de poblaciones de células serotoninérgicas como se ha observado en algunas actividades fisiológicas, como las diferentes fases del sueño - vigilia. Durante el sueño MOR, aumenta la liberación de GABA en el NDR y éste aumento está acompañado de una disminución en la frecuencia de disparo de las neuronas serotoninérgicas del mismo núcleo (Nitz y Siegel, 1997). Además, la administración de muscimol, agonista de receptores GABA_A, o la activación de receptores 5-HT_{1A}, directamente en el NDR aumenta la actividad locomotriz (Mignon y Wolf, 2002; Paris y Lorens, 1987).

Existen evidencias anatómicas y fisiológicas que muestran una inhibición importante de la actividad de las neuronas serotoninérgicas del NDR por neuronas GABAérgicas. En modelos animales, se ha demostrado la existencia de una modulación GABAérgica sobre la actividad de las neuronas serotoninérgicas en

diversas funciones fisiológicas como la respiración, la termorregulación y algunas funciones autonómicas (Broadbelt et al., 2010; Liu et al., 2000; Serrats et al., 2005). Mediante microscopía electrónica, se ha demostrado la existencia de terminales GABAérgicas sobre los somas de las neuronas serotoninérgicas del NDR, (Harandi *et al.*, 1987). Además, trabajos de electrofisiología han demostrado la existencia de una entrada GABAérgica sobre las neuronas serotoninérgicas del NDR mediante el registro de las sIPSCs (Chang *et al.*, 2011; Lemos et al., 2006). En concordancia con estos resultados, en el presente trabajo se registraron sIPSCs GABAérgicas en las neuronas serotoninérgicas del NDR, con una frecuencia de 0.77 ± 0.10 Hz. Lemos y colaboradores (2006), reportaron una frecuencia de las sIPSCs GABAérgicas mucho mayor (4.1 ± 0.6 Hz). Esta diferencia podría explicarse por los datos reportados por Rood y colaboradores (2014), donde se indica que los ratones jóvenes tienen menor tono de inervación GABAérgica (la frecuencia de las sIPSCs es de menos de 0.3 Hz en ratones de 4 días) y que ésta va aumentando con la edad del animal. En este trabajo se utilizaron ratas Wistar macho de 18 a 21 días de edad, mientras que Lemos y colaboradores utilizaron ratas de la cepa Sprague-Dawley con una edad de ~30 días.

En condiciones basales, se encontró que en la mayoría de las células registradas (71%), la frecuencia de las mIPSCs es menor que la frecuencia de las sIPSCs, mientras que en el restante 29%, la frecuencia entre las mIPSCs y las sIPSCs es similar (Figura 8). En un trabajo realizado en el laboratorio (Meléndez et al., comunicación personal), que aproximadamente el 60% de las neuronas GABAérgicas del NDR tiene actividad de disparo espontáneo, lo que explicaría por qué, en el presente estudio, la frecuencia de las mIPSCs es menor que la de las sIPSCs. En el trabajo de Lemos y colaboradores (2006), se encontró que la frecuencia de las sIPSCs y las mIPSCs era igual. Esta discrepancia podría explicarse tanto por la edad, como por la cepa de ratas utilizadas en los experimentos (ratas Wistar vs Sprague-Dawley).

La nicotina incrementa la frecuencia de las sIPSCs a través de nAChRs presinápticos de tipo $\alpha 7$

La administración de nicotina aumentó la frecuencia de las sIPSCs en la mayoría (72 %) de las neuronas serotoninérgicas del NDR. De acuerdo con lo anterior, en un estudio previo llevado a cabo por Chang y colaboradores (2011), la nicotina aumentó la entrada GABAérgica sobre las células serotoninérgicas del NDR. Sin embargo, este efecto se observó en un número más bajo de neuronas (34 %). La expresión de nAChRs es dependiente de la edad del animal. Las ratas de 0 a 28 días de edad presentan una mayor densidad de sitios de unión a nicotina y bungarotoxina [3H] en el cerebro, que las de mayor edad (Zhang et al., 1998). En el presente trabajo se utilizaron ratas de 18-21 días, mientras que Chang y colaboradores (2011) registraron neuronas de ratas de 60 días de edad, lo que podría explicar la diferencia en los resultados. Por otro lado, el aumento en la frecuencia de las sIPSCs por nicotina reportado en este trabajo se observó también en presencia de TTX, lo que sugeriría un efecto presináptico de la droga.

La administración de RJR-2403 no produjo cambio en la frecuencia de las sIPSCs, mostrando así que el receptor $\alpha 4\beta 2$ no está involucrado en el efecto de la nicotina sobre la frecuencia de las sIPSCs. Al contrario, la administración de PNU-282987 indujo un aumento significativo en la frecuencia de las sIPSCs, demostrando que el tipo de nAChRs activado por nicotina es el $\alpha 7$. Asimismo, el efecto de la nicotina se bloqueó en presencia de MLA, un antagonista específico de nAChRs de tipo $\alpha 7$, confirmando el tipo de receptor activado por nicotina. El aumento en la liberación de GABA mediante la activación de los nAChRs de tipo $\alpha 7$ se ha reportado en varias áreas cerebrales como el hipocampo (Alkondon et al., 2000; Kanno et al., 2005; Hurst et al., 2005; Maggi et al., 2001; Radcliffe et al., 1999), el núcleo motor dorsal del nervio vago (Bertolino et al., 1997) y el núcleo interpenduncular (Léna et al., 1993). Por su parte, el aumento en la liberación de GABA inducido por la activación de nAChRs de tipo $\alpha 4\beta 2$, se ha demostrado para

áreas cerebrales como el AVT (Corrigan et al., 2000), la corteza, el estriado, el tálamo (McClure-Begley et al., 2009), el septum medial (Yang, 1996), la sustancia gris periacueductal (Nakamura et al., 2010), la corteza prefrontal (Aracri et al., 2010) y el núcleo lateral espiriforme (Zhu y Chappinelli, 2002). De acuerdo con los resultados presentados anteriormente, la activación de los nAChRs de tipo $\alpha 7$ indujo un aumento en la liberación de GABA, lo que se puede observar como un aumento en la frecuencia de las sIPSCs.

En un estudio reciente, Yang y Brown (2014) mostraron que la administración de carbacol, un análogo no hidrolizable de acetilcolina, no produce cambio en la frecuencia de las sIPSCs GABAérgicas de las neuronas serotoninérgicas del NDR. Sin embargo, el carbacol tiene una baja afinidad por los nAChRs de tipo $\alpha 7$ (Bolchi et al., 2013), lo que resultaría en una estimulación reducida de este receptor, en comparación con el uso de la nicotina (Bolchi et al., 2013).

Además del uso de agonistas y antagonistas específicos de nAChRs para identificar el tipo de receptor activado por nicotina, se pueden emplear moduladores alostéricos positivos (PAM, por sus siglas en inglés), que han sido de gran ayuda farmacológica. Existen dos tipos de PAMs específicos para nAChRs de tipo $\alpha 7$: los de tipo I, como el CCMI (N-(4-chlorofenil)- α -[[4-chloropfenil) amino]metileno]-3-metil-5-isoxazoleacet-amida) o compuesto 6 (Ng et al., 2007), que incrementan la amplitud de la corriente; y los del tipo II, como el PNU-120596 (Hurst et al., 2005) que además de aumentar la amplitud, incrementan su tiempo de decaimiento. La administración *per se* del PNU-120596 no indujo ningún cambio en la frecuencia de las sIPSCs, pero en presencia de la nicotina, indujo un aumento tanto en la frecuencia como en la amplitud de éstas. De acuerdo con este resultado, Hurst y colaboradores (2005) mostraron que la administración de PNU-120596 no cambia ni la amplitud ni la frecuencia de las sIPSCs registradas en

interneuronas de hipocampo. Posteriormente, cuando se administró ACh, se encontró un aumento significativo en ambos parámetros de las sIPSCs.

Debido a las muchas aferencias GABAérgicas que reciben las células serotoninérgicas del NDR, no se sabe con exactitud de donde provienen las terminales que poseen estos receptores nicotínicos. Sin embargo, debido a que se trabajó en un área limitada (rebanada de 350 μm), se podría sugerir que estas aferencias provienen de lugares cercanos como la sustancia gris periacueductal o de interneuronas del propio NDR. Apoyando esta idea, estudios de inmunohistoquímica han demostrado que las neuronas GABAérgicas del NDR expresan ciertas subunidades de nAChRs, entre las que se encuentran las del tipo $\alpha 7$ (Bitner y Nikkel, 2002). Por lo tanto, la estimulación de estos receptores en las neuronas GABAérgicas induciría un aumento en la frecuencia de las sIPSCs en las neuronas serotoninérgicas, como se observó en este trabajo.

La activación del nAChR $\alpha 7$ induce la liberación de Ca^{2+} intracelular

Las acciones presinápticas de la nicotina y la consecuente liberación del neurotransmisor dependen del incremento en los niveles de Ca^{2+} intracelular. El mecanismo clásico por el cual se libera el neurotransmisor es mediante la entrada de Ca^{2+} a través de los VGCCs. Sin embargo, la exocitosis del neurotransmisor puede deberse también a un aumento del Ca^{2+} intracelular por la activación de las pozas intracelulares (Peng, 1996). Para ello, es necesario que algunas porciones del retículo endoplásmico estén en contacto con la membrana plasmática y las vesículas que contienen el neurotransmisor (Westrum y Gray, 1986).

Los mecanismos por los cuales se libera el neurotransmisor dependen del tipo de nAChR activado. La estimulación de los nAChRs de tipo $\alpha 4\beta 2$ produce una

despolarización de la membrana que promueve la apertura de los VGCCs. La entrada de Ca^{2+} , tanto por los nAChR, como por los VGCCs, induce la liberación de Ca^{2+} intracelular a niveles requeridos para la liberación del neurotransmisor (Dajas-Bailador et al., 2002; Dickinson et al., 2007., 2008; Garduño et al., 2012). En el caso de los nAChRs de tipo $\alpha 7$, la situación es diferente, ya que dentro de los subtipos de nAChRs que existen, estos son los que tienen la mayor permeabilidad al Ca^{2+} (Alkondon et al., 1997; Séguéla et al., 1993). Por lo tanto, su activación induce una mayor entrada de Ca^{2+} , en comparación con los $\alpha 4\beta 2$, y este incremento produce CICR sin la activación de los VGCCs (Dickinson et al., 2007; Gray et al., 1996; Sharma et al., 2008, Sharma y Vijayaraghavan, 2003). De acuerdo con lo anterior, estos resultados muestran que no se necesita de la activación de los VGCCs para que la nicotina aumente la liberación de GABA en las neuronas serotoninérgicas del NDR, pero la liberación de Ca^{2+} intracelular es prescindible (ver Figura 15). Apoyando esta idea, se ha reportado que las pozas intracelulares de Ca^{2+} en la presinapsis regulan la liberación de neurotransmisores en varias áreas del cerebro (Conti et al., 2004; Llano et al., 2000). En otros trabajos se ha mencionado que el mecanismo por el cual la CICR induce la liberación del neurotransmisor está relacionado con la activación de cinasas dependientes de Ca^{2+} , como la proteína cinasa II dependiente de Ca^{2+} /calmodulina o CAMKII (Sharma et al., 2008) o la proteína cinasa C o PKC (Wu y Wu, 2001). La administración de nicotina y su consecuente activación del nAChR $\alpha 7$ podría activar alguna de estas vías, lo que induciría un aumento en la liberación de GABA.

En las neuronas serotoninérgicas del NDR, la nicotina produce tanto efectos excitatorios como inhibitorios. Los efectos excitatorios de la nicotina sobre la mayoría de las neuronas serotoninérgicas se deben a la activación de receptores nicotínicos de tipo $\alpha 4\beta 2$ o $\alpha 7$ somatodendríticos presentes en estas neuronas (Galindo-Charles et al., 2008). Otra posible vía excitatoria de la nicotina es indirecta, mediante el aumento en la liberación de glutamato a través de nAChRs

presinápticos $\alpha 4\beta 2$ (Garduño et al., 2012) o de noradrenalina a través de nAChRs $\alpha 7$ (Li et al., 1998). Por el contrario, los efectos inhibitorios de la nicotina están mediados por un aumento en la liberación somatodendrítica de 5-HT y la posterior activación de autorreceptores 5-HT_{1A}. Este mecanismo se debe a la activación de los nAChRs $\alpha 4\beta 2$, los cuales inducen liberación local de 5-HT (Frías-Dominguez et al., 2013). Otro mecanismo indirecto de la nicotina puede ser el aumento en la liberación de 5-HT y la consecuente activación de receptores 5-HT_{2C} en las neuronas GABAérgicas (Boothman et al., 2006; Gocho et al., 2012; Liu et al., 2000; Serrats et al., 2005), cuya estimulación produciría una excitación en las mismas, inhibiendo a su vez a las neuronas serotoninérgicas del NDR.

El control de los niveles de 5-HT cerebral, así como la actividad de las neuronas serotoninérgicas del NDR es de gran importancia para el estado de ánimo y otras funciones cerebrales. Por ejemplo, se ha demostrado que los ratones *knockout* de receptores 5-HT_{1A} muestran un fenotipo ansioso (Ramboz et al., 1998; Donaldson et al., 2014). El aumento en la liberación de GABA es otra vía por la cual la nicotina inhibe las neuronas serotoninérgicas del rafé, además de la liberación local de 5-HT seguida por la activación de los autorreceptores 5-HT_{1A}. De acuerdo con estos resultados, la administración local de nicotina en el NDR incrementa tanto la liberación de 5-HT como la de GABA (Mihailescu et al., 2002). Los resultados de este trabajo muestran que la nicotina aumenta la frecuencia de las sIPSCs en el 72% de las neuronas serotoninérgicas del NDR. Estudios previos, en rebanadas de cerebro, han reportado que la nicotina incrementa la frecuencia de disparo en el 80% de las neuronas serotoninérgicas del NDR (Li et al., 1998; Mihailescu et al., 1998; 2001; 2002). Esto indica que, en rebanadas de cerebro, los efectos excitatorios de la nicotina prevalecen sobre los efectos inhibitorios.

Una posible explicación para esta situación es que la nicotina aumenta también la entrada excitatoria glutamatérgica de las neuronas serotoninérgicas del NDR

(Garduño *et al.*, 2012). El aumento en la frecuencia de las corrientes postsinápticas excitatorias espontáneas (sEPSCs) glutamatérgicas producido por nicotina es de mayor amplitud (88%) y de una duración mayor (más de 20 min) que el observado para las sIPSCs GABAérgicas en el presente estudio (el aumento fue de 75% y con una duración menor a 15 min), lo que explicaría por qué el efecto excitador de la nicotina en las neuronas serotoninérgicas del NDR prevalece sobre el inhibitorio.

El incremento en la liberación de GABA inducido por nicotina reduce la excitabilidad de las neuronas serotoninérgicas del NDR a través de la estimulación de receptores GABA_A y GABA_B presentes en estas células (Gao *et al.*, 1993; Serrats *et al.*, 2003). De acuerdo con esto, en un estudio anterior, la administración de bicuculina, un antagonista de GABA_A, aumenta el efecto estimulante de la nicotina en las neuronas serotoninérgicas del NDR (Mihailescu *et al.*, 2002). El efecto inhibitorio de la nicotina sobre las neuronas serotoninérgicas del NDR a través de GABA puede tener diferentes intensidades en distintas regiones del NDR. Corteen y colaboradores (2014) mostraron que la mayoría de las neuronas serotoninérgicas del NDR expresan receptores GABA_A preferencialmente en las dendritas, cuya estimulación induce inhibición tónica; mientras que un pequeño grupo de neuronas localizadas en las regiones rostrales del NDR expresa receptores GABA_A somáticos y dendríticos, cuya estimulación induce inhibición fásica. Por ello, el grado de inhibición por nicotina sobre las neuronas serotoninérgicas del NDR estará influenciado no sólo por la localización y el subtipo de nAChR, sino también por la localización de los receptores GABA_A en las neuronas serotoninérgicas. La existencia de diferentes grados de inhibición de estas neuronas en varias regiones del NDR explicaría por qué la administración sistémica de nicotina produce aumento en la liberación de 5-HT en algunas regiones específicas del cerebro, mientras que en otras produce una disminución o no produce cambios en el contenido extracelular de este neurotransmisor (Ribeiro *et al.*, 1993; Shearman *et al.*, 2008; Singer *et al.*, 2004).

Otro punto importante a tener en consideración es que la liberación de GABA inducida por nicotina dentro del NDR podría también inhibir la actividad de las neuronas GABAérgicas, ya que éstas expresan receptores GABA_A tanto somáticos como dendríticos (Corteen et al., 2014). El grado de esta inhibición dependerá tanto de la entrada excitatoria glutamatérgica que reciben estas neuronas (Celada et al., 2001; Challis et al., 2014; Soiza-Reilly et al., 2013), como de la expresión de nAChRs en las mismas neuronas GABAérgicas que pueden ser estimulados directamente por nicotina (Bitner y Nikkel, 2002).

Hay una asociación entre las terminales GABAérgicas y glutamatérgicas que hacen contacto con las neuronas serotoninérgicas del NDR: la estimulación del receptor GABA_A despolariza las terminales glutamatérgicas debido a la presencia de transportadores de Na⁺-K⁺-Cl⁻ (Soiza-Reilly et al., 2013). De esta manera, esta relación axo-axónica entre GABA y glutamato ejerce un control sobre la liberación de 5-HT.

En conclusión, los resultados de este trabajo muestran que la nicotina aumenta la entrada GABAérgica sobre las células serotoninérgicas del NDR a través de nAChRs de tipo $\alpha 7$. El efecto de la nicotina no depende de potencial de acción ni de la apertura de los VGCCs, ya que se observó el aumento en la frecuencia de las sIPSCs en presencia de TTX o de las toxinas bloqueadoras de VGCCs. Sin embargo, el efecto de la nicotina sobre la liberación de GABA depende de la liberación de Ca²⁺ inducida por Ca²⁺, ya que ésta se bloqueó con la administración de rianodina (bloqueador de los canales de Ca²⁺ del RS) o tapsigargina (bloqueador de la bomba de Ca²⁺ del RS).

Referencias

Abrams JK, Johnson PL, Hollis JH, Lowry CA. Anatomic and functional topography of the dorsal raphe nucleus. *Ann N Y Acad Sci.* 1018: 46-57, 2004.

Adams CE, Stitzel JA, Collins AC, Freedman R. $\alpha 7$ -Nicotinic receptor expression and the anatomical organization of hippocampal interneurons. *Brain Research* 922, 180-190, 2001.

Aghajanian GK, Gallager DW. Raphe origin of serotonergic nerves terminating in the cerebral ventricles. *Brain Res.* 88: 221-231, 1975.

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

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

Albuquerque EX, Pereira EF, Castro NG, Alkondon M, Reinhardt S, Schröder H, Maelicke A. Nicotinic receptor function in the mammalian central nervous system. *Ann N Y Acad Sci.* 757: 48-72, 1995.

Allers KA, Sharp T. Neurochemical and anatomical identification of fast- and slow-firing neurones in the rat dorsal raphe nucleus using juxtacellular labelling methods in vivo. *Neuroscience* 122: 193-204, 2003.

Alkondon M, Pereira EF, Cortes WS, Maelicke A, Albuquerque EX. Choline is a selective agonist of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons. *Eur J Neurosci* 9: 2734-2742, 1997.

Alkondon M, Braga MF, Pereira EF, Maelicke A, Albuquerque EX. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors and modulation of gabaergic synaptic transmission in the hippocampus. *Eur J Pharmacol.* 393: 59-67, 2000.

Andrade R, Nicoll RA. Pharmacologically distinct actions of serotonin on single pyramidal neurones of the rat hippocampus recorded in vitro. *J Physiol.* 394: 99-124, 1987.

Anand R, Lindstrom J. Nucleotide sequence of the human nicotinic acetylcholine receptor beta 2 subunit gene. *Nucleic Acids Res.* 18: 4272, 1990.

Aracri P, Consonni S, Morini R, Perrella M, Rodighiero S, Amadeo A, Becchetti A. Tonic modulation of GABA release by nicotinic acetylcholine receptors in layer V of the murine prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 20: 1539-1555, 2010.

Audero E, Mlinar B, Baccini G, Skachokova ZK, Corradetti R, Gross C. Suppression of serotonin neuron firing increases aggression in mice. *J Neurosci*. 33: 8678-8688, 2013.

Azmitia EC. Serotonin neurons, neuroplasticity, and homeostasis of neural tissue. *Neuropsychopharmacology*. 21: 33S-45S, 1999.

Azmitia EC, Segal M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol*. 1; 179(3): 641-667, 1978.

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

Baker KG, Halliday GM, Hornung JP, Geffen LB, Cotton RG Tork I. Distribution, morphology and number of monoamine-synthesizing and substance P-containing neurons in the human dorsal raphe nucleus. *Neuroscience*, 42: 757–775, 1991.

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

Bárbara A, Aceves J, Arias-Montaña JA. Histamine H1 receptors in rat dorsal raphe nucleus: pharmacological characterisation and linking to increased neuronal activity. *Brain Res*. 954: 247-255, 2002.

Barnes NM, Costall B, Kelly ME, Onaivi ES, Naylor RJ. Ketotifen and its analogues reduce aversive responding in the rodent. *Pharmacol, Biochem Behav*. 37: 785-793, 1990.

Barnes NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38: 1083–1152, 1999.

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

Belin MF, Aguera M, Tappaz M, McRae-Degueurce A, Bobillier P, Pujol JF. GABA-accumulating neurons in the nucleus raphe dorsalis and periaqueductal gray in the rat: a biochemical and radioautographic study. *Brain Res*. 170: 279-297, 1979.

- Benwell ME, Balfour DJ, Anderson JM. Evidence that tobacco smoking increases the density of (-)-[3H]nicotine binding sites in human brain. *J Neurochem.* 50: 1243-1247, 1988.
- Berridge MJ. Neuronal calcium signaling. *Neuron* 21: 13-26, 1998.
- Bertolino M, Kellar KJ, Vicini S, Gillis RA. Nicotinic receptor mediates spontaneous GABA release in the rat dorsal motor nucleus of the vagus. *Neuroscience* 79: 671-681, 1997.
- Bertrand D, Gopalakrishnan M. Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol* 74: 1155–1163, 2007.
- Bhagwagar Z, Whale R, Cowen PJ. State and trait abnormalities in serotonin function in major depression. *Br J Psychiatry*, 180: 24-28, 2002.
- Bitner RS, Nikkel AL. Alpha-7 nicotinic expression by two distinct cell types in the dorsal raphe nucleus and locus coeruleus of rat. *Brain Research* 938: 45-54, 2002.
- Bitner RS, Nikkel AL, Curzon P, Arneric SP, Bannon AW, Decker MW. Role of the nucleus raphe magnus in antinociception produced by ABT-594: immediate early gene responses possibly linked to neuronal nicotinic acetylcholine receptors on serotonergic neurons. *J Neurosci.* 18: 5426-5432, 1998.
- Blanchard DC, Griebel G, Blanchard RJ. The Mouse Defense Test Battery: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. *Eur J Pharmacol* 28; 463(1-3): 97-116, 2003.
- Bobillier P, Seguin S, Petitjean F, Salvvert D, Touret M, Jouvret M. The raphe nuclei of the cat brain stem: a topographical atlas of their efferent projections as revealed by autoradiography. *Brain Res.* 113: 449-486, 1976.
- Bolchi C, Valoti E, Binda M, Fasoli F, Ferrara R, Fumagalli L, Gotti C, Matucci R, Vistoli G, Pallavicini M. Design, synthesis and binding affinity of acetylcholine carbamoyl analogues. *Bioorg Med Chem Lett* 23: 6481-6485, 2013.
- Boothman L, Raley J, Denk F, Hirani E, Sharp T. In vivo evidence that 5-HT_{2c} receptors inhibit 5-HT neuronal activity via GABAergic mechanism. *Br J Pharmacol* 149: 861-969, 2006.
- Bradley SR, Pieribone VA, Wang W, Severson CA, Jacobs RA, Richerson GB. Chemosensitive serotonergic neurons are closely associated with large medullary arteries. *Nat Neurosci.* 5: 401-402, 2002.

Broadbelt KG, Paterson DS, Rivera KD, Trachtenberg FL, Kinney HC. Neuroanatomic relationships between the GABAergic and serotonergic systems in the developing human medulla. *Auton Neurosci.* 154: 30-41, 2010.

Cai X, Flores-Hernandez J, Feng J, Yan Z. Activity dependent bidirectional regulation of GABA_A receptor channels by the 5-HT₄ receptor-mediated signaling in rat prefrontal cortical pyramidal neurons. *J Physiol.* 540: 743-759, 2002.

Calizo LH, Akanwa A, Ma X, Pan YZ, Lemos JC, Craige C, Heemstra LA, Beck SG. Raphe serotonin neurons are not homogenous: electrophysiological, morphological and neurochemical evidence. *Neuropharmacology* 61: 524-543, 2011.

Carli M, Baviera M, Invernizzi RW, Balducci C. Dissociable contribution of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the medial prefrontal cortex to different aspects of executive control such as impulsivity and compulsive perseveration in rats. *Neuropsychopharmacology* 31, 757–767, 2006.

Celada P, Puig MV, Casanovas JM, Guillazo G, Artigas F. Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: Involvement of serotonin-1A, GABA(A), and glutamate receptors. *J Neurosci* 21: 9917-9929, 2001.

Challis C, Boulden J, Veerakumar A, Espallergues J, Vassoler FM, Pierce RC, Beck SG, Berton O. Raphe GABAergic neurons mediate the acquisition of avoidance after social defeat. *J Neurosci.* 33: 13978-13988, 2013.

Challis C, Beck SG, Berton O. Optogenetic modulation of descending prefrontocortical inputs to the dorsal raphe bidirectionally bias socioaffective choices after social defeat. *Front Behav Neurosci* 8: 1-14, 2014.

Chang B, Daniele CA, Gallagher K, Madonia M, Mitchum RD, Barrett L, Vezina P, McGehee DS. Nicotinic excitation of serotonergic projections from dorsal raphe to the nucleus accumbens. *J Neurophysiol* 106: 801-808, 2011.

Cheeta S, Irvine EE, Kenny PJ, File SE. The dorsal raphe nucleus is a crucial structure mediating nicotine's anxiolytic effects and the development of tolerance and withdrawal responses. *Psychopharmacology*; 155: 78–85. 2001.

Cheeta S, Kenny PJ, File SE. The role of 5-HT_{1A} receptors in mediating the anxiogenic effects of nicotine following lateral septal administration. *Eur J Neurosci*; 12: 3797– 3802, 2000.

Clementi F, Fornasari D, Gotti C. Neuronal nicotinic receptors, important new players in brain function. *Eur J Pharmacol.* 393: 3-10, 2000.

Commons KG, Connolley KR, Valentino RJ. A neurochemically distinct dorsal raphe-limbic circuit with a potential role in affective disorders. *Neuropsychopharmacology* 28: 206–215, 2003.

Conti R, Tan YP, Llano I. Action potential-evoked and ryanodine-sensitive spontaneous Ca^{2+} transients at the presynaptic terminal of a developing CNS inhibitory synapse. *J Neurosci* 24: 6946-6957, 2004.

Cook EH, Leventhal BL. The serotonin system in autism. *Curr Opin Pediatr.* 8: 348-354, 1996.

Cornea-Hebert V, Riad M, Wu C, Singh S.K, Descarries L. Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT_{2A} receptor in the central nervous system of adult rat. *J. Comp. Neurol.* 409: 187–209, 1999.

Corrigall WA, Coen KM, Adamson KL, Chow BL, Zhang J. Response of nicotine self-administration in the rat to manipulations of mu-opioid and gamma-aminobutyric acid receptors in the ventral tegmental area. *Psychopharmacology* 149: 107-114, 2000.

Corringer PJ, Le Novère N, Changeux JP. Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 40: 431-458, 2000.

Corteen NL, Carter JA, Rudolph U, Belelli D, Lambert JJ, Swinny JD. Localisation and stress-induced plasticity of GABAA receptor subunits within the cellular networks of the mouse dorsal raphe nucleus. *Brain Struct Funct.* 29, 2014.

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

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

Cucchiario G, Chajjale N, Commons KG. The dorsal raphe nucleus as a site of action of the antinociceptive and behavioral effects of the alpha4 nicotinic receptor agonist epibatidine. *J Pharmacol Exp Ther.* 313: 389-394, 2005.

Dahlström A, Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand* 232: 1–55, 1964.

Dajas-Bailador F, Wonnacott S. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci.* 25: 317-324, 2004.

Dajas-Bailador FA, Mogg AJ, Wonnacott S. Intracellular Ca²⁺ signals evoked by stimulation of nicotinic acetylcholine receptors in SH-SY5Y cells: contribution of voltage-operated Ca²⁺ channels and Ca²⁺ stores. *J Neurochem* 81: 606-614, 2002.

Dani JA, Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47: 699-729, 2007.

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

Dayan P, Huys QJ. Serotonin in affective control. *Annu Rev Neurosci* 2: 95-126, 2009.

Deakin JF, Graeff FG. 5-HT and mechanisms of defence. *J Psychopharmacol* 5(4): 305-315, 1991.

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

Díaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T, Resnick O, Morgane PJ. Nucleus raphe dorsalis: a morphometric Golgi study in rats of three age groups. *Brain Res* 207: 1-16, 1981.

Dickinson JA, Hanrott KE, Mok MH, Kew JN, Wonnacott S. Differential coupling of $\alpha 7$ and non- $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors to calcium-induced calcium release and voltage-operated calcium channels in PC12 cells. *J Neurochem* 100: 1089-1096, 2007.

Dickinson JA, Kew JN, Wonnacott S. Presynaptic alpha 7- and beta 2-containing nicotinic acetylcholine receptors modulate excitatory amino acid release from rat prefrontal cortex nerve terminals via distinct cellular mechanisms. *Mol Pharmacol* 74: 348-359, 2008.

Donaldson ZR, Piel DA, Santos TL, Richardson-Jones J, Leonardo ED, Beck SG, Champagne FA, Hen R. Developmental effects of serotonin 1A autoreceptors on anxiety and social behavior. *Neuropsychopharmacology* 39: 291-302, 2014.

Eddins D, Lyford LK, Lee JW, Desai SA, Rosenberg RL. Permeant but not impermeant divalent cations enhance activation of nondesensitizing alpha(7) nicotinic receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: 796-804, 2002.

Engberg G, Erhardt S, Sharp T, Hajos M. Nicotine inhibits firing activity of dorsal raphe 5-HT neurones in vivo. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 362: 41-45, 2000.

Erlander MG, Lovenberg TW, Baron BM, de Lecea L, Danielson PE, Racke M, Slone AL, Siegel BW, Foye PE, Cannon K, Burns JE, Sutcliffe JG. Two members of a distinct subfamily of 5-hydroxytryptamine receptors differentially expressed in rat brain. *Proc Natl Acad Sci.* 90: 3452-3456, 1993.

Finley JC, Maderdrut JL, Roger LJ, Petrusz P. The immunocytochemical localization of somatostatin-containing neurons in the rat central nervous system. *Neuroscience* 6: 2173-2792, 1981.

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

Frías-Domínguez C, Garduño J, Hernández S, Drucker-Colin R, Mihailescu S. Flattening plasma corticosterone levels increases the prevalence of serotonergic dorsal raphe neurons inhibitory responses to nicotine in adrenalectomised rats. *Brain Res Bull.* 98: 10-22, 2013.

Fucile S. Ca²⁺ permeability of nicotinic acetylcholine receptors *Cell Calcium* 35: 1-8, 2004.

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

Galindo-Charles L, Hernández-López S, Galarraga E, Tapia D, Bargas J, Garduño J, Frías-Domínguez C, Drucker-Colín R, Mihailescu S. Serotonergic dorsal raphe neurons possess functional postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors. *Synapse* 62: 601-615, 2008.

Galzi JL, Bertrand D, Devillers-Thiéry A, Revah F, Bertrand S, Changeux JP. Functional significance of aromatic amino acids from three peptide loops of the alpha 7 neuronal nicotinic receptor site investigated by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett.* 294: 198-202, 1991.

Gamrani H, Calas A, Belin MF, Aguera M, Pujol JF. High resolution radioautographic identification of [3H]GABA labeled neurons in the rat nucleus raphe dorsalis. *Neurosci Lett.* 15(1):43-8, 1979.

Gao B, Fritschy JM, Benke D, Mohler H. Neuron-specific expression of GABA_A-receptor subtypes: differential association of the alpha 1- and alpha 3-subunits with serotonergic and GABAergic neurons. *Neuroscience* 54: 881-892, 1993.

Garduño J, Galindo-Charles L, Jiménez-Rodríguez J, Galarraga E, Tapia D, Mihailescu S, Hernández López S. Presynaptic $\alpha 4\beta 2$ nicotine acetylcholine receptors increase glutamate release and serotonin neuron excitability in the dorsal raphe nucleus. *J Neurosci* 32: 15148-15157, 2012.

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

Gérard C, Martres MP, Lefèvre K, Miquel MC, Vergé D, Lanfumey L, Doucet E, Hamon M, el Mestikawy S. Immuno-localization of serotonin 5-HT₆ receptor-like material in the rat central nervous system. *Brain Res*. 746: 207-219, 1997.

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

Giniatullin R, Nistri A, Yakel JL. Desensitization of nicotinic ACh receptors: shaping cholinergic signaling. *Trends Neurosci*. 28: 371-378, 2005.

Gocho Y, Sakai A, Yanagawa, Y. Electrophysiological and pharmacological properties of GABAergic cells in the dorsal raphe nucleus. *J Physiol Sci* 63: 147-154, 2012.

Gotti C, Clementi F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol*. 74: 363-396, 2004.

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

Guzmán-Marín R, Alam MN, Mihailescu S, Szymusiak R, McGinty D, Drucker-Colín R. Subcutaneous administration of nicotine changes dorsal raphe serotonergic neurons discharge rate during REM sleep. *Brain Res*. 888: 321-325, 2001.

Haider S, Khaliq S, Ahmed SP, Haleem DJ. Long-term tryptophan administration enhances cognitive performance and increases 5HT metabolism in the hippocampus of female rats. *Amino Acids* 31(4): 421-425, 2006.

Halaris AE, Jones BE, Moore RY. Axonal transport in serotonin neurons of the midbrain raphe. *Brain Res.* 107: 555-574, 1976.

Halberstadt AL, Balaban CD. Serotonergic and nonserotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus send collateralized projections to both the vestibular nuclei and the central amygdaloid nucleus. *Neuroscience.* 140: 1067-1077, 2006.

Hale MW, Lowry CA. Functional topography of midbrain and pontine serotonergic systems: implications for synaptic regulation of serotonergic circuits. *Psychopharmacology* 213: 243-264, 2011.

Hale MW, Dady KF, Evans AK, Lowry CA. Evidence for in vivo thermosensitivity of serotonergic neurons in the rat dorsal raphe nucleus and raphe pallidus nucleus implicated in thermoregulatory cooling. *Exp Neurol.* 227(2): 264-278, 2011.

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

Henningfield JE, Stapleton JM, Benowitz NL, Grayson RF, London ED. Higher levels of nicotine in arterial than in venous blood after cigarette smoking. *Drug Alcohol Depend* 33: 23-29, 1993.

Hilaire G, Voituron N, Menuet C, Ichiyama RM, Subramanian HH, Dutschmann M. The role of serotonin in respiratory function and dysfunction. *Respir Physiol Neurobiol.* 174: 76-88, 2010.

Higgins GA, Kilpatrick GJ. 5-HT₃ receptor antagonists. *Expert Opin Investig Drugs.* 8: 2183-2188, 1999.

Hökfelt T, Ljungdahl A, Steinbusch H, Verhofstad A, Nilsson G, Brodin E, Pernow B, Goldstein M. Immunohistochemical evidence of substance P-like immunoreactivity in some 5-hydroxytryptamine-containing neurons in the rat central nervous system. *Neuroscience* 3: 517-538, 1978.

Hunt S, Schmidt J. Some observations on the binding patterns of alphanungarotoxin in the central nervous system of the rat. *Brain Research* 157: 213-232, 1978.

Hunter BE, de Fiebre CM, Papke RL, Kem WR, Meyer EM. A novel nicotinic agonist facilitates induction of long-term potentiation in the rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 168: 130-134, 1994.

Hurst RS, Hajós M, Raggenbass M, Wall TM, Higdon NR, Lawson JA, Rutherford-Root KL, Berkenpas MB, Hoffmann WE, Piotrowski DW, Groppi VE, Allaman G, Ogier R, Bertrand S, Bertrand D, Arneric SP. A novel positive allosteric modulator of the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor: in vitro and in vivo characterization. *J Neurosci* 25: 4396-4405, 2005.

Ikram H, Mushtaq F, Haleem DJ. Dose-dependent effects of tryptophan on learning and memory. *Pak J Pharm Sci.* 27(5): 1131-1135, 2014.

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

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

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

Jones BE, Moore RY Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. II. Autoradiographic study. *Brain Res* 127: 25–53, 1977.

Jürgensen S, Ferreira ST. Nicotinic receptors, amyloid-beta, and synaptic failure in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 40: 221-229, 2010.

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

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

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

Kaneko, T., Akiyama, H., Nagatsu, I., Mizuno, N. Immunohistochemical demonstration of glutaminase in catecholaminergic and serotonergic neurons of rat brain. *Brain Res.* 507, 151–154, 1990.

Kanno T, Yaguchi T, Yamamoto S, Yamamoto H, Fujikawa H, Nagata T, Tanaka A, Nishizaki T. 8-[2-(2-pentyl-cyclopropylmethyl)-cyclopropyl]-octanoic acid stimulates GABA release from interneurons projecting to CA1 pyramidal neurons in

the rat hippocampus via pre-synaptic alpha7 acetylcholine receptors. *J Neurochem* 95: 695-702, 2005.

Kirby LG1, Pernar L, Valentino RJ, Beck SG. Distinguishing characteristics of serotonin and non-serotonin-containing cells in the dorsal raphe nucleus: electrophysiological and immunohistochemical studies. *Neuroscience*. 116: 669-683, 2003.

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

Köhler C, Chan-Palay V, Steinbusch H. The distribution and origin of serotonin-containing fibers in the septal area: a combined immunohistochemical and fluorescent retrograde tracing study in the rat. *J Comp Neurol*. 20; 209: 91-111, 1982.

Köhler C, Steinbusch H. Identification of serotonin and non-serotonin-containing neurons of the mid-brain raphe projecting to the entorhinal area and the hippocampal formation. A combined immunohistochemical and fluorescent retrograde tracing study in the rat brain. *Neuroscience*. 7: 951-975, 1982.

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

Krieger DT. Brain peptides: what, where, and why? *Science*. 2; 222: 975-985, 1983.

Lakoski JM, Aghajanian GK. Effects of histamine, H1- and H2-receptor antagonists on the activity of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *J Pharmacol Exp Ther*. 227(2): 517-523, 1983.

Lee HS, Kim MA, Valentino RJ, Waterhouse BD. Glutamatergic afferent projections to the dorsal raphe nucleus of the rat. *Brain Res*.14; 963(1-2): 57-71, 2003.

Léna C, Changeux JP, Mulle C. Evidence for "preterminal" nicotinic receptors on GABAergic axons in the rat interpeduncular nucleus. *J Neurosci*. 13: 2680-2688, 1993.

Lemos JC, Pan YZ, Ma X, Lamy C, Akanwa AC, Beck SG. Selective 5-HT receptor inhibition of glutamatergic and GABAergic synaptic activity in the rat dorsal and median raphe. *Eur J Neurosci* 24(12): 3415-3430, 2006.

Lesch KP, Waider J. Serotonin in the modulation of neural plasticity and networks: implications for neurodevelopmental disorders. *Neuron*. 4; 76(1): 175-191, 2012.

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

Li YQ, Li H, Kaneko T, Mizuno N. Morphological features and electrophysiological properties of serotonergic and nonserotonergic projection neurons in the dorsal raphe nucleus. An intracellular recording and labeling study in rat brain slices. *Brain Res* 900:110–118, 2001.

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

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

Llano I, González J, Caputo C, Lai FA, Blayney LM, Tan YP, Marty A. Presynaptic calcium stores underlie large-amplitude miniature IPSCs and spontaneous calcium transients. *Nat Neurosci* 3: 1256-1265, 2000.

Lovick TA. The medullary raphe nuclei: a system for integration and gain control in autonomic and somatomotor responsiveness? *Exp Physiol*. 82: 31-41, 1997.

Lowry CA. Functional Subsets of Serotonergic Neurons: Implications for Control of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. *Journal of Neuroendocrinology* 14: 911–923, 2002.

Lukas RJ, Bencherif M. Heterogeneity and regulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Int Rev Neurobiol*. 34: 25-131, 1992.

MacDermott AB, Role LW, Siegelbaum SA. Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release. *Annu Rev Neurosci*. 22:443-85, 1999.

Maggi L, Sher E, Cherubini E. Regulation of GABA release by nicotinic acetylcholine receptors in the neonatal rat hippocampus. *J Physiol* 536: 89–100, 2001.

Mantyh PW, Hunt SP, Maggio JE. Substance P receptors: localization by light microscopic autoradiography in rat brain using [3H]SP as the radioligand. *Brain Res*. 30; 307: 147-165, 1984.

Marinelli S, Schnell SA, Hack SP, Christie MJ, Wessendorf MW, Vaughan CW. Serotonergic and nonserotonergic dorsal raphe neurons are pharmacologically and electrophysiologically heterogeneous. *J Neurophysiol* 92(6): 3532-3537, 2004.

Martín-Cora FJ, Pazos A. Autoradiographic distribution of 5-HT₇ receptors in the human brain using [3H]mesulergine: comparison to other mammalian species. *Br J Pharmacol.* 141(1): 92-104, 2004.

Marubio LM, del Mar Arroyo-Jimenez, M, Cordero-Erausquin, M, Léna C. Le Novère N, de Kerchoved'Exaerde A, Huchet M, Damaj MI, Changeux JP. Reduced antinociception in mice lacking neuronal nicotinic receptor subunits. *Nature* 398, 805–810, 1999.

McBain CJ, Fisahn A. Interneurons unbound. *Nat Rev Neurosci* 2: 11-23, 2001.

McClure-Begley TD, King NM, Collins AC, Stitzel JA, Wehner JM, Butt CM. Acetylcholine-stimulated [3H]GABA release from mouse brain synaptosomes is modulated by alpha4beta2 and alpha4alpha5beta2 nicotinic receptor subtypes. *Mol Pharmacol* 75: 918–926, 2009.

McGehee DS, Heath MJ, Gelber S, Devay P, Role LW. Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors. *Science.* 22; 269(5231): 1692-1696, 1995.

McGehee DS, Role LW. Presynaptic ionotropic receptors. *Curr Opin Neurobiol.* 6(3):342-9, 1996.

McNaughton N, Gray JA. Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *J Affect Disord.* 61(3): 161-176, 2000.

Meléndez-Victoria TA Caracterización electrofisiológica de las neuronas GABAérgicas del núcleo dorsal rafé en rata. Tesis profesional de licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.

Meneses A. 5-HT systems: emergent targets for memory formation and memory alterations. *Rev Neurosci.* 24: 629-64, 2013.

Michelsen KA, Prickaerts J, Steinbusch HW. The dorsal raphe nucleus and serotonin: implications for neuroplasticity linked to major depression and Alzheimer's disease. *Prog Brain Res* 172:233-264, 2008.

Mignon L, Wolf WA. Postsynaptic 5-HT(1A) receptors mediate an increase in locomotor activity in the monoamine-depleted rat, *Psychopharmacology (Berlin)* 163: 85– 94, 2002.

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

Mihailescu S, Guzmán-Marín R, Drucker-Colín R. Nicotine stimulation of dorsal raphe neurons: effects on laterodorsal and pedunculopontine neurons. *Eur Neuropsychopharmacol* 11: 359-366, 2001.

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

Miner LL, Marks MJ, Collins AC. Classical genetic analysis of nicotine-induced seizures and nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 231(3): 545-54, 1984.

Morales M y Bloom FE. The 5-HT₃ receptor is present in different subpopulations of GABAergic neurons in the rat telencephalon. *J. Neurosci.* 17: 3157–3167, 1997.

Morley BJ, Kemp GE, Salvaterra P. alpha-Bungarotoxin binding sites in the CNS. *Life Sci.* 24(10): 859-872, 1979.

Nagai T, McGeer PL, McGeer EG. Distribution of GABA-T-intensive neurons in the rat forebrain and midbrain. *J Comp Neurol.* 218(2): 220-238, 1983.

Nakahama H, Shima K, Yamamoto M, Aya K. Regularity of the spontaneous discharge of neurons in the nucleus raphe dorsalis of the cat. *Neurosci Lett.* 23(2):161-165, 1981.

Nakamura M, Jang IS. Presynaptic nicotinic acetylcholine receptors enhance GABAergic synaptic transmission in rat periaqueductal gray neurons. *Eur J Pharmacol* 640: 178-184, 2010.

Nanopoulos D, Belin MF, Maitre M, Vincendon G, Pujol JF. Nanopoulos D, Belin MF, Maitre M, Vincendon G, Pujol JF. Immunocytochemical evidence for the existence of GABAergic neurons in the nucleus raphe dorsalis. Possible existence of neurons containing serotonin and GABA. *Brain Res.* 28; 232(2):375-89, 1982.

Nelson ME, Kuryatov A, Choi CH, Zhou Y, Lindstrom J. Alternate stoichiometries of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 63(2):332-41, 2003.

Ng HJ, Whitemore ER, Tran MB, Hogenkamp DJ, Broide RS, Johnstone TB, Zheng L, Stevens KE, Gee KW. Ng HJ, Whitemore ER, Tran MB, Hogenkamp DJ, Broide RS, Johnstone TB, Zheng L, Stevens KE, Gee KW. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 8;104(19):8059-64, 2007.

Nitz D, Siegel J. GABA release in the dorsal raphe nucleus: role in the control of REM sleep. *Am J Physiol.* 273: 451-455, 1997.

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

Papke RL, Meyer E, Nutter T, Uteshev VV. alpha7 receptor-selective agonists and modes of alpha7 receptor activation. *Eur J Pharmacol.* 30; 393(1-3):179-95, 2000.

Paris JM, Lorens SA. Intra-median raphe infusions of muscimol and the substance P analogue DiMe-C7 produce hyperactivity: role of serotonin neurons. *Behav Brain Res;* 26: 139–151, 1987.

Passamonti L, Crockett MJ, Apergis-Schoute AM, Clark L, Rowe JB, Calder AJ, Robbins TW. Effects of acute tryptophan depletion on prefrontal-amygdala connectivity while viewing facial signals of aggression. *Biol Psychiatry.* 1; 71(1):36-43, 2012.

Paterson D, Nordberg A. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog Neurobiol.* 61(1): 75-111, 2000.

Pau, K.Y., Yu, J.H., Lee, C.J., Spies, H.G. Topographic localization of neuropeptide Y mRNA in the monkey brainstem. *Regul. Pept.* 75–76, 145–153, 1998.

Paxinos G y Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* New York. Academic Press, 1998.

Peng YY. Ryanodine-sensitive component of calcium transients evoked by nerve firing at presynaptic nerve-terminals. *J. Neurosci,* 16: 6703–6712, 1996.

Perry E, Martin-Ruiz C, Lee M, Griffiths M, Johnson M, Piggott M, Haroutunian V, Buxbaum JD, Näslund J, Davis K, Gotti C, Clementi F, Tzartos S, Cohen O, Soreq H, Jaros E, Perry R, Ballard C, McKeith I, Court J. Nicotinic receptor subtypes in human brain ageing, Alzheimer and Lewy body diseases. *European Journal of Pharmacology* 393, 215–222, 2000.

Petrov T, Krukoff TL, Jhamandas JH. The hypothalamic paraventricular and lateral parabrachial nuclei receive collaterals from raphe nucleus neurons: a combined double retrograde and immunocytochemical study. *J Comp Neurol.* 1;318(1):18-26. 1992.

Petrov T, Krukoff TL, Jhamandas JH. Chemically defined collateral projections from the pons to the central nucleus of the amygdala and hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. *Cell Tissue Res.* 277(2):289-95, 1994.

Peyron C, Luppi PH, Kitahama K, Fort P, Hermann DM, Jouvet M. Origin of the dopaminergic innervation of the rat dorsal raphe nucleus. *Neuroreport*. 15; 6(18):2527-31, 1995.

Peyron C, Luppi PH, Fort P, Rampon C, Jouvet M. Lower brainstem catecholamine afferents to the rat dorsal raphe nucleus. *J Comp Neurol*. Jan 15; 364(3):402-413, 1996.

Picciotto MR, Addy NA, Mineur YS, Brunzell DH. It is not "either/or": activation and desensitization of nicotinic acetylcholine receptors both contribute to behaviors related to nicotine addiction and mood. *Prog Neurobiol*. 84(4):329-42, 2008.

Picciotto MR, Zoli M, Rimondini R, Léna C, Marubio LM, Pich EM, Fuxe K, Changeux JP. Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature*. 8; 391(6663):173-7, 1998.

Portas CM, Bjorvatn B, Ursin R. Serotonin and the sleep/wake cycle: special emphasis on microdialysis studies. *Prog Neurobiol*. 60(1):13-35, 2000.

Pugh PC, Berg DK. Neuronal acetylcholine receptors that bind alpha-bungarotoxin mediate neurite retraction in a calcium-dependent manner. *J Neurosci*. 14(2):889-96, 1994.

Pytliak M. Vargova V. Mechirova V. Felsoci M. Serotonin receptors—from molecular biology to clinical applications. *Physiol. Res*. 60, 15–25, 2011.

Radcliffe KA, Fisher JL, Gray R, Dani JA. Nicotinic modulation of glutamate and GABA synaptic transmission of hippocampal neurons. *Ann N Y Acad Sci* 868: 591-610, 1999.

Ramboz S, Oosting R, Amara DA, Kung HF, Blier P, Mendelsohn M, Mann JJ, Brunner D, Hen R. Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 24; 95(24): 14476-14481, 1998.

Rampon C, Peyron C, Gervasoni D, Pow DV, Luppi PH, Fort P. Origins of the glycinergic inputs to the rat locus coeruleus and dorsal raphe nuclei: a study combining retrograde tracing with glycine immunohistochemistry. *Eur J Neurosci*. Mar;11(3):1058-66, 1999.

Renshaw GM. [125I]-alpha-bungarotoxin binding co-varies with motoneurone density during apoptosis. *Neuroreport*. 3;5(15):1949-52, 1994.

Riad M, Garcia S, Watkins KC, Jodoin N, Doucet E, Langlois X, el Mestikawy S, Hamon M, Descarries L. Somatodendritic localization of 5-HT1A and preterminal

axonal localization of 5-HT_{1B} serotonin receptors in adult rat brain. *J Comp Neurol.* 7; 417(2):181-94, 2000.

Ribeiro EB, Bettiker RL, Bogdanov M, Wurtman RJ. Effects of systemic nicotine on serotonin release in rat brain. *Brain Research* 621: 311-318, 1993.

Rodríguez JJ, Noristani HN, Verkhatsky A. The serotonergic system in ageing and Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 99, 15–41, 2012.

Roberts C, Thomas DR, Bate ST, Kew JN. GABAergic modulation of 5-HT₇ receptor-mediated effects on 5-HT efflux in the guinea-pig dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology.* 46(7):935-41, 2004.

Rood BD, Calizo LH, Piel D, Spangler ZP, Campbell K, Beck SG. Dorsal raphe serotonin neurons in mice: immature hyperexcitability transitions to adult state during first three postnatal weeks suggesting sensitive period for environmental perturbation. *J Neurosci.* 2; 34(14): 4809-4821, 2014.

Sakai K, Salvert D, Touret M, Jouvet M. Afferent connections of the nucleus raphe dorsalis in the cat as visualized by the horseradish peroxidase technique. *Brain Res.* 25;137(1):11-35, 1977.

Salín-Pascual RJ, Drucker-Colín R. A novel effect of nicotine on mood and sleep in major depression. *Neuroreport* 9: 57-60, 1998.

Saphier D, Farrar GE, Welch JE. Differential inhibition of stress-induced adrenocortical responses by 5-HT_{1A} agonists and by 5-HT₂ and 5-HT₃ antagonists. *Psychoneuroendocrinology*, 20: 239–257, 1995.

Segal M, Landis S. Afferents to the hippocampus of the rat studied with the method of retrograde transport of horseradish peroxidase. *Brain Res.* 20; 78(1):1-15, 1974.

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

Sena LM, Bueno C, Pobbe RL, Andrade TG, Zangrossi H Jr, Viana MB. The dorsal raphe nucleus exerts opposed control on generalized anxiety and panic-related defensive responses in rats. *Behav Brain Res.* 16; 142(1-2): 125-33, 2003.

Serrats, J Artigas F, Mengod G, Cortés R. GABA_B receptor mRNA in the raphe nuclei: co-expression with serotonin transporter and glutamic acid decarboxylase J of *Neurochem* 84: 743-752, 2003.

Serrats J, Mengod G, Cortés R. Expression of serotonin 5-HT_{2C} receptors in GABAergic cells of the anterior raphe nuclei. *J Chem Neuroanat.* 29(2): 83-91, 2005.

Sharma G, Grybko M, Vijayaraghavan S. Action potential-independent and nicotinic receptor-mediated concerted release of multiple quanta at hippocampal CA3-mossy fiber synapses. *J Neurosci* 28: 2563-2575, 2008.

Sharma G, Vijayaraghavan S. Modulation of presynaptic store calcium induces release of glutamate and postsynaptic firing. *Neuron* 38: 929-939, 2003.

Shearman E, Fallon S, Sershen H, Lajtha A. Nicotine-induced monoamine neurotransmitter changes in the brain of young rats. *Brain Res Bull* 76: 626-639, 2008.

Shen JX, Yakel JL. Functional $\alpha 7$ Nicotinic ACh Receptors on astrocytes in Rat Hippocampal CA1 Slices. *J Mol Neurosci* 48: 14–21, 2012.

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

Shikanai H, Yoshida T, Konno K, Yamasaki M, Izumi T, Ohmura Y, Watanabe M, Yoshioka M. Distinct neurochemical and functional properties of GAD67-containing 5-HT neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *J Neurosci* 10; 32(41): 14415-14426, 2012.

Sim LJ, Joseph SA. Dorsal raphe nucleus efferents: termination in peptidergic fields. *Peptides*, 14: 75–83, 1993.

Singer S, Rossi S, Verzosa S, Hashim A, Lonow R, Cooper T, Sershen H, Lajtha A. Nicotine-induced changes in neurotransmitter levels in brain areas associated with cognitive function. *Neurochem Res* 29: 1779-1792, 2004.

Sirota P, Mosheva T, Shabtay H, Giladi N, Korczyn AD. Use of the selective serotonin 3 receptor antagonist ondansetron in the treatment of neuroleptic-induced tardive dyskinesia. *Am J Psychiatry.* 157(2):287-9, 2000.

Skofitsch G, Jacobowitz DM. Immunohistochemical mapping of galanin-like neurons in the rat central nervous system. *Peptides*.6(3): 509-546, 1985.

Sotelo C, Cholley B, El Mestikawy S, Gozlan H, Hamon M. Direct Immunohistochemical Evidence of the Existence of 5-HT_{1A} Autoreceptors on

Serotonergic Neurons in the Midbrain Raphe Nuclei. *Eur J Neurosci.* 2(12):1144-1154, 1990.

Soiza-Reilly M, Anderson WB, Vaughan CW, Commons KG. Presynaptic gating of excitation in the dorsal raphe nucleus by GABA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 15800-15805, 2013.

Sprouse JS, Aghajanian GK. Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists. *Synapse* 1:3– 9, 1987.

Steinbusch HW. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience* 6(4): 557-618, 1981.

Steinlein OK, Bertrand D. Nicotinic receptor channelopathies and epilepsy. *Pflugers Arch.* 460(2):495-503, 2010.

Stern WC, Johnson A, Bronzino JD, Morgane PJ. Neuropharmacology of the afferent projections from the lateral habenula and substantia nigra to the anterior raphe in the rat. *Neuropharmacology.* Oct;20(10):979-89, 1981.

Tao R, Auerbach SB. Opioid receptor subtypes differentially modulate serotonin efflux in the rat central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther.* 303(2):549-56, 2002.

Tapper AR, McKinney SL, Nashmi R, Schwarz J, Deshpande P, Labarca C, Whiteaker P, Marks MJ, Collins AC, Lester HA. Nicotine activation of alpha₄* receptors: sufficient for reward, tolerance, and sensitization. *Science.* 5;306(5698):1029-32, 2004.

Uhl, G.R., Goodman, R.R., Kuhar, M.J., Childers, S.R., Snyder, S.H., Immunohistochemical mapping of enkephalin containing cell bodies, fibers and nerve terminals in the brain stem of the rat. *Brain Res.* 166, 75–94, 1979.

Ullian EM, Sargent, PB. Pronounced cellular diversity and extrasynaptic location of nicotinic acetylcholine receptor subunit immunoreactivities in the chicken pretectum. *Journal of Neuroscience* 15, 7012–7023, 1995.

Unwin N. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J Mol Biol.* 4; 346(4):967-89, 2005.

Upton N, Chuang TT, Hunter AJ, Virley DJ. 5-HT₆ receptor antagonists as novel cognitive enhancing agents for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics.* 5(3):458-69, 2008.

- Van Bockstaele EJ, Biswas A, Pickel VM. Topography of serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus that send axon collaterals to the rat prefrontal cortex and nucleus accumbens. *Brain Res.* Oct 8; 624(1-2):188-98, 1993.
- Vanderhaeghen JJ, Lotstra F, De Mey J, Gilles C. Immunohistochemical localization of cholecystokinin- and gastrin-like peptides in the brain and hypophysis of the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77(2): 1190-1194, 1980.
- van der Kooy D, Hattori T. Dorsal raphe cells with collateral projections to the caudate-putamen and substantia nigra: a fluorescent retrograde double labeling study in the rat. *Brain Res.* 17; 186(1):1-7, 1980.
- Vandermaelen CP, Aghajanian GK. Electrophysiological and pharmacological characterization of serotonergic dorsal raphe neurons recorded extracellularly and intracellularly in rat brain slices. *Brain Res* 289: 109-119, 1983.
- Varga V, Székely AD, Csillag A, Sharp T, Hajós M. Evidence for a role of GABA interneurons in the cortical modulation of midbrain 5-hydroxytryptamine neurones. *Neuroscience.* 106(4):783-92, 2001.
- Vertes RP. A PHA-L analysis of ascending projections of the dorsal raphe nucleus in the rat. *J Comp Neurol.* 22; 313(4):643-68, 1991.
- Vizi ES, Lendvai B. Modulatory role of presynaptic nicotinic receptors in synaptic and nonsynaptic chemical communication in the central nervous system. *Brain Res Rev* 30: 219-235, 1999.
- Waeber C, Sebben M, Nieoullon A, Bockaert J, Dumuis A. Regional distribution and ontogeny of 5-HT₄ binding sites in rodent brain. *Neuropharmacology.* 33(3-4):527-41, 1994.
- Wang QP, Ochiai H, Nakai Y. GABAergic innervation of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the rat studied by electron microscopy double immunostaining. *Brain Res Bull.* 29(6): 943-948, 1992.
- Welsh JH, Moorhead M. The quantitative distribution of 5-hydroxytryptamine in the invertebrates, especially in their nervous systems. *J Neurochem.* 6:146-169, 1960.
- Wesnes K, Warburton DM. The effects of cigarette smoking and nicotine tablets on human attention. In: Thornton RE, editor. *Smoking behaviour: physiological and psychological influences.* London: Livingstone, 1978. pp. 131– 47.
- West R, Hajek P, McNeill A. Effect of buspirone on cigarette withdrawal symptoms and short-term abstinence rates in a smokers clinic. *Psychopharmacology;* 104:91– 6, 1991.

Westrum LE, Gray EG. New observations on the substructure of the active zone of brain synapses and motor endplates. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 229: 29–38, 1986.

Williams DK, Wang J, Papke RL. Investigation of the molecular mechanism of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor positive allosteric modulator PNU-120596 provides evidence for two distinct desensitized states. *Mol Pharmacol* 80: 1013-1032, 2011.

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

Wolf NJ, Butcher LL. Cholinergic systems in the rat brain: IV. Descending projections of the pontomesencephalic tegmentum. *Brain Res Bull.* 23(6):519-40, 1989.

Wu XS, Wu LG. Protein kinase c increases the apparent affinity of the release machinery to Ca^{2+} by enhancing the release machinery downstream of the Ca^{2+} sensor. *J Neurosci* 21: 7928-7936, 2001.

Xu ZQ, Zhang X, Pieribone VA, Grillner S, Hökfelt T. Galanin-5-hydroxytryptamine interactions: electrophysiological, immunohistochemical and in situ hybridization studies on rat dorsal raphe neurons with a note on galanin R1 and R2 receptors. *Neuroscience.* 87(1):79-94. 1998.

Yang C, Brown RE. The cholinergic agonist carbachol increases the frequency of spontaneous GABAergic synaptic currents in Dorsal Raphe serotonergic neurons in the mouse. *Neuroscience* 258: 62-73, 2014.

Yang X, Criswell HE, Breese GR. Nicotine-Induced Inhibition in Medial Septum Involves Activation of Presynaptic Nicotinic Cholinergic Receptors on γ -Aminobutyric Acid-Containing Neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 276: 482-489, 1996.

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

Zhang X, Liu C, Miao H, Gong ZH, Nordberg A. Postnatal changes of nicotinic acetylcholine receptor alpha 2, alpha 3, alpha 4, alpha 7 and beta 2 subunits genes expression in rat brain. *Int J Dev Neurosci* 16: 507-518, 1998.

Zhu PJ, Chiappinelli VA. Nicotinic receptors mediate increased GABA release in brain through a tetrodotoxin-insensitive mechanism during prolonged exposure to nicotine. *Neuroscience* 115: 137-144, 2002.

Zwart R, Carbone AL, Moroni M, Bermudez I, Mogg AJ, Folly EA, Broad LM, Williams AC, Zhang D, Ding C, Heinz BA, Sher E. Sazetidine-A is a potent and selective agonist at native and recombinant alpha 4 beta 2 nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 73(6):1838-43, 2008.

Nicotine increases GABAergic input on rat dorsal raphe serotonergic neurons through $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor

F. Hernández-Vázquez, K. Chavarría, J. Garduño, S. Hernández-López, and S. P. Mihailescu

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

Submitted 21 March 2014; accepted in final form 12 September 2014

Hernández-Vázquez F, Chavarría K, Garduño J, Hernández-López S, Mihailescu SP. Nicotine increases GABAergic input on rat dorsal raphe serotonergic neurons through $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *J Neurophysiol* 112: 3154–3163, 2014. First published September 17, 2014; doi:10.1152/jn.00223.2014.—The dorsal raphe nucleus (DRN) contains large populations of serotonergic (5-HT) neurons. This nucleus receives GABAergic inhibitory afferents from many brain areas and from DRN interneurons. Both GABAergic and 5-HT DRN neurons express functional nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). Previous studies have demonstrated that nicotine increases 5-HT release and 5-HT DRN neuron discharge rate by stimulating postsynaptic nAChRs and by increasing glutamate and norepinephrine release inside DRN. However, the influence of nicotine on the GABAergic input to 5-HT DRN neurons was poorly investigated. Therefore, the aim of this work was to determine the effect of nicotine on GABAergic spontaneous inhibitory postsynaptic currents (sIPSCs) of 5-HT DRN neurons and the subtype of nAChR(s) involved in this response. Experiments were performed in coronal slices obtained from young Wistar rats. GABAergic sIPSCs were recorded from post hoc-identified 5-HT DRN neurons with the whole cell voltage patch-clamp technique. Administration of nicotine (1 μ M) increased sIPSC frequency in 72% of identified 5-HT DRN neurons. This effect was not reproduced by the $\alpha 4\beta 2$ nAChR agonist RJR-2403 and was not influenced by TTX (1 μ M). It was mimicked by the selective agonist for $\alpha 7$ nAChR, PNU-282987, and exacerbated by the positive allosteric modulator of the same receptor, PNU-120596. The nicotine-induced increase in sIPSC frequency was independent on voltage-gated calcium channels and dependent on Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release (CICR). These results demonstrate that nicotine increases the GABAergic input to most 5-HT DRN neurons, by activating $\alpha 7$ nAChRs and producing CICR in DRN GABAergic terminals.

nicotine; dorsal raphe nucleus; serotonergic neurons; GABA

THE DORSAL RAPHE NUCLEUS (DRN) is located in the brain stem and contains the largest population of serotonergic (5-HT) neurons in the brain (Dahlström and Fuxe 1964). This nucleus provides 5-HT innervation to several targets including the forebrain and limbic structures (see Michelsen et al. 2008 for review) and is involved in several behavioral functions such as sleep-wake states, feeding, nociception, neuroendocrine regulation, learning and memory, and stress-induced responses (Hale et al. 2012; Jacobs and Azmitia 1992; Meneses 2013). In addition, dysregulation of this nucleus has been associated with psychiatric disorders such as depression and anxiety (Lowry et al. 2008; Sharp and Cowen 2011). Clinical studies have demonstrated that transdermal nicotine improves mood in patients

with major depression (Salín-Pascual and Drucker-Colín 1998) and reduces anxiety in both smokers and nonsmokers (Gilbert 1979; Kassel and Unrod 2000). Likewise, in rodents, nicotine reduces stress and anxiety induced by restraint behavior (Hsu et al. 2007).

Experimental studies have shown that nicotine increases the firing rate of the majority of DRN neurons (Li et al. 1998; Mihailescu et al. 2002) as well as 5-HT release in several brain areas such as prefrontal cortex (Ribeiro et al. 1993) and DRN itself (Mihailescu et al. 1998). Immunocytochemical studies have demonstrated the presence of $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subtypes in 5-HT DRN neurons (Bitner et al. 2000; Commons 2008). Other studies have indicated that nicotine increases the firing activity of 5-HT neurons through direct stimulation of their somatodendritic $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nAChRs (Galindo-Charles et al. 2008) and through presynaptic release of glutamate (Garduño et al. 2012) and norepinephrine (Li et al. 1998).

GABAergic inhibitory afferents to DRN originate in several brain areas such as lateral and posterior hypothalamus, lateral preoptic area, ventral pontine periaqueductal gray, substantia nigra, and ventral tegmental area (VTA), as well as interneurons from the DRN itself (Gervasoni et al. 2000). Serotonergic neurons are tonically inhibited by GABA through both GABA_A and GABA_B receptors (Bowery et al. 1987; Gervasoni et al. 2000). Supporting this idea, the administration of GABA_A antagonists, such as picrotoxin or bicuculline, increases action potential frequency in 5-HT DRN neurons (Gallager 1978; Gallager and Aghajanian 1976). It was suggested that the GABAergic input to DRN neurons increases during rapid eye movement (REM) sleep (Nitz and Siegel 1997), which explains the low activity of 5-HT DRN neurons registered during this period. However, there are few electrophysiological studies concerning the influence of nicotine on the GABAergic input to 5-HT DRN neurons, as well as the nicotinic receptor involved in this response. This is an interesting topic considering the above-mentioned stimulatory effect of nicotine on the firing rate of 5-HT DRN neurons. Thus the aim of this work was to determine the effect of nicotine on the GABAergic input to 5-HT DRN neurons and to identify the nAChR subtype involved in this effect.

METHODS

Slice preparation. All animal experiments were carried out in accordance with the National Institutes of Health *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* and were approved by the Institutional Animal Care Committee of the Universidad Nacional Autónoma de México. Experiments were performed in young (postnatal day 18–21) Wistar rats that were deeply anesthetized with isoflurane and then decapitated. Their brains were quickly removed and placed

Address for reprint requests and other correspondence: S. P. Mihailescu, Departamento de Fisiología, Edificio de Investigación A, 5° piso, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Colonia Copilco-Coyoacan, CP 04510, Mexico City, Mexico (e-mail: stefm@unam.mx).

into ice-cold (4°C) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) consisting of (in mM) 125 NaCl, 3 KCl, 25 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 1 MgCl₂, 1.2 CaCl₂, and 25 glucose, 300 mosM, pH = 7.3 by bubbling with 95% O₂-5% CO₂. Coronal slices (350 μm thick) containing the DRN were obtained with a Vibratome 1500 (Vibratome, St. Louis, MO) and allowed to rest in carbogen-bubbled ACSF at room temperature for at least 1 h before recording.

Electrophysiological recordings. Individual slices were transferred into a custom-made Plexiglas recording chamber and perfused with ACSF at a rate of 4–5 ml/min at 33°C maintained by an in-line solution heater (TC-324; Warner Instruments). DRN neurons were visualized with a videomicroscopy system (Olympus BX51WI) fitted with a ×60 water-immersion objective, differential interference contrast and infrared filter. The image from the microscope was enhanced with a CCD camera and displayed on a monitor. 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). Signals were digitized by a Digidata 1320 series analog-to-digital converter at 10 kHz and stored online with pCLAMP8 software (Molecular Devices). Only one cell was recorded per brain slice. Micropipettes used for recordings were pulled from borosilicate glass tubes (WPI, Sarasota, FL) with a Flaming-Brown puller (Sutter Instrument, Novato, CA) (resistance 4–7 MΩ). The internal solution consisted of (in mM) 70 K-gluconate, 70 KCl, 5 NaCl, 1 MgCl₂, 0.02 EGTA, 10 HEPES, 2 Mg₂ATP, and 0.5 Na₂GTP, with biocytin 0.1%, pH = 7.3 with Trizma base, 280–300 mosM. Spontaneous inhibitory postsynaptic currents (sIPSCs) were recorded at a holding potential of –70 mV, and 6-cyano-2,3-dihydroxy-7-nitroquinoxaline (CNQX; 10 μM) and DL-2-amino-5-phosphonvaleric acid (APV; 50 μM) were used to block glutamatergic currents. Miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSCs) were equally recorded according to the same protocol, but with tetrodotoxin (TTX; 1 μM) also added to the perfusion solution. Series resistance was monitored throughout the experiment; if it was unstable or exceeded four times the electrode resistance, the cell was discarded.

Drug administration. Several protocols of drug administration were used, as imposed by the purpose of the experiments. Recordings of at least 10 min were allowed for stabilization of sIPSC frequency, in which blockers of glutamate receptors (CNQX and APV) were present in the perfusion solution. Afterwards, bicuculline, nicotine, or nAChR agonists were added to the perfusion fluid and their effects were recorded during the administration (8–10 min) and during the period of washout (15 min or more). In the experiments using drugs susceptible to alter nicotine effects [nAChR antagonists, PNU-120596, TTX, blockers of calcium-induced calcium release (CICR) and of voltage-gated calcium channels (VGCCs)], one of these drugs was administered before nicotine and its effects on sIPSC frequency and amplitude were followed for at least 10 min. Nicotine was then added to the perfusion fluid for 10 min, and its effects on sIPSC frequency were recorded during the administration as well as 15 min after the washout of drugs.

Immunohistochemistry. Neurons were filled with biocytin present in the internal solution during recordings. To identify whether recorded cells were 5-HT, we used an anti-5-HT antibody. After electrophysiological recording, slices were fixed in 4% paraformaldehyde and 1% picric acid in 0.1 M PBS (pH 7.4) until staining. Slices were infiltrated with 30% sucrose and cut on a vibratome into 40-μm sections. Sections were incubated for 4–6 h in PBS solution containing 0.2 Triton X-100 and streptavidin conjugated to Cy3 (1 mg/ml; Zymed, South San Francisco, CA; diluted 1:100) 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 (ImmunoStar, Hudson, WI; 1:2,000). After rinsing in PBS, sections were reincubated for 2–4 h with secondary antibodies conjugated to fluorescein (Vector Laboratories, Burlingame, CA; diluted 1:100). The reacted sections were first examined with an appropriate set of filters on an epifluorescence-

equipped microscope. Afterwards, sections were mounted in an anti-quenching medium (Vectashield, Vector Laboratories) and examined under a confocal microscope (MRC 1024, Bio-Rad, Natford, UK) equipped with a krypton/argon laser. A two-line laser emitting at 550- and 500-nm wavelength was used for exciting Cy3 and fluorescein, respectively. Digitized images were transferred to a personal computer with image-capturing software (Confocal Assistant, T. C. Brelje).

Drugs. Drugs were dissolved in ACSF and administered by bath perfusion. The time required for obtaining equilibrated concentrations of the drugs in the recording chamber was ~3–4 min. TTX, APV, CNQX, (–)bicuculline methiodide, methyllycaconitine (MLA), dihydro-β-erythroidine hydrobromide (DHβE); *N*-(5-chloro-2,4-dimethoxyphenyl)-*N'*-(5-methyl-3-isoxazolyl)-urea (PNU-120596), 1,4-dihydro-2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-3,5-pyridinedicarboxylic acid ethyl (nitrendipine), and biocytin were purchased from Sigma-Aldrich RBI (St. Louis MO). Thapsigargin, ryanodine, (*E*)-*N*-methyl-4-(3-pyridinyl)-3-buten-1-amine oxalate (RJR-2403 oxalate), and *N*-(3*R*)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl-4-chlorobenzamide (PNU-282987) were purchased from Tocris Bioscience (Ellisville, MO). ω-Agatoxin-TK and ω-conotoxin-GVIA were purchased from Peptide Institute and Alomone Labs, respectively. All reagents were added from freshly prepared stock solution to the bath saline.

Data analysis and statistics. Data analysis was performed with Clampfit 8 software (Molecular Devices) and Mini Analysis software (Synaptosoft, Decatur, GA). The Mini Analysis software was used to detect sIPSCs and mIPSCs and to assess their frequency and amplitude. Initially, a noise analysis was conducted for each recorded cell, and detection thresholds were set to exceed noise values. The events were detected automatically and then visually inspected and confirmed. For each recorded cell, cumulative 10-s sIPSC frequency histograms were constructed and the average control frequency of sIPSCs during a period of 10 min was calculated. The average control values of sIPSC frequency obtained for individual cells were fairly heterogeneous. Therefore, the changes in sIPSC frequency produced by drug administration were expressed as a percentage of the control value. The normalized sIPSC frequency histograms obtained from individual cells of a given experimental group were averaged. The Wilcoxon signed-rank test and the Mann-Whitney test on ranks were used for statistical comparisons between samples. Cumulative fractions of amplitude and interevent intervals were compared by Kolmogorov-Smirnov test. *P* < 0.05 was taken as significant.

RESULTS

Identification of 5-HT DRN neurons used for recordings. A total of 83 cells located in the ventral part of the middle region of the DRN (bregma –7.80 to –8.00 mm), close to the midline, were obtained from 74 rats. The recorded cells were considered possibly serotonergic when presenting the electrophysiological characteristics established by Vandermaelen and Aghajanian (1983): a slow (4–10 Hz) firing rate upon application of depolarizing stimuli (Fig. 1A); long-lasting afterhyperpolarization (347 ± 22.7 ms, *n* = 83) and action potential (4.32 ± 0.163 ms, *n* = 83), and a discrete shoulder on the falling phase of the spike (Fig. 1A, inset). Figure 1B shows the firing frequency as a function of the intensity of injected current (I-F plot); note the low firing frequency (7.24 ± 0.33 Hz, *n* = 15) observed after application of the maximal depolarizing pulse (175 pA). To support the electrophysiological identification of 5-HT DRN neurons, immunohistochemical studies with anti-serotonin antibodies were performed post hoc (Fig. 1C). The recordings obtained from cells negative for 5-HT staining were discarded.

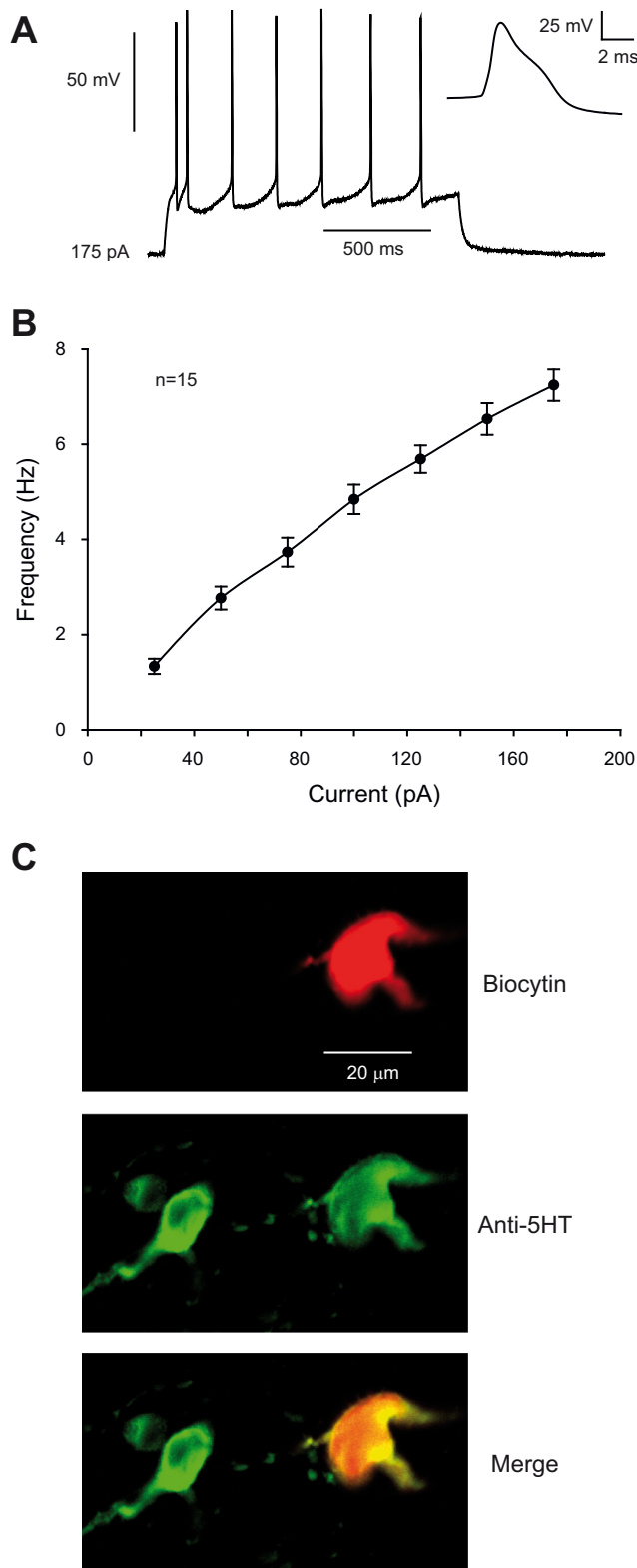


Fig. 1. Electrophysiological and immunohistochemical identification of a recorded serotonergic (5-HT) neuron in dorsal raphe nucleus (DRN). *A*: current traces in response to a 175-pA depolarizing step recorded from a 5-HT neuron. *Inset*, an expanded action potential from the same neuron. *B*: discharge frequency as a function of injected current obtained from 15 identified 5-HT neurons. *C*: microphotographs showing the same recorded cell after biocytin staining (*top*), 5-HT immunoreactivity (*middle*), and merge (*bottom*).

Spontaneous inhibitory postsynaptic currents recorded in 5-HT DRN neurons are GABAergic. sIPSCs were recorded in voltage-clamp mode, at a holding potential of -70 mV, with an internal solution with elevated chloride content (see METHODS) to enhance their resolution. Figure 2 shows representative recordings of sIPSCs without any drug (Fig. 2*A*, *top*), in the presence of glutamate receptor antagonists CNQX (10 μ M) and APV (50 μ M) (Fig. 2*A*, *middle*) and after bicuculline administration (Fig. 2*A*, *bottom*). Note that after addition of bicuculline (a selective GABA_A receptor antagonist), all sIPSCs disappeared (Fig. 2*B*). Five experiments of this kind were performed in order to demonstrate that GABA acting on GABA_A receptors of 5-HT DRN neurons produced the sIPSCs recorded in our experiments. The frequency and amplitude of sIPSCs were 0.77 ± 0.10 Hz and 29.29 ± 1.58 pA, respectively ($n = 83$), whereas mIPSC frequency was 0.47 ± 0.17 Hz and amplitude 28.59 ± 2 pA ($n = 14$).

Nicotine increases sIPSC frequency in 5-HT DRN neurons. All experiments were performed in the presence of CNQX and APV (control conditions). We used a nicotine concentration of 1 μ M because it is similar to that reached in the blood of a smoker after one cigarette (Henningfield et al. 1993). Nicotine was bath-administered in 18 identified 5-HT DRN neurons. In these conditions, nicotine significantly (Wilcoxon signed-rank test, $Z = -3.180$; $P = 0.001$) increased sIPSC frequency by 75% in 13 5-HT DRN neurons, decreased sIPSC frequency in 3 neurons, and had no effect in 2 other cells. Figure 3 shows direct recordings of GABAergic sIPSCs in a 5-HT neuron before (Fig. 3*A*, *top*), after nicotine administration (Fig. 3*A*, *middle*), and after nicotine washout (Fig. 3*A*, *bottom*). Nicotine administration reduced the interevent interval (Fig. 3*B*) but did not change the amplitude of GABAergic sIPSCs (Fig. 3*C*). The fact that sIPSC amplitude was not affected by nicotine suggests a presynaptic effect of the drug. In the presence of TTX, nicotine significantly increased mIPSC frequency by 45% (Wilcoxon signed-rank test, $Z = -2.3666$; $P = 0.018$; $n = 7$). The increases in IPSC frequency induced by nicotine and by nicotine in the presence of TTX were not statistically significant (Mann-Whitney test, $Z = -0.832$, $P = 0.43$) (Fig. 3*D*). Mecamylamine (MEC; 50 μ M), a nonselective nAChR antagonist, administered alone, did not change sIPSC frequency (Wilcoxon signed-rank test, $Z = -0.135$; $P = 0.814$; $n = 5$; Fig. 3*D*). However, MEC blocked nicotine-induced increase in sIPSC frequency ($n = 6$), confirming a receptor-mediated effect by the drug. In addition, MLA (20 nM), a selective $\alpha 7$ nAChR antagonist, did not change sIPSC frequency when administered alone (Wilcoxon signed-rank test, $Z = -0.73$, $P = 0.625$; $n = 4$) but prevented the increase in sIPSC frequency caused by nicotine (Wilcoxon signed-rank test, $Z = -0.338$, $P = 0.813$, $n = 7$; Fig. 3*D*).

Nicotine-dependent increase in GABAergic sIPSC frequency is mediated by $\alpha 7$ nAChRs. To identify the nAChR subtype involved in nicotine's effect, two selective nAChR agonists were used. The selective $\alpha 4\beta 2$ nAChR agonist RJR-2403 (100 nM) did not change the GABAergic sIPSC frequency in 5-HT DRN neurons ($n = 5$; Fig. 4, *A* and *B*). In contrast, the administration of PNU-282987 (100 nM), a selective $\alpha 7$ nAChR agonist, significantly (Wilcoxon signed-rank test, $Z = 2.201$, $P = 0.028$; $n = 6$) increased GABAergic sIPSC frequency by 92% versus the control group (Fig. 4, *C* and *D*). PNU-282987 also significantly increased GABAergic mIPSC

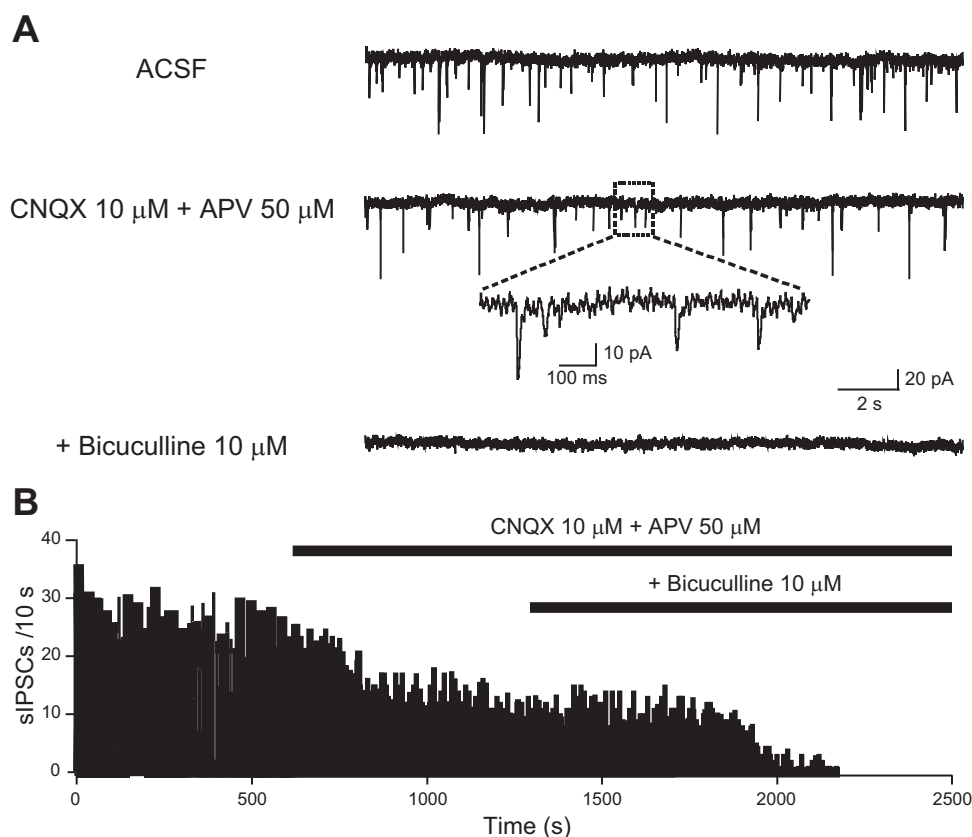


Fig. 2. Spontaneous inhibitory postsynaptic currents (sIPSCs) recorded in serotonergic neurons are mediated by GABA. *A*: sIPSCs from a 5-HT neuron were recorded in voltage-clamp mode in the absence of any drug (top) and after block of glutamatergic receptors with CNQX (10 μ M) and APV (50 μ M) (middle). An expanded region of the middle trace (dashed box) is shown below. The GABA_A receptor antagonist bicuculline (10 μ M) blocked all remaining synaptic currents (bottom). *B*: frequency histogram showing the time course of sIPSCs without drugs and after CNQX and APV administration and subsequent bicuculline administration.

frequency by 56% (Wilcoxon signed-rank test, $Z = -2.202$, $P = 0.028$; $n = 6$). The increases in IPSC frequency induced by PNU-282987 in the presence and absence of TTX were not statistically different (Mann-Whitney test, $Z = 1.121$; $P = 0.31$), suggesting that the increase in GABA release mediated by $\alpha 7$ nAChRs is independent of action potential generation by GABAergic neurons (Fig. 4E). In agreement with the previous results, this confirms that the effect of nicotine on GABA release is presynaptic. In summary, the results obtained in this experimental group show that the nicotine-induced increases in GABAergic sIPSC frequency of 5-HT DRN neurons are due to activation of a presynaptic $\alpha 7$ nAChR.

As another tool to corroborate that nicotine-induced increases of sIPSC frequency were due to activation of $\alpha 7$ nAChR, we used PNU-120596, a positive allosteric modulator specific for $\alpha 7$ nAChR (daCosta et al. 2011; Williams et al. 2011). Administration of PNU-120596 (10 μ M) alone did not change either the amplitude or frequency of sIPSCs ($n = 3$; Fig. 5A, middle). When nicotine was administered after PNU-120596, a significant increase in GABAergic sIPSC frequency by 430% was observed (Wilcoxon signed-rank test, $Z = -1.604$; $P = 0.049$; $n = 3$) (Fig. 5, A, B, and D). PNU-120596 pretreatment also increased the amplitude of GABAergic sIPSCs obtained after nicotine administration by 187% (Fig. 5, A and C). The use of this positive allosteric modulator gave stronger evidence that the nAChR implicated in the effect of nicotine was of the $\alpha 7$ type.

Blocking CICR but not VGCCs prevented nicotine-induced increases in sIPSC frequency. We also investigated whether Ca^{2+} was involved in the effect of nicotine on sIPSCs. Among nAChRs, the $\alpha 7$ homomeric subtype is the one with the highest

Ca^{2+} permeability (Alkondon et al. 1997; Fucile 2004). Calcium influx in axon terminals may induce the release of calcium from intracellular stores (mostly the endoplasmic reticulum), a phenomenon termed calcium-induced calcium release (CICR) (Berridge 1998). To determine whether CICR participates in nicotine-induced increase in GABAergic sIPSC frequency, two drugs were used: ryanodine (100 μ M), a blocker of endoplasmic reticulum Ca^{2+} channels, and thapsigargin (10 μ M), a noncompetitive inhibitor of the sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA). Ryanodine or thapsigargin administered after CNQX and APV did not significantly alter sIPSC frequency [Wilcoxon signed-rank test for ryanodine: $Z = -0.249$ ($P = 0.87$, $n = 4$), thapsigargin: $Z = -0.365$ ($P = 0.87$, $n = 4$)] (Fig. 6, A, inset and B, inset). However, the nicotine-dependent increase in GABAergic sIPSC frequency of 5-HT DRN neurons was suppressed by pretreatment with either ryanodine (Fig. 6A) or thapsigargin (Fig. 6B). Therefore, Ca^{2+} release from intracellular stores is necessary for nicotine-dependent increases in sIPSC frequency.

With the purpose of investigating whether the increase in GABAergic sIPSC frequency induced by nicotine was dependent on VGCCs, a mixture of selective blockers of VGCCs was administered to 5-HT DRN neurons before nicotine. The mixture consisted of ω -agatoxin-TK (400 nM), ω -conotoxin-GVIA (500 nM), and nitrendipine (10 μ M), selective blockers of P/Q-, N-, and L-type VGCCs, respectively. Treatment of brain slices with this mixture of VGCC blockers significantly decreased sIPSC frequency by 27% (Wilcoxon signed-rank test: $Z = -1.826$, $P = 0.032$, $n = 4$; Fig. 6C, inset). Nevertheless, administration of VGCC blockers did not affect the increase in

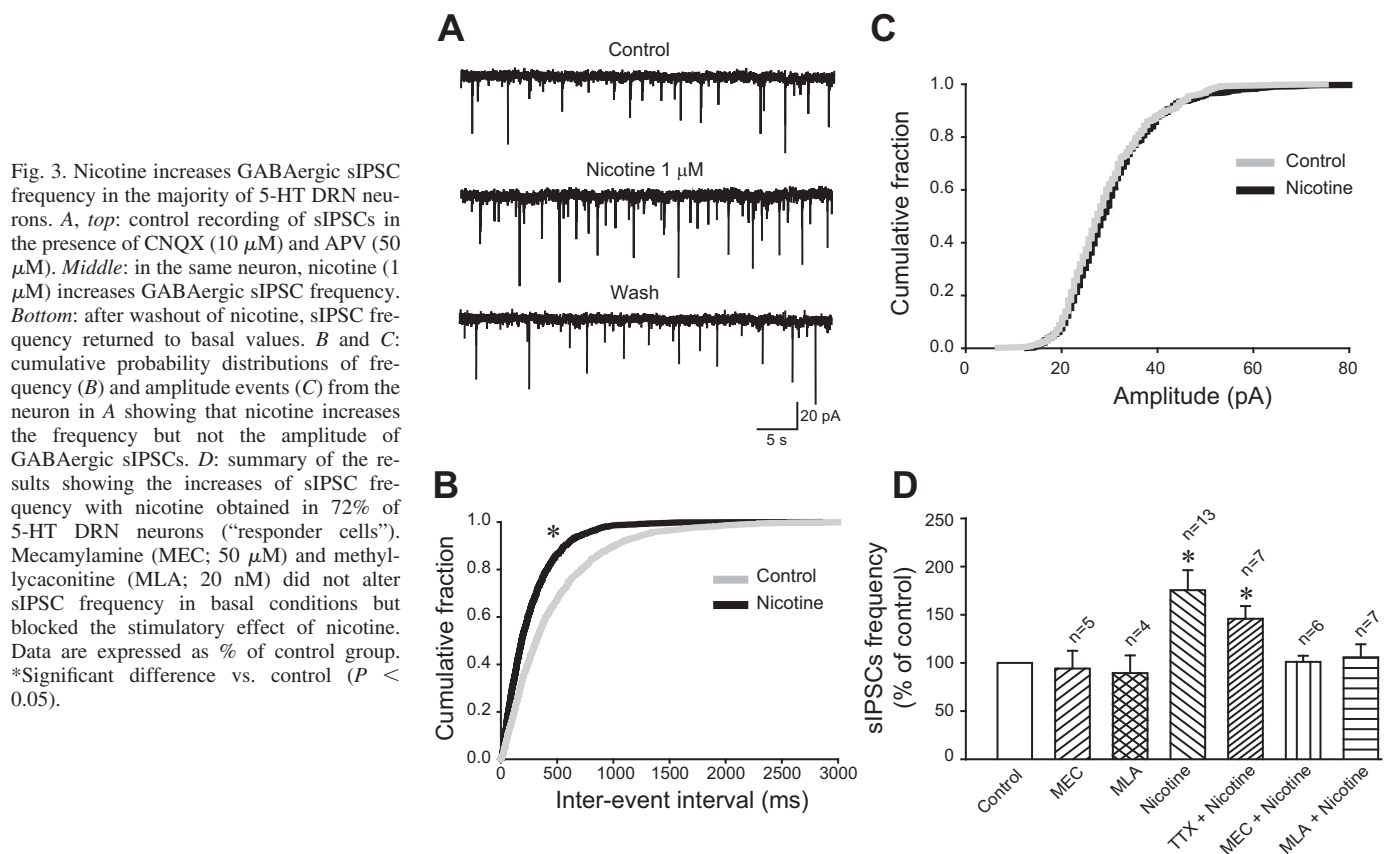


Fig. 3. Nicotine increases GABAergic sIPSC frequency in the majority of 5-HT DRN neurons. *A*, *top*: control recording of sIPSCs in the presence of CNQX (10 μ M) and APV (50 μ M). *Middle*: in the same neuron, nicotine (1 μ M) increases GABAergic sIPSC frequency. *Bottom*: after washout of nicotine, sIPSC frequency returned to basal values. *B* and *C*: cumulative probability distributions of frequency (*B*) and amplitude events (*C*) from the neuron in *A* showing that nicotine increases the frequency but not the amplitude of GABAergic sIPSCs. *D*: summary of the results showing the increases of sIPSC frequency with nicotine obtained in 72% of 5-HT DRN neurons ("responder cells"). Mecamylamine (MEC; 50 μ M) and methyllycaconitine (MLA; 20 nM) did not alter sIPSC frequency in basal conditions but blocked the stimulatory effect of nicotine. Data are expressed as % of control group. *Significant difference vs. control ($P < 0.05$).

sIPSC frequency induced by nicotine (Wilcoxon signed-rank test, $Z = -1.826$, $P = 0.038$, $n = 5$) (Fig. 6C).

The effects of CICR and VGCC blockers on nicotine-dependent GABAergic sIPSCs, expressed as a percentage versus the control group, are presented in Fig. 6D. These results demonstrate that nicotine's effect on sIPSC frequency is independent of VGCCs but is critically dependent on activation of CICR. A model summarizing the effect of nicotine on the input from GABA terminals to 5-HT DRN neurons is presented in Fig. 7.

DISCUSSION

The main findings of this study are that nicotine produces a $\alpha 7$ nAChR-mediated presynaptic increase of the GABAergic input to 5-HT DRN neurons and that this effect is independent of action potential generation or opening of VGCCs but conditioned by CICR in GABAergic DRN terminals.

The results of the present paper indicate that nicotine-induced increase in GABAergic input of the majority of 5-HT DRN neurons is produced by activation of $\alpha 7$ nAChRs. Thus the nicotine-induced increase in GABAergic sIPSC frequency was 1) blocked by low concentrations of MLA, a selective antagonist of $\alpha 7$ nAChRs; 2) mimicked by the selective agonist of $\alpha 7$ nAChRs PNU-282987; and 3) greatly amplified by the positive allosteric modulator of $\alpha 7$ nAChRs PNU-120596. The $\alpha 4\beta 2$ nAChRs were not involved in nicotine-induced GABA release, since the selective agonist of $\alpha 4\beta 2$ nAChRs, RJR-2403, did not change the frequency of GABAergic sIPSCs.

The nicotine-induced GABA release in the DRN was achieved by a presynaptic mechanism, since in the presence

of TTX both nicotine and PNU-282987 increased the frequency but not the amplitude of GABAergic IPSCs of 5-HT DRN neurons. These data are in agreement with studies indicating that nicotine induces GABA release in several brain areas with presynaptic mechanisms. Thus the $\alpha 7$ nAChR subtype was found responsible for the presynaptic nicotine-induced GABA release in the hippocampus (Kanno et al. 2005; Maggi et al. 2001; Radcliffe et al. 1999) and dorsal motor nucleus of the vagus (Bertolino et al. 1997), whereas the $\alpha 4\beta 2$ nAChR subtype mediated the nicotine-induced presynaptic GABA release in the VTA (Corrigall et al. 2000), cortex, striatum, and thalamus (McClure-Begley et al. 2009), medial septum (Yang et al. 1996), periaqueductal gray (Nakamura and Jang 2010), prefrontal cortex (Aracri et al. 2010), and lateral spiriform nucleus (Zhu and Chiappinelli 2002).

In a previous study, Chang et al. (2011) reported that nicotine increased the GABAergic input to 5-HT DRN neurons in a reduced proportion (34%) of the cells tested. In contrast, in our study nicotine (1 μ M) increased the frequency of GABAergic sIPSCs in $\sim 72\%$ of identified 5-HT DRN neurons. This discrepancy may be attributed to the age dependence of nAChR expression: neonate rats (0–28 postnatal days of age) present higher densities of [3 H]nicotine and α -[3 H]bungarotoxin binding sites in the brain stem than older animals (Zhang et al. 1998). We used rats of 18–21 postnatal days, whereas Chang et al. (2011) used rats of 60 postnatal days. In another recent study, Yang and Brown (2014) did not find a presynaptic effect of carbachol (a nonhydrolyzable analog of acetylcholine) on GABAergic

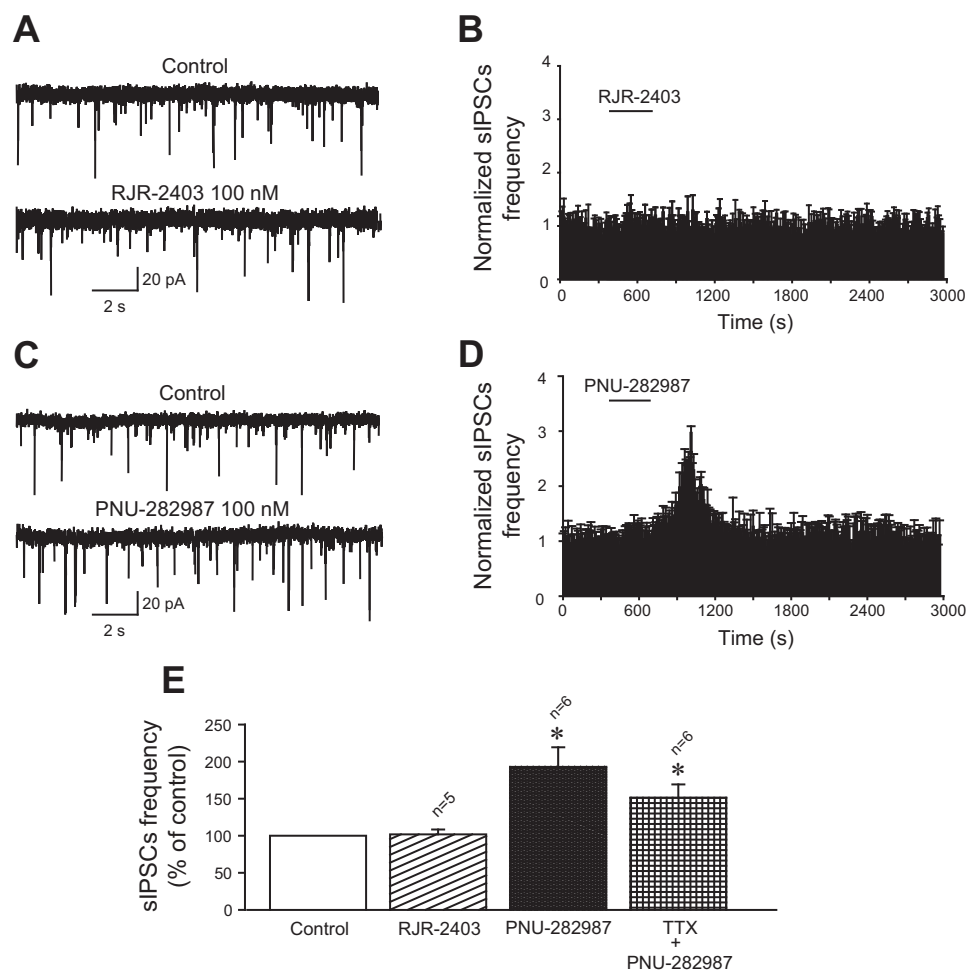


Fig. 4. $\alpha 7$ but not $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) mediate the nicotine-induced increase in sIPSC frequency in 5-HT DRN neurons. *A*: administration of RJR-2403 (100 nM), a selective $\alpha 4\beta 2$ nAChR agonist, did not change sIPSC frequency. *B*: normalized frequency histogram showing the lack of effect of RJR-2403 on sIPSCs. *C*: administration of PNU-282987 (100 nM), a selective agonist of $\alpha 7$ nAChRs, increased the frequency of sIPSCs. *D*: normalized frequency histogram showing the time course of sIPSC frequency increase induced by PNU-282987. *E*: bar graph showing the effect of RJR-2403, PNU-282987, and TTX + PNU-282987 on sIPSC frequency. All recordings were performed in the presence of CNQX (10 μ M) and APV (50 μ M). Data are expressed as % change (mean \pm SE) compared with control group. *Significant difference vs. control ($P < 0.05$).

sIPSCs of 5-HT DRN neurons. This difference may be due to a much lower affinity of carbachol for $\alpha 7$ nAChRs compared with nicotine (Bolchi et al. 2013).

Presynaptic nicotinic actions are critically dependent on increase in intracellular Ca^{2+} levels. For example, the activation of $\alpha 4\beta 2$ nAChRs produces an inward Ca^{2+} current, which induces membrane depolarization and the opening of VGCCs. The subsequent increase in intracellular Ca^{2+} concentration produces the release of Ca^{2+} from the endoplasmic reticulum (CICR) (Rathouz and Berg 1994; Vijayaraghavan et al. 1992). This last event increases intracellular Ca^{2+} concentration to the level required for neurotransmitter release (Dajas-Bailador et al. 2002; Dickinson et al. 2008; Garduño et al. 2012). The situation is different in the case of $\alpha 7$ nAChRs, which have the highest Ca^{2+} permeability among all types of nAChRs (Alkonon et al. 1997). The activation of $\alpha 7$ nAChRs produces a much higher increase in intracellular Ca^{2+} compared with $\alpha 4\beta 2$ nAChRs, and this increase is by itself sufficient to produce CICR without activation of VGCCs (Dickinson et al. 2007; Gray et al. 1996; Sharma et al. 2008; Sharma and Vijayaraghavan 2003). The mechanism by which CICR increases neurotransmitter release involves activation of Ca^{2+} -dependent kinases such as calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) (Sharma et al. 2008) and protein kinase C (PKC) (Wu and Wu 2001).

Our results are consistent with a CICR-dependent effect of nicotine, since ryanodine, a blocker of endoplasmic reticulum

calcium channels, or thapsigargin, a noncompetitive inhibitor of SERCA, blocked the nicotine-induced increase in GABAergic sIPSC frequency (see Fig. 7). In support for this idea, presynaptically located calcium stores have been found to regulate neurotransmitter release in different brain structures (Conti et al. 2004; Llano et al. 2000).

Our data indicate that VGCCs do not participate in nicotine-induced increase in GABA release since a mixture of selective blockers of VGCCs did not suppress the stimulatory effects of nicotine on sIPSC frequency. This experimental observation reinforces the idea that $\alpha 4\beta 2$ nAChRs are not involved in nicotine-induced GABA release in the DRN.

Physiological relevance. Nicotine produces both inhibitory and excitatory effects on 5-HT DRN neurons. In brain slices, the excitatory effects observed in the majority of 5-HT DRN neurons are mediated by activation of somatodendritic $\alpha 4\beta 2$ and $\alpha 7$ nAChRs of these neurons (Galindo-Charles et al. 2008). Also, nicotine produces excitatory effects by increasing glutamate and norepinephrine release through activation of presynaptic $\alpha 4\beta 2$ and $\alpha 7$ nAChRs, respectively (Garduño et al. 2012; Li et al. 1998). On the other hand, nicotine also causes inhibition in a subpopulation of 5-HT DRN neurons (Li et al. 1998; Mihailescu et al. 2001, 2002). It is well known that this effect is mediated by nicotine-induced 5-HT release and subsequent stimulation of 5-HT_{1A} autoreceptors. This mechanism involves the activation of $\alpha 4\beta 2$ nAChRs (Frías-Domínguez et al. 2013). Our study indicates that another way by which

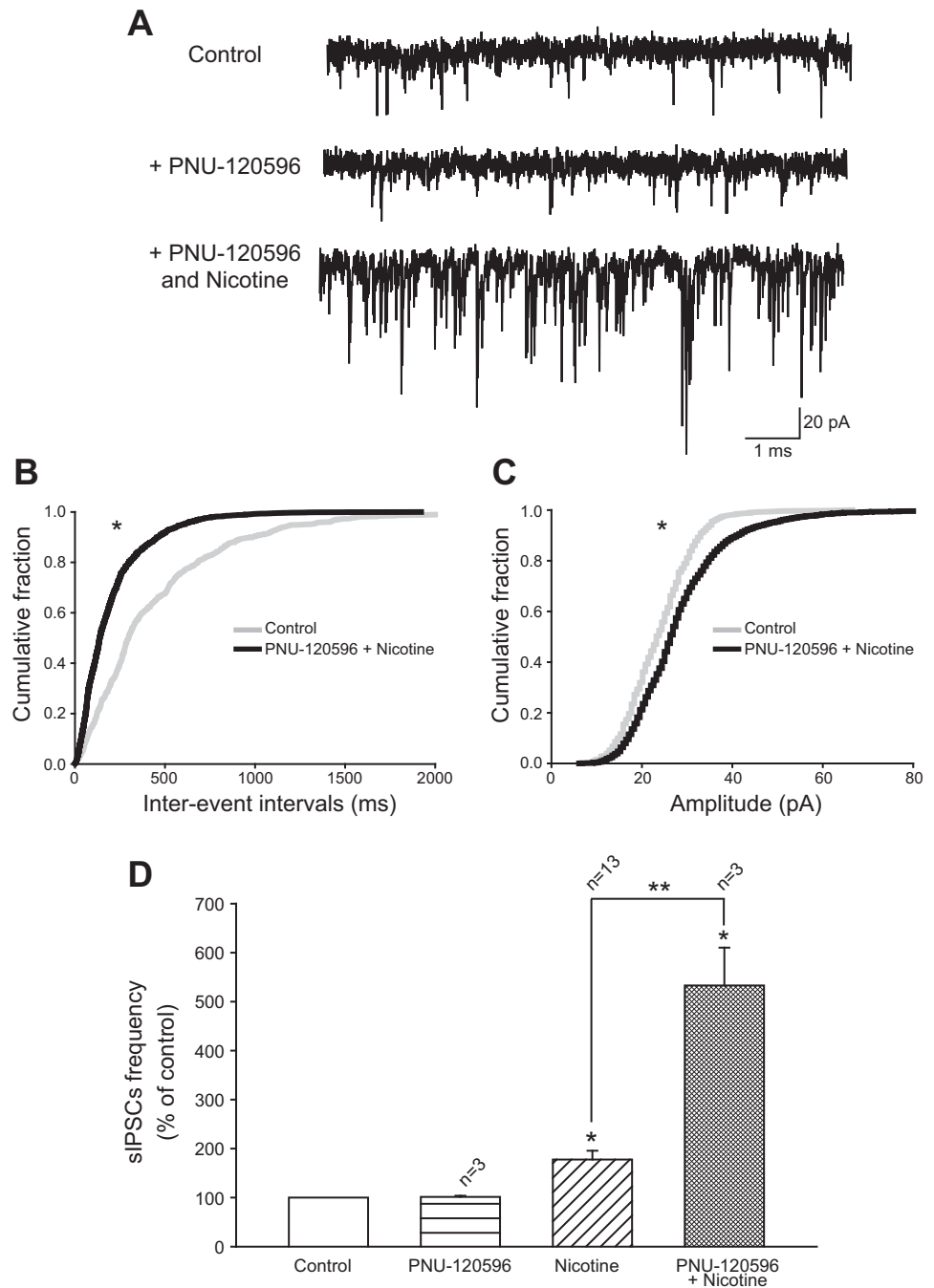


Fig. 5. Positive allosteric modulator of $\alpha 7$ nAChR PNU-120596 amplifies nicotine's effects on sIPSC frequency. *A, top*: sIPSC frequency in control conditions. *Middle*: lack of effect of PNU-120596 on sIPSC frequency when administered alone. *Bottom*: when administered after PNU-120596, nicotine increases sIPSC frequency much more than when administered alone. *B*: interevent cumulative histogram showing that nicotine increases the frequency of sIPSCs in the presence of PNU-120596. *C*: cumulative amplitude histogram showing that nicotine increases the amplitude of sIPSCs in the presence of PNU-120596. *D*: summary bar graph showing the effect of PNU-120596 alone and nicotine alone and in the presence of PNU-120596 on sIPSC frequency. *Significant ($P < 0.05$) difference vs. control; **significant ($P < 0.05$) increase in sIPSC frequency after PNU-120596 + nicotine administration compared with nicotine administration.

nicotine inhibits 5-HT DRN neurons is the increase in their GABAergic input. This idea is supported by a previous study from our laboratory showing that low concentrations of nicotine administered locally in the DRN increase both serotonin and GABA release in the DRN (Mihailescu et al. 2002). In that study, however, neither the subtype nor the neuronal location of nAChRs involved in GABA release was determined. While we found that nicotine increased the frequency of GABAergic sIPSCs in $\sim 72\%$ of 5-HT neurons, previous studies reported that nicotine increases the firing rate of $\sim 80\%$ of DRN neurons (Li et al. 1998; Mihailescu et al. 1998, 2001, 2002), suggesting that the excitatory effects of nicotine prevail over the inhibitory effects. Comparing the results of the present study with those

of Garduño et al. (2012), it was observed that the effect of nicotine on glutamatergic spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs) was of higher amplitude (88%) and lasted longer (>20 min) than the effect on GABAergic sIPSCs (the increase was of 75% and lasted for <15 min). Moreover, in a recent study (Soiza-Reilly et al. 2013), it was shown that the stimulation of GABA_A receptors increases glutamate release from a subpopulation of glutamate terminals, while the activation of the GABA_B subtype has the opposite effect.

An increase in GABA release in the DRN reduces the excitatory effects of nicotine on 5-HT DRN neurons due to stimulation of GABA_A and GABA_B receptors expressed by these cells (Gao et al. 1993; Serrats et al. 2003). This view is

also supported by a previous study performed in our laboratory, which indicated that the GABA_A receptor antagonist bicuculline increases the excitatory effects of nicotine on 5-HT DRN neurons (Mihailescu et al. 2002).

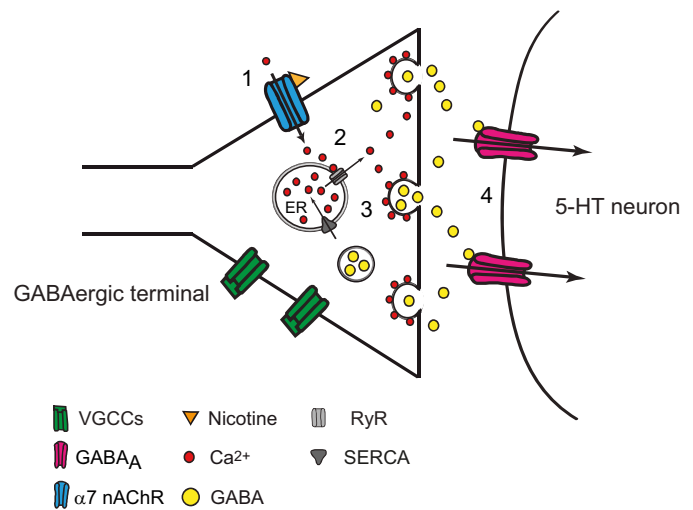
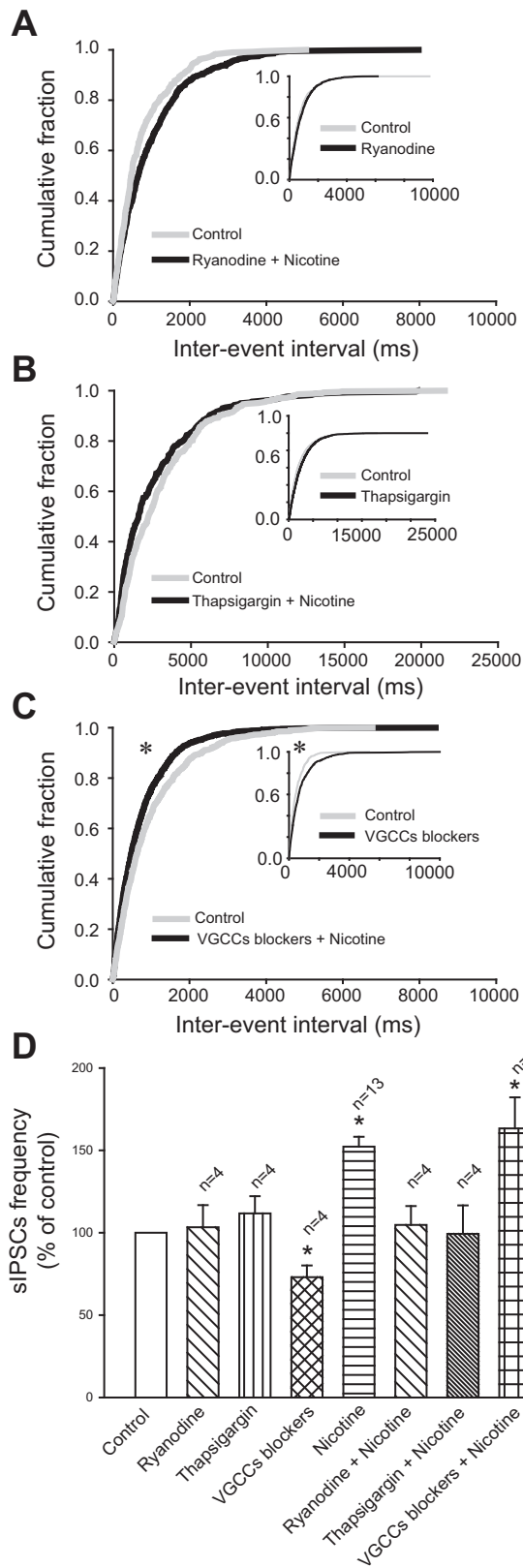


Fig. 7. Model summarizing nicotinic effects on GABAergic terminals in the DRN. 1) Nicotine activates $\alpha 7$ nAChR on GABAergic terminals and induces Ca^{2+} entry through this receptor channel. 2) The increase in intracellular Ca^{2+} produces CICR from the endoplasmic reticulum (ER). 3) CICR evokes GABA release from the terminals. 4) GABA binds to GABA_A receptors, which results in an increase of sIPSC frequency in 5-HT DRN neurons. Apparently, VGCC activation is not required for nicotine-induced GABA release. RyR, ryanodine receptors; SERCA, sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase.

The inhibitory effect of nicotine-induced GABA release on 5-HT neurons may have different intensities in various regions of the DRN. A recent study performed by Corteen et al. (2014) showed that the majority of 5-HT DRN neurons express GABA_A receptors preferentially in their dendritic region. Stimulation of these receptors generates a tonic inhibition of 5-HT neurons. A small group of 5-HT DRN neurons located in the rostral regions of the DRN express GABA_A receptors in both the somatic and dendritic neuronal areas. Stimulation of these receptors produces a stronger phasic inhibition of 5-HT DRN neurons. Therefore, the degree of inhibition of 5-HT DRN neurons may be influenced not only by the location and subtype of nAChRs on GABA terminals but also by the location of GABA_A receptors on 5-HT cells. The existence of different degrees of inhibition of 5-HT neurons by GABA in various regions of the DRN may explain, at least in part, why systemic nicotine increases 5-HT release in some specific regions of the brain, whereas in others it produces decrease or no change of 5-HT extracellular levels (Ribeiro et al. 1993; Shearman et al. 2008; Singer et al. 2004).

The nicotine-induced presynaptic GABA release in the DRN also will inhibit the firing activity of GABAergic DRN neurons, which express both somatic and dendritic GABA_A receptors (Corteen et al. 2014). The degree of this inhibition is

Fig. 6. Dependence of nicotine-induced increase in sIPSC frequency on Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release (CICR) but not on voltage-gated calcium channels (VGCCs). A and B: cumulative probability distributions of frequency events showing that ryanodine (100 μM ; A) or thapsigargin (10 μM ; B) blocks nicotine-induced increase in sIPSC frequency. Ryanodine or thapsigargin alone did not affect sIPSC frequency (insets). C: VGCC blockers [ω -agatoxin-TK (400 nM), ω -conotoxin-GVIA (500 nM), and nitrendipine (10 μM)] caused a decrease in sIPSC frequency per se (inset) but failed to suppress the nicotine effects on sIPSC frequency. D: summary of the results showing the effect on sIPSC frequency with Ca^{2+} drugs alone, nicotine alone, and nicotine with ryanodine, thapsigargin, or VGCC blockers. *Significant difference vs. control ($P < 0.05$).

difficult to predict, since GABAergic DRN interneurons receive glutamatergic input mainly from prefrontal cortex (Celada et al. 2001; Challis et al. 2014; Soiza-Reilly et al. 2013) and also express nAChRs (Bitner and Nikkel 2002), which may also be stimulated directly or indirectly by nicotine.

ACKNOWLEDGMENTS

This paper constitutes partial fulfillment of the Graduate Program in Biomedical Sciences of the National Autonomous University of Mexico (UNAM). F. Hernández-Vázquez acknowledges scholarship and financial support provided by the National Council of Science and Technology (CONACyT) and UNAM.

GRANTS

This work was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)-UNAM Grants IN220112 to S. Mihailescu and IN212313 to S. Hernández-López.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: F.H.-V., S.H.-L., and S.P.M. conception and design of research; F.H.-V. and K.C. performed experiments; F.H.-V., K.C., J.G., and S.H.-L. analyzed data; F.H.-V., S.H.-L., and S.P.M. interpreted results of experiments; F.H.-V. and J.G. prepared figures; F.H.-V. drafted manuscript; K.C., J.G., S.H.-L., and S.P.M. approved final version of manuscript; S.P.M. edited and revised manuscript.

REFERENCES

- Alkondon M, Pereira EF, Cortes WS, Maelicke A, Albuquerque EX. Choline is a selective agonist of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons. *Eur J Neurosci* 9: 2734–2742, 1997.
- Aracri P, Consonni S, Morini R, Perrella M, Rodighiero S, Amadeo A, Becchetti A. Tonic modulation of GABA release by nicotinic acetylcholine receptors in layer V of the murine prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 20: 1539–1555, 2010.
- Berridge MJ. Neuronal calcium signaling. *Neuron* 21: 13–26, 1998.
- Bertolino M, Kellar KJ, Vicini S, Gillis RA. Nicotinic receptor mediates spontaneous GABA release in the rat dorsal motor nucleus of the vagus. *Neuroscience* 79: 671–681, 1997.
- Bitner RS, Nikkel AL. Alpha-7 nicotinic expression by two distinct cell types in the dorsal raphe nucleus and locus coeruleus of rat. *Brain Res* 938: 45–54, 2002.
- Bitner RS, Nikkel AL, Curzon P, Donnelly-Roberts DL, Puttfarcken PS, Namovic M, Jacobs IC, Meyer MD, Decker MW. Reduced nicotinic receptor-mediated antinociception following in vivo antisense knock-down in rat. *Brain Res* 871: 66–74, 2000.
- Bolchi C, Valoti E, Binda M, Fasoli F, Ferrara R, Fumagalli L, Gotti C, Matucci R, Vistoli G, Pallavicini M. Design, synthesis and binding affinity of acetylcholine carbamoyl analogues. *Bioorg Med Chem Lett* 23: 6481–6485, 2013.
- Bowery NG, Hudson AL, Price GW. GABA_A and GABA_B receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience* 20: 365–383, 1987.
- Celada P, Puig MV, Casanovas JM, Guillazo G, Artigas F. Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: involvement of serotonin-1A, GABA_A, and glutamate receptors. *J Neurosci* 21: 9917–9929, 2001.
- Challis C, Beck SG, Berton O. Optogenetic modulation of descending prefrontocortical inputs to the dorsal raphe bidirectionally bias socioaffective choices after social defeat. *Front Behav Neurosci* 8: 43, 2014.
- Chang B, Daniele CA, Gallagher K, Madonia M, Mitchum RD, Barrett L, Vezina P, McGehee DS. Nicotinic excitation of serotonergic projections from dorsal raphe to the nucleus accumbens. *J Neurophysiol* 106: 801–808, 2011.
- Commons KG. Alpha4 containing nicotinic receptors are positioned to mediate postsynaptic effects on 5-HT neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuroscience* 153: 851–859, 2008.
- Conti R, Tan YP, Llano I. Action potential-evoked and ryanodine-sensitive spontaneous Ca²⁺ transients at the presynaptic terminal of a developing CNS inhibitory synapse. *J Neurosci* 24: 6946–6957, 2004.
- Corrigall WA, Coen KM, Adamson KL, Chow BL, Zhang J. Response of nicotine self-administration in the rat to manipulations of mu-opioid and gamma-aminobutyric acid receptors in the ventral tegmental area. *Psychopharmacology (Berl)* 149: 107–114, 2000.
- Corteen NL, Carter JA, Rudolph U, Belelli D, Lambert JJ, Swinny JD. Localisation and stress-induced plasticity of GABA_A receptor subunits within the cellular networks of the mouse dorsal raphe nucleus. *Brain Struct Funct* (June 29, 2014). doi: 10.1007/s00429-014-0824-7.
- daCosta CJ, Free CR, Corradi J, Bouzat C, Sine SM. Single-channel and structural foundations of neuronal alpha7 acetylcholine receptor potentiation. *J Neurosci* 31: 13870–92011, 2011.
- Dahlström A, Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand* 232: 1–55, 1964.
- Dajas-Bailador FA, Mogg AJ, Wonnacott S. Intracellular Ca²⁺ signals evoked by stimulation of nicotinic acetylcholine receptors in SH-SY5Y cells: contribution of voltage-operated Ca²⁺ channels and Ca²⁺ stores. *J Neurochem* 81: 606–614, 2002.
- Dickinson JA, Hanrott KE, Mok MH, Kew JN, Wonnacott S. Differential coupling of alpha7 and non-alpha7 nicotinic acetylcholine receptors to calcium-induced calcium release and voltage-operated calcium channels in PC12 cells. *J Neurochem* 100: 1089–1096, 2007.
- Dickinson JA, Kew JN, Wonnacott S. Presynaptic alpha7- and beta2-containing nicotinic acetylcholine receptors modulate excitatory amino acid release from rat prefrontal cortex nerve terminals via distinct cellular mechanisms. *Mol Pharmacol* 74: 348–359, 2008.
- Friás-Domínguez C, Garduño J, Hernández S, Drucker-Colin R, Mihailescu S. Flattening plasma corticosterone levels increases the prevalence of serotonergic dorsal raphe neurons inhibitory responses to nicotine in adrenalectomised rats. *Brain Res Bull* 98: 10–22, 2013.
- Fucile S. Ca²⁺ permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium* 35: 1–8, 2004.
- Galindo-Charles L, Hernández-López Galarraga S, Tapia E, Bargas D, Garduño J, Friás-Domínguez J, Drucker-Colin C, Mihailescu RS. Serotonergic dorsal raphe neurons possess functional postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors. *Synapse* 62: 601–615, 2008.
- Gallager DW. Benzodiazepines: potentiation of a GABA inhibitory response in the dorsal raphe nucleus. *Eur J Pharmacol* 49: 133–143, 1978.
- Gallager DW, Aghajanian GK. Effect of antipsychotic drugs on the firing of dorsal raphe cells. II. Reversal by picrotoxin. *Eur J Pharmacol* 39: 357–364, 1976.
- Gao B, Fritschy JM, Benke D, Mohler H. Neuron-specific expression of GABA_A-receptor subtypes: differential association of the alpha1- and alpha3-subunits with serotonergic and GABAergic neurons. *Neuroscience* 54: 881–892, 1993.
- Garduño J, Galindo-Charles L, Jiménez-Rodríguez J, Galarraga E, Tapia E, Mihailescu S, Hernández López S. Presynaptic alpha4beta2 nicotine acetylcholine receptors increase glutamate release and serotonin neuron excitability in the dorsal raphe nucleus. *J Neurosci* 32: 15148–15157, 2012.
- Gervasoni D, Peyron C, Rampon C, Barbagli B, Chouvet G, Urbain N, Fort P, Luppi PH. Role and origin of the GABAergic innervation of dorsal raphe serotonergic neurons. *J Neurosci* 20: 4217–4225, 2000.
- Gilbert DG. Paradoxical tranquilizing and emotion-reducing effects of nicotine. *Psychol Bull* 86: 643–661, 1979.
- Gray R, Rajan AS, Radcliffe KA, Yakehiro M, Dani JA. Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature* 383: 713–716, 1996.
- Hale MW, Shekhar A, Lowry CA. Stress-related serotonergic systems: implications for symptomatology of anxiety and affective disorders. *Cell Mol Neurobiol* 32: 695–708, 2012.
- Henningfield JE, Stapleton JM, Benowitz NL, Grayson RF, London ED. Higher levels of nicotine in arterial than in venous blood after cigarette smoking. *Drug Alcohol Depend* 33: 23–29, 1993.
- Hsu HR, Chen TY, Chan MH, Chen HH. Acute effects of nicotine on restraint stress-induced anxiety-like behavior, c-Fos expression, and corticosterone release in mice. *Eur J Pharmacol* 566: 124–131, 2007.
- Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 72: 165–229, 1992.

- Kanno T, Yaguchi T, Yamamoto S, Yamamoto H, Fujikawa H, Nagata T, Tanaka A, Nishizaki T.** 8-[2-(2-Pentyl-cyclopropylmethyl)-cyclopropyl]-octanoic acid stimulates GABA release from interneurons projecting to CA1 pyramidal neurons in the rat hippocampus via pre-synaptic $\alpha 7$ acetylcholine receptors. *J Neurochem* 95: 695–702, 2005.
- Kassel JD, Unrod M.** Smoking, anxiety, and attention: support for the role of nicotine in attentionally mediated anxiety. *J Abnorm Psychol* 109: 161–166, 2000.
- Li X, Rainnie DG, McCarley RW, Greene RW.** Presynaptic nicotinic receptors facilitate monoaminergic transmission. *J Neurosci* 18: 1904–1912, 1998.
- Llano I, González J, Caputo C, Lai FA, Blayney LM, Tan YP, Marty A.** Presynaptic calcium stores underlie large-amplitude miniature IPSCs and spontaneous calcium transients. *Nat Neurosci* 3: 1256–1265, 2000.
- Lowry CA, Hale MW, Evans AK, Heerkens J, Staub DR, Gasser PJ, Shekhar A.** Serotonergic systems, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part of the dorsal raphe nucleus. *Ann NY Acad Sci* 1148: 86–94, 2008.
- Maggi L, Sher E, Cherubini E.** Regulation of GABA release by nicotinic acetylcholine receptors in the neonatal rat hippocampus. *J Physiol* 536: 89–100, 2001.
- McClure-Begley TD, King NM, Collins AC, Stitzel JA, Wehner JM, Butt CM.** Acetylcholine-stimulated [3 H]GABA release from mouse brain synaptosomes is modulated by $\alpha 4\beta 2$ and $\alpha 4\alpha 5\beta 2$ nicotinic receptor subtypes. *Mol Pharmacol* 75: 918–926, 2009.
- Meneses A.** 5-HT systems: emergent targets for memory formation and memory alterations. *Rev Neurosci* 24: 629–664, 2013.
- Michelsen KA, Prickaerts J, Steinbusch HW.** The dorsal raphe nucleus and serotonin: implications for neuroplasticity linked to major depression and Alzheimer's disease. *Prog Brain Res* 172: 233–264, 2008.
- Mihailescu S, Guzmán-Marín R, Drucker-Colín R.** Nicotine stimulation of dorsal raphe neurons: effects on laterodorsal and pedunculoopontine neurons. *Eur Neuropsychopharmacol* 11: 359–366, 2001.
- Mihailescu S, Guzmán-Marín R, Frías-Domínguez M, Drucker-Colín R.** Mechanisms of nicotine actions on dorsal raphe serotonergic neurons. *Eur J Pharmacol* 452: 77–82, 2002.
- Mihailescu S, Palomero-Rivero M, Meade-Huerta P, Maza-Flores A, Drucker-Colín R.** Effects of nicotine and mecamylamine on rat dorsal raphe neurons. *Eur J Pharmacol* 360: 31–36, 1998.
- Nakamura M, Jang IS.** Presynaptic nicotinic acetylcholine receptors enhance GABAergic synaptic transmission in rat periaqueductal gray neurons. *Eur J Pharmacol* 640: 178–184, 2010.
- Nitz D, Siegel J.** GABA release in the dorsal raphe nucleus: role in the control of REM sleep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 273: R451–R455, 1997.
- Radcliffe KA, Fisher JL, Gray R, Dani JA.** Nicotinic modulation of glutamate and GABA synaptic transmission of hippocampal neurons. *Ann NY Acad Sci* 868: 591–610, 1999.
- Rathouz MM, Berg DK.** Synaptic-type acetylcholine receptors raise intracellular calcium levels in neurons by two mechanisms. *J Neurosci* 14: 935–945, 1994.
- Ribeiro EB, Bettiker RL, Bogdanov M, Wurtman RJ.** Effects of systemic nicotine on serotonin release in rat brain. *Brain Res* 621: 311–318, 1993.
- Salín-Pascual RJ, Drucker-Colín R.** A novel effect of nicotine on mood and sleep in major depression. *Neuroreport* 9: 57–60, 1998.
- Serrats J, Artigas F, Mengod G, Cortés R.** GABA_B receptor mRNA in the raphe nuclei: co-expression with serotonin transporter and glutamic acid decarboxylase. *J Neurochem* 84: 743–752, 2003.
- Sharma G, Grybko M, Vijayaraghavan S.** Action potential-independent and nicotinic receptor-mediated concerted release of multiple quanta at hippocampal CA3-mossy fiber synapses. *J Neurosci* 28: 2563–2575, 2008.
- Sharma G, Vijayaraghavan S.** Modulation of presynaptic store calcium induces release of glutamate and postsynaptic firing. *Neuron* 38: 929–939, 2003.
- Sharp T, Cowen PJ.** 5-HT and depression: is the glass half-full? *Curr Opin Pharmacol* 11: 45–51, 2011.
- Shearman E, Fallon S, Sershen H, Lajtha A.** Nicotine-induced monoamine neurotransmitter changes in the brain of young rats. *Brain Res Bull* 76: 626–639, 2008.
- Singer S, Rossi S, Verzosa S, Hashim A, Lonow R, Cooper T, Sershen H, Lajtha A.** Nicotine-induced changes in neurotransmitter levels in brain areas associated with cognitive function. *Neurochem Res* 29: 1779–1792, 2004.
- Soiza-Reilly M, Anderson WB, Vaughan CW, Commons KG.** Presynaptic gating of excitation in the dorsal raphe nucleus by GABA. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 15800–15805, 2013.
- Vandermaelen CP, Aghajanian GK.** Electrophysiological and pharmacological characterization of serotonergic dorsal raphe neurons recorded extracellularly and intracellularly in rat brain slices. *Brain Res* 289: 109–119, 1983.
- Vijayaraghavan S, Pugh PC, Zhang ZW, Rathouz MM, Berg DK.** Nicotinic receptors that bind alpha-bungarotoxin on neurons raise intracellular free Ca^{2+} . *Neuron* 8: 353–362, 1992.
- Williams DK, Wang J, Papke RL.** Investigation of the molecular mechanism of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor positive allosteric modulator PNU-120596 provides evidence for two distinct desensitized states. *Mol Pharmacol* 80: 1013–1032, 2011.
- Wu XS, Wu LG.** Protein kinase C increases the apparent affinity of the release machinery to Ca^{2+} by enhancing the release machinery downstream of the Ca^{2+} sensor. *J Neurosci* 21: 7928–7936, 2001.
- Yang C, Brown RE.** The cholinergic agonist carbachol increases the frequency of spontaneous GABAergic synaptic currents in dorsal raphe serotonergic neurons in the mouse. *Neuroscience* 258: 62–73, 2014.
- Yang X, Criswell HE, Breese GR.** Nicotine-induced inhibition in medial septum involves activation of presynaptic nicotinic cholinergic receptors on gamma-aminobutyric acid-containing neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 276: 482–489, 1996.
- Zhang X, Liu C, Miao H, Gong ZH, Nordberg A.** Postnatal changes of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 7$ and $\beta 2$ subunits genes expression in rat brain. *Int J Dev Neurosci* 16: 507–518, 1998.
- Zhu PJ, Chiappinelli VA.** Nicotinic receptors mediate increased GABA release in brain through a tetrodotoxin-insensitive mechanism during prolonged exposure to nicotine. *Neuroscience* 115: 137–144, 2002.