



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA

EFFECTO DE LA NICOTINA SOBRE LA EXCITABILIDAD DE LAS NEURONAS
GABAÉRGICAS DEL RMTg

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

DIEGO ERNESTO OLIVER CASTILLO ROLÓN

Tutores:

Dr. Salvador Leonardo Hernández López
Dra. Ma. Del Carmen Frías Domínguez

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A Dios, aquella figura abstracta que me enseñaron como suprema y omnipresente. Hoy en día sé que esa concepción, muy humana, es insuficiente para describirla.

No debería cuestionarme la existencia de algo infinito más allá de este mundo, puesto que aquí mismo he hallado la maravillosa creación del universo; día a día, observando y asombrándome de su perfección. A Dios, gracias, por permitirme todo cuanto tengo.

A mi madre, Margarita, quien es el pilar de todos mis logros. Es gracias a ti que hoy puedo tener sueños y aspiraciones.

A mi abuelo, Rubén (†), quien siempre creyó y confió para mí un futuro promisorio. Las lecciones de vida que me mostraste son invaluable; hoy más que nunca las reconozco y afronto. Gracias.

A Lulú (†), quien fue para mí una madre. Eternamente agradezco tu cariño, tus enseñanzas, tu ejemplo de vida. Descansa en paz, M. L. O. M.

A la familia Oviedo Hernández (Citlalli y Guillermo (†), Emiliano y Guillermo). Por todo el apoyo y cariño ofrecido a lo largo de estos años de amistad. A veces no imaginamos cuánto estamos ofreciendo a los demás con acciones tan simples como cotidianas, pero impactan y dejan huella.

A mis amigos: Rogelio Aguilar, gracias por una sincera amistad que perdurará siempre; Arturo López, aún recuerdo las tardes en que compartíamos diversión y conocimiento; Karen Tajonar, una amistad que aprecio mucho; Erick Reza, gracias por demostrarme que la amistad sincera es aquella que se construye día a día y que subyace, en muchas ocasiones, al aprendizaje sobre los errores; César Ramírez, gracias por brindarme siempre parte de tu tiempo y tus conocimientos.

A la familia Reza Hernández (Clara y Moy (†), Itzel y Erick). Un agradecimiento especial merece cada uno por mostrarme que existen personas dispuestas a ofrecer incondicionalmente su amistad y apoyo.

A los animales que hicieron posible esto, ya que ante todo, siento respeto por sus vidas tomadas en beneficio del conocimiento.

AGRADECIMIENTOS

A Carmen Frías Domínguez, Maricela Ortega Villalobos y Sara Caballero Chacón, mujeres con dedicación y entrega.

A Salvador Hernández López, mi asesor. Gracias por la confianza y por la motivación que representa su ejemplo como un buen investigador.

Al Departamento de Fisiología Veterinaria de la FMVZ UNAM, por todo el apoyo y las facilidades brindadas

Al Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina UNAM, por las facilidades. Al bioterio de la misma facultad.

“Always look on the brightside of life”

Nota aclaratoria: El Dr. Salvador Leonardo Hernández López es el autor del proyecto de investigación desarrollado en el presente trabajo de tesis. Asimismo, todo el trabajo de experimentación se realizó en el laboratorio del Dr. Hernández López con recursos económicos de sus donativos: 017-2012 (Presupuesto, Departamento de Fisiología) e IN212313 (PAPIIT). Proyectos aprobados por las Comisiones de Investigación y de Ética de la División de Investigación de la Facultad de Medicina.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
ANTECEDENTES.....	4
I. El núcleo rostromedial tegmental	6
Aferentes al RMTg.....	7
Eferentes del RMTg.....	8
Funciones del núcleo RMTg	10
El RMTg y el sistema de recompensa.....	11
II. GABA.....	13
III. Glutamato.....	14
IV. Acetilcolina	15
V. Los receptores nicotínicos.....	17
VI. Interacción Acetilcolina-Glutamato en el RMTg	19
JUSTIFICACIÓN.....	22
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS	23
MATERIAL Y MÉTODOS	24
RESULTADOS	29
Efecto de la nicotina sobre la frecuencia de las EPSCs en neuronas del RMTg	30
Efecto de la fisostigmina sobre la frecuencia de corrientes postsinápticas excitatorias espontáneas (EPSCs) en neuronas del RMTg	33
Efecto de la nicotina en presencia de TTX.....	34
Efecto de metilcaconitina, un antagonista selectivo de receptores nicotínicos $\alpha 7$, sobre las EPSCs en neuronas del RMTg.....	36

DH β E, un antagonista de receptores nicotínicos α 4 β 2, no bloquea el efecto de la nicotina sobre las EPSCs de neuronas del RMTg.....	37
PNU-282987, un agonista específico de receptores α 7, aumenta la frecuencia de EPSCs en neuronas del RMTg.....	38
El agonista del receptor nicotínico α 4 β 2, RJR, no cambia la frecuencia de EPSCs en neuronas del RMTg	39
DISCUSIÓN.....	41
CONCLUSIONES.....	49
REFERENCIAS	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Dibujo de cortes coronales de cerebro de rata que incluyen al RMTg.....	7
Figura 2. El tVTA/RMTg.....	9
Figura 3. El RMTg como un freno gabaérgico para el sistema dopaminérgico.....	21
Figura 4. La nicotina aumenta la frecuencia de EPSCs en neuronas del RMTg.....	32
Figura 5. La fisostigmina mimetiza el efecto de la nicotina sobre neuronas del RMTg....	34
Figura 6. Tetrodotoxina no bloquea el efecto de la nicotina sobre neuronas del RMTg....	35
Figura 7. El efecto de la nicotina sobre las neuronas del RMTg es bloqueado por MLA ..	37
Figura 8. La DH β E no bloquea el efecto de la nicotina sobre las neuronas del RMTg	38
Figura 9. PNU-282987 aumenta la frecuencia de EPSCs en neuronas del RMTg	39
Figura 10. RJR no aumenta la frecuencia de EPSCs en neuronas del RMTg.....	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grupos experimentales de trabajo.	30
---	----

RESUMEN

CASTILLO ROLÓN DIEGO ERNESTO OLIVER. Efecto de la nicotina sobre la excitabilidad de las neuronas gabaérgicas del RMTg (bajo la dirección de: Dra. Ma. Del Carmen Frías Domínguez y Dr. Salvador Leonardo Hernández López)

El RMTg (núcleo tegmental rostromedial) es una estructura bilateral localizada en el mesencéfalo y constituido principalmente por neuronas gabaérgicas. Una de sus principales funciones es regular la actividad de las neuronas dopaminérgicas de la vía mesoacumbens por lo cual se ha propuesto que actúa como un modulador del sistema de recompensa y de las conductas adaptativas asociadas a dicho sistema. El núcleo RMTg recibe una importante aferencia glutamatérgica excitatoria que se origina en la habénula lateral. Asimismo, recibe aferentes colinérgicas provenientes de los núcleos laterodorsal y pedunculopontino. En diversas estructuras cerebrales se ha observado que la acetilcolina es capaz de modular la liberación de glutamato a través de la activación de receptores colinérgicos nicotínicos. Sin embargo, la interacción acetilcolina–glutamato en el núcleo RMTg no ha sido estudiada suficientemente. En el presente trabajo de tesis, se utilizaron técnicas de registro electrofisiológico para estudiar las corrientes postsinápticas excitatorias glutamatérgicas en las neuronas gabaérgicas del núcleo RMTg, identificadas mediante métodos inmunocitoquímicos. Se demostró que la liberación de glutamato es incrementada por la activación de receptores nicotínicos tipo $\alpha 7$, lo cual produce un aumento en la excitabilidad de las neuronas gabaérgicas. Las implicaciones fisiológicas de estos efectos son discutidas.

INTRODUCCIÓN

La manifestación de distintos comportamientos del organismo animal que le permiten interactuar con su entorno subyace a la función cerebral, la cual es objeto de estudio de muchas investigaciones actuales en neurología animal.

El cerebro de un individuo es versátil y complejo debido a la amplia distribución de poblaciones neuronales con características propias que, a su vez, determinan funciones específicas. Para su estudio, tales poblaciones neuronales se consideran organizadas en áreas delimitadas y núcleos.

Los núcleos y áreas del cerebro establecen una red de comunicación entre sí; estas vías de intercambio de información entre neuronas de distintas regiones del cerebro son redes funcionales llamadas sistemas cerebrales.

Así, la variedad de sistemas cerebrales distribuidos a lo largo del encéfalo (corteza cerebral, cerebro medio, tallo cerebral), permite establecer un circuito general para los procesamientos cerebrales del individuo.

Los centros de respuesta primaria de cada sistema cerebral obedecen a la distribución y función específica de diversos núcleos constituidos por un amplio número de neuronas que secretan distintos tipos de neurotransmisores: noradrenalina, glutamato, dopamina, serotonina, glicina, GABA, sustancia P, neuropéptido Y, encefalinas, β -endorfinas, entre otros.

El conocimiento de los diversos factores que pueden afectar el comportamiento de un animal y el reconocimiento de su relación con el bienestar del mismo (Berridge, 2004), es de relevante importancia en la zootecnia y en la medicina veterinaria. Tanto en animales como en humanos, diversas anormalidades del funcionamiento del sistema de recompensa se han relacionado con alteraciones conductuales que provocan detrimento de la salud y del bienestar animal, lo que enfatiza la importancia del conocimiento exhaustivo de la fisiología de tal sistema cerebral (Russo y Nestler, 2013).

ANTECEDENTES

El área tegmental ventral (VTA, por su nombre en inglés) tiene mayoritariamente neuronas que secretan dopamina y que establecen gran cantidad de conexiones recíprocas con otras áreas y núcleos encefálicos (Jhou *et al.*, 2009a, 2009b; Saunders y Richard, 2011; Sanchez-Catalan *et al.*, 2014).

Por su relevancia funcional, el VTA y sus proyecciones dopaminérgicas hacia el núcleo accumbens (elementos conocidos en conjunto como la vía mesoaccumbens) han sido objeto de múltiples estudios, los cuales han puesto de manifiesto la influencia de las neuronas dopaminérgicas del VTA sobre la actividad de las neuronas del núcleo accumbens y su relación con comportamientos de recompensa (Hökfelt *et al.*, 1984; Nestler y Carlezon, 2006; Brischoux *et al.*, 2009; Haber y Knutson, 2010; Russo y Nestler, 2013); es a partir de esta relación que surge el interés por el conocimiento de los mecanismos de regulación de la actividad de las neuronas dopaminérgicas del VTA; uno de los cuales involucra una región caudal a este núcleo (Stamatakis y Stuber, 2012; Barrot *et al.*, 2012).

Estudios recientes en el VTA han permitido conocer mejor sus características morfológicas y su función. Por ejemplo, se han descrito 3 principales divisiones de esta área: la región anterior (aVTA), la región posterior (pVTA) y la “cola” (tVTA) (las siglas obedecen a los nombres de las estructuras en inglés) (Kaufling *et al.*, 2009; Sanchez-Catalan *et al.*, 2014, Walsh y Han, 2014); cada una de estas subregiones posee características particulares que definen su función.

La región caudal del VTA, identificada como la “cola del área tegmental ventral” (tVTA, por su nombre en inglés), también es denominada núcleo tegmental rostromedial (RMTg), debido a que la mitad posterior del núcleo muestra homología con otras estructuras tegmentales mesencefálicas tales como el núcleo pedúnculo pontino (PPN) y el núcleo tegmental laterodorsal (LTD) (Jhou *et al.*, 2009a). Estudios recientes han demostrado que esta estructura está implicada en varias funciones reguladoras del comportamiento y del movimiento (Lecca *et al.*, 2011; Barrot *et al.*, 2012; Bourdy y Barrot, 2012). Además, puesto que dichos estudios han mostrado que tiene características anatómicas y funcionales diferentes a las del VTA, se le considera ahora como una estructura separada de esta última. Por esta razón, en lo subsecuente se hará referencia a ella como núcleo tegmental rostromedial o RMTg.

El presente trabajo se enfoca en el estudio del funcionamiento del RMTg, resaltando el papel que desempeña en la regulación del VTA y otras estructuras pontinas (Lecca *et al.*, 2011; Barrot *et al.*, 2012; Bourdy y Barrot, 2012) con el objetivo de generar un mayor conocimiento de los procesos fisiológicos relacionados directamente con esta estructura.

I. El núcleo tegmental rostromedial

El núcleo tegmental rostromedial es una estructura bilateral que se extiende en sentido rostro-caudal en el cerebro medio (mesencéfalo) (Hong *et al.*, 2011; Bourdy y Barrot, 2012). El tercio anterior del RMTg está localizado posterior al VTA y se extiende en un sentido rostro-caudal (Perrotti *et al.*, 2005). En ratas y primates, incluyendo al ser humano, el RMTg se localiza dorsolateralmente al núcleo interpeduncular e incrustado dentro de la decusación del pedúnculo cerebeloso superior (ver figura 1) (Barrot *et al.*, 2012; Bourdy y Barrot, 2012; Sanchez-Catalan *et al.*, 2014). Se sabe que $\approx 72\%$ de las neuronas presentes en el RMTg sintetizan y secretan GABA (ácido- γ -amino-butírico), lo que permite referirlo como un núcleo con actividad principalmente gabaérgica (Perrotti *et al.*, 2005; Olson *et al.*, 2007; Kaufling *et al.*, 2009; Kaufling *et al.*, 2010; Gonçalves *et al.*, 2012). De acuerdo con esto, se han reportado concentraciones altas de la enzima involucrada en la síntesis de GABA, glutamato descarboxilasa (GAD 67) en el núcleo RMTg. Adicionalmente, se ha encontrado que las neuronas del RMTg contienen somatostatina (Jhou *et al.*, 2009b), un péptido que es expresado por ciertos tipos de neuronas gabaérgicas en diversas áreas cerebrales (Freund y Gulyas, 1991). Además de estos neurotransmisores, se sabe que las neuronas del RMTg expresan gran cantidad de receptores μ -opiáceos (Jhou *et al.*, 2009b; Jalabert *et al.*, 2011; Jhou *et al.*, 2012), así como receptores canabinoides (Lavezzi y Zahm, 2011; Lecca *et al.*, 2011, 2012; Jhou *et al.*, 2012). Las neuronas del RMTg son electrofisiológicamente muy parecidas a las neuronas gabaérgicas de la substantia *nigra pars reticulata: in vivo*,

tienen una tasa media de disparo de aproximadamente 17 Hz, un potencial de acción de breve duración (1 ms) e intervalos interespiga que están dentro de un rango de 50-70 ms (Jhou *et al.*, 2009a; Jalabert *et al.*, 2011; Lecca *et al.*, 2011).

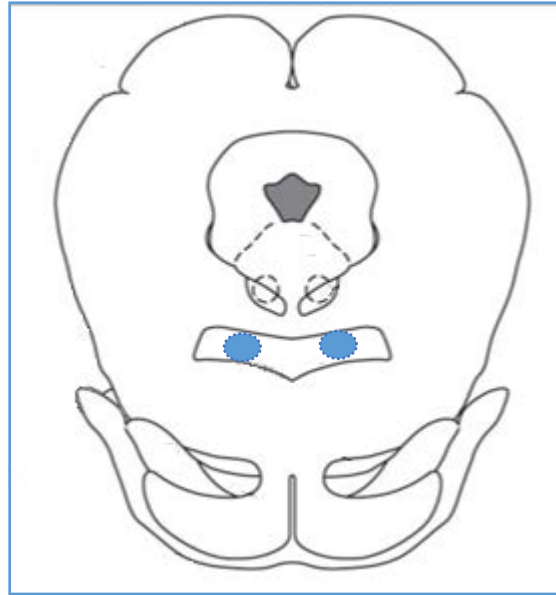


Figura 1. Dibujo esquemático de un corte coronal de cerebro de rata (basado en Paxinos y Watson, 2007) que incluye al **RMTg** (delimitado por los óvalos azules). Bregma: AP-7.2 y -7.44). [Modificado de Lecca *et al.*, 2011].

Aferentes al RMTg

Estudios anatómicos han demostrado que el RMTg recibe numerosas aferencias provenientes de diferentes regiones cerebrales y mesencefálicas tales como: la corteza prefrontal, el hipotálamo (región dorsal, caudal, lateral y el área preóptica), la habénula lateral, la amígdala, el *tectum* (colículos superiores), la *substantia nigra*, el núcleo dorsal del rafe, el *locus coeruleus*, el *septum*, el cíngulo anterior, la sustancia gris periacueductal, el núcleo parabraquial, el núcleo tegmental

laterodorsal y el núcleo tegmental pedúnculo pontino entre otras (Kaufling *et al.*, 2009; Brinschwitz *et al.*, 2010; Barrot *et al.*, 2012; Bourdy y Barrot 2012). La mayoría de dichas estructuras también emiten proyecciones al VTA. (Geisler y Zahm, 2005), sin embargo, las proyecciones axónicas a ambos núcleos se originan en subpoblaciones neuronales diferentes. Por ejemplo, mientras que el RMTg recibe proyecciones de la habénula lateral (LHb), al VTA llegan proyecciones originadas en la parte medial de dicha estructura. El conocimiento de la naturaleza neuroquímica de las proyecciones aferentes al núcleo RMTg aún es muy limitado. Sin embargo, se sabe que las proyecciones de la LHb hacia el RMTg son principalmente glutamatérgicas (Brinschwitz *et al.*, 2010; Balcita-Pedicino *et al.*, 2011), mientras que las entradas provenientes del núcleo dorsal del rafe y el *locus coeruleus* son monoaminérgicas (serotonina y noradrenalina, respectivamente). Las aferentes del hipotálamo lateral son no-orexinérgicas (Kaufling *et al.*, 2009), en tanto que las proyecciones de los núcleos tegmentales laterodorsal y pedunculopontino son principalmente de naturaleza colinérgica (Woolf y Butcher, 1989).

Eferentes del RMTg

El núcleo RMTg proyecta axones hacia diferentes estructuras como son: el hipotálamo (región lateral y área preóptica), el área retrorubral, la sustancia gris periacueductal, el núcleo tegmental laterodorsal, el núcleo tegmental pedúnculo pontino y los núcleos del rafe. Sin embargo, la mayor densidad de proyecciones del núcleo RMTg son hacia las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral y la *substantia nigra pars compacta* (SNc) (Ferreira *et al.*, 2008; Jhou *et al.*, 2009b;

Kaufling *et al.*, 2010). Se sabe que un 80% de los axones provenientes del RMTg que hacen sinapsis con neuronas dopaminérgicas del VTA contactan preferentemente con dendritas proximales (Balcita-Pedicino *et al.*, 2011), aunque también se han observado contactos sinápticos en los somas (Ferreira *et al.*, 2008; Jhou *et al.*, 2009b; Kaufling *et al.*, 2010).

En la figura 2 se esquematizan las principales aferencias y eferencias del RMTg. Cabe señalar que muchas de las aferencias que llegan al RMTg lo hacen también de manera directa al VTA. Esto indica la estrecha relación que existe entre el RMTg y el VTA, tanto anatómica como funcionalmente.

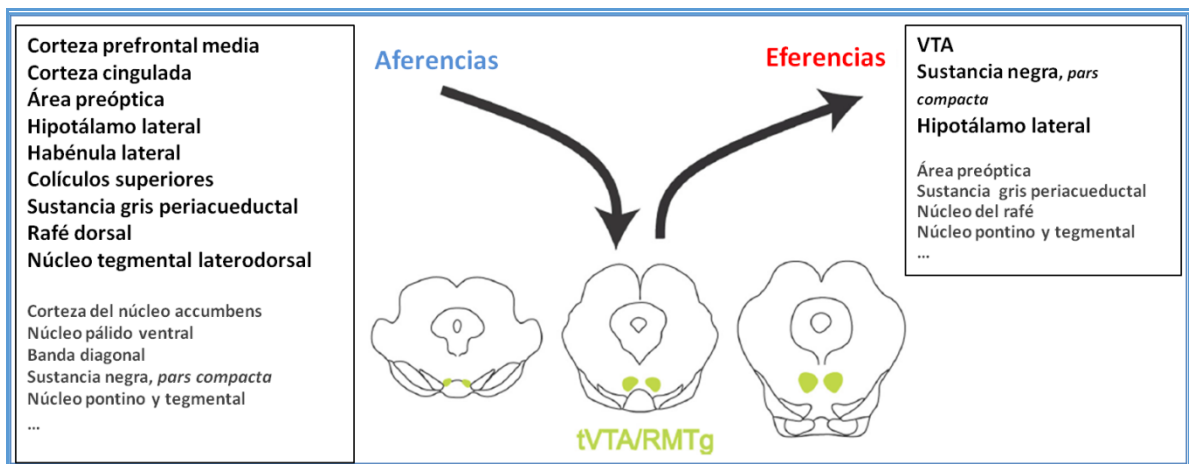


Figura 2. El tVTA/RMTg. El esquema muestra la ubicación del RMTg (color verde), y las principales aferencias y eferencias al núcleo. La mayoría de las aferencias al RMTg también inervan directamente al VTA. [Modificado de Barrot *et al.*, 2012].

Funciones del núcleo RMTg

El RMTg es un núcleo que, acorde con su ubicación anatómica, se ha propuesto como un “centro integrador” que recibe información proveniente de múltiples áreas cerebrales y la canaliza hacia el sistema dopaminérgico mesolímbico generando o regulando diversas respuestas emocionales y conductuales (Lavezzi y Zahm, 2011; Bourdy y Barrot, 2012).

Estudios electrofisiológicos han demostrado que la inhibición de las neuronas del RMTg en roedores incrementa la actividad de las neuronas dopaminérgicas tanto *in vitro* como *in vivo* (Jalabert *et al.*, 2011). Inversamente, la excitación del núcleo RMTg disminuye la actividad de sistemas dopaminérgicos (Lecca *et al.*, 2011, 2012; Matsui y Williams, 2011). Estudios de optogenética apoyan estas observaciones, ya que se ha demostrado que la fotoestimulación de las neuronas del RMTg transfectadas con el canal catiónico fotosensible, *channelrhodopsin 2* (ChR2), aumenta las corrientes postsinápticas inhibitorias (IPSCs) registradas en el VTA. Este efecto es mediado a través de receptores GABA_A (Matsui y Williams, 2011). Efectos similares se han observado *in vivo* en primates (monos Rhesus), donde el 94% de las neuronas de la sustancia *nigra pars compacta* se inhibe al estimular el núcleo RMTg (Hong *et al.*, 2011). Es importante señalar que el RMTg puede ejercer un efecto tónico sobre las neuronas dopaminérgicas, pues se ha observado que la inhibición de este núcleo con muscimol, un agonista de los receptores GABA_A, incrementa la actividad espontánea de las neuronas dopaminérgicas del VTA (Jalabert *et al.*, 2011), sugiriendo que el RMTg está

inhibiendo de manera tónica o sostenida estas neuronas. Por sus conexiones anatómicas, se piensa que el núcleo RMTg integra información tanto del medio interno como información sensorial externa para ajustar la salida motora. Este control motor puede ser ejercido por el RMTg a través de sus proyecciones a la sustancia nigra compacta modulando el circuito motor nigro-estriatal. Además, el núcleo RMTg tiene también proyecciones ascendentes hacia estructuras como el *locus coeruleus* y la amígdala y descendentes que conectan con núcleos motores mesopontinos (Jhou *et al.*, 2009b). Esto ha llevado a proponer que el núcleo RMTg participa en la regulación de la conducta motora motivacional (Holstege, 1992, 2009), que es parte de las respuestas adaptativas a estímulos que tienen un significado emocional para el individuo (Holstege, 2009).

El RMTg y el sistema de recompensa

Tanto en animales como en humanos, diversas anormalidades del funcionamiento del sistema de recompensa se encuentran relacionadas con alteraciones conductuales que provocan detrimento de la salud y del bienestar animal, lo que enfatiza la importancia de un conocimiento exhaustivo de la fisiología de este sistema (Russo y Nestler, 2013). Dentro de las estructuras encefálicas consideradas parte del sistema de recompensa están: la corteza prefrontal, la región central y basolateral de la amígdala, el hipocampo y particularmente la vía mesoaccumbens, previamente mencionada. Estas regiones están interconectadas entre sí e involucran diversos neurotransmisores y neuromoduladores (Russo *et al.*, 2009).

Los datos existentes, sugieren que el núcleo RMTg actúa como un “freno” de las neuronas dopaminérgicas de la vía mesoaccumbens. La actividad dopaminérgica depende de un fino balance entre las aferencias glutamatérgicas excitatorias y las gabaérgicas inhibitorias que actúan como un freno a la excitación, ajustando la tasa y el patrón de disparo de las neuronas dopaminérgicas del VTA. Estudios conductuales demuestran que la estimulación de las aferentes glutamatérgicas al núcleo RMTg, produce aversión y conductas de evitación ante estímulos que normalmente son inocuos (Jhou, 2005; Stamatakis y Stuber, 2012). Por el contrario, la lesión bilateral del núcleo RMTg en roedores, inhibe la ansiedad y las respuestas adaptativas a estímulos nocivos o amenazantes ya sean condicionados (p.ej., un tono auditivo asociado a un estímulo doloroso) o incondicionados (p.ej., el olor de un depredador) (Jhou *et al.*, 2009a). Una característica muy importante de las neuronas del núcleo RMTg es su función de predicción del error de recompensa (PER). Esto es, en estudios experimentales se ha observado aumento de la excitabilidad en neuronas del RMTg cuando el animal percibe una clave o señal que predice la ausencia u omisión de una recompensa esperada, por ejemplo, alimento. De la misma manera, aumenta la frecuencia de potenciales de acción (frecuencia de disparo) de estas neuronas si la señal que percibe el animal representa la inminencia de un estímulo desagradable o doloroso. En caso contrario, cuando el animal percibe una señal que representa la inminencia de un estímulo recompensante o gratificante, disminuye la tasa de disparo de potenciales de acción en las neuronas gabaérgicas del RMTg (Jhou *et al.*, 2009a;

Hong *et al.*, 2011). Como consecuencia se reduce la inhibición ejercida sobre las neuronas del VTA, lo cual aumenta la liberación de dopamina. Por esta razón, el núcleo RMTg se considera un nodo crucial en los circuitos neuronales mediante los cuales las neuronas dopaminérgicas procesan información predictiva de la recompensa y el castigo, lo cual permite al animal adaptarse a su entorno. Más aún, se ha sugerido que el núcleo RMTg podría estar involucrado en patologías como la ansiedad y las adicciones, lo que hace de esta estructura un blanco potencial en el tratamiento de estas enfermedades a futuro.

II. GABA

El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el cerebro adulto. Es sintetizado por la descarboxilación del glutamato, mediante catalización de la enzima ácido glutámico descarboxilasa, la cual existe en dos isoformas (GAD65 y GAD67) que difieren en sus propiedades cinéticas y catalíticas (Walls *et al.*, 2010; Rowley *et al.*, 2012). La GAD65 se concentra más en los axones, mientras que la GAD67 está más concentrada en los somas y dendritas (Kleppner y Tobin, 2002; Schousboe y Waagepetersen, 2009; Zhao, 2013). Al parecer, GAD 65/67 se expresan solamente en células que sintetizan y utilizan GABA como principal neurotransmisor; la identificación de GAD65/67, a través de técnicas de marcaje inmunocitoquímico, constituye una importante herramienta para la identificación de la naturaleza gabaérgica de las neuronas del SNC.

Una vez sintetizado, el GABA es almacenado principalmente en vesículas (se sabe que existe una síntesis no vesicular de GABA), desde las cuales es liberado por exocitosis a la hendidura sináptica cuando se despolariza la neurona presináptica (Olsen y Li, 2012).

El GABA es degradado por la GABA-Transaminasa (GABA-T), una enzima mitocondrial, a succinato semialdehído (SSA), el cual es oxidado por la succinato semialdehído deshidrogenasa (SSADH) a succinato (Rowley *et al.*, 2012); además, es conducido a través de la membrana de células nerviosas y gliales por transportadores de GABA (GATs, por sus siglas en inglés), localizados en la membrana plasmática. El GABA recapturado en las terminales presinápticas puede ser reutilizado. El GABA actúa a través de 3 principales clases de receptores: dos de ellos son canales iónicos de cloro que son los receptores GABA_A y GABA_C, mientras que los del tipo GABA_B, son receptores metabotrópicos que están acoplados a proteínas G (Miralles *et al.*, 1999).

III. Glutamato

El ácido glutámico es un aminoácido que se encuentra en altas concentraciones cerebrales y debido a sus efectos sobre la actividad neuronal, es considerado un neurotransmisor excitatorio. También, se le identifica como precursor en la síntesis del neurotransmisor inhibitorio GABA (Cooper *et al.*, 2002).

Hay dos fuentes principales de glutamato cerebral: sintetizado a partir de glucosa a través del ciclo de Krebs y la transaminación del α -cetoglutarato, u

obtenido a partir de la glutamina sintetizada en las células gliales y que es transportada a la terminal nerviosa donde es convertida en glutamato por la glutaminasa. Una vez sintetizado, el glutamato es almacenado en vesículas sinápticas de donde es liberado mediante exocitosis dependiente de calcio una vez que se despolariza la membrana presináptica. La acción del glutamato sobre su receptor, es finalizada mediante un proceso de recaptura llevado a cabo por transportadores con alta afinidad, ubicados en la membrana presináptica o en las células gliales (Cooper *et al.*, 2002).

Se han descrito a la fecha 3 subtipos de receptores ionotrópicos para el glutamato: los receptores N-metil-D-aspartato (receptores NMDA), los receptores de ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (receptores AMPA) y los receptores de kainato. Los tres actúan como canales iónicos y al abrirse permiten el flujo de iones calcio, sodio y potasio. A su vez, se han identificado 8 tipos de receptores metabotrópicos para el glutamato (mGLUR1 – mGLUR8), los cuales no conducen iones, sino que actúan activando enzimas intracelulares a través de una proteína G acoplada al receptor. Se han clasificado con base en su secuencia específica de aminoácidos, la respuesta a fármacos agonistas y la señal intracelular en la que participan (Olsen y Li, 2012).

IV. Acetilcolina

La acetilcolina es uno de los neurotransmisores involucrados en la regulación de la actividad de las neuronas del RMTg; dentro de este núcleo es liberada por las

terminales colinérgicas de neuronas con origen en los núcleos tegmentales laterodorsal y pedunculo pontino (Woolf y Butcher, 1989). La acetilcolina fue el primer neurotransmisor identificado, es una molécula ampliamente distribuida en el sistema nervioso central y periférico, incluidos el sistema nervioso somático y el autónomo, por lo que está involucrada en múltiples e importantes procesos fisiológicos. Es un éster que resulta de la unión de una molécula de acetil coenzima A y una de colina, en una reacción catalizada por la colina acetiltransferasa. Una vez sintetizada en el citoplasma de la terminal sináptica colinérgica, la acetilcolina es incorporada y almacenada en vesículas de donde es liberada al espacio sináptico por exocitosis. Su degradación en la hendidura sináptica es llevada a cabo por la enzima acetilcolinesterasa presente en la membrana postsináptica. Esta enzima degrada a la acetilcolina produciendo acetato y colina, esta última es recapturada por la terminal presináptica y utilizada posteriormente en la formación de nuevas moléculas del neurotransmisor.

La recarga de las vesículas sinápticas ocurre mediante transporte activo secundario utilizando un intercambiador de protones-acetilcolina. Cuando es liberada, la acetilcolina alcanza abruptamente concentraciones cercanas a 1 mM en el espacio sináptico, pero rápidamente la concentración decremente debido a su difusión y a su hidrólisis por acción de la acetilcolinesterasa (Pidoplichko *et al.*, 1997; Dani *et al.*, 2000). Por esta razón, durante el estudio de los efectos de la acetilcolina, llegan a utilizarse inhibidores de la acetilcolinesterasa (como fisostigmina), lo que permite que el neurotransmisor permanezca por más tiempo en el espacio sináptico

y, por consiguiente, en caso de secreción repetitiva, alcanzar concentraciones mayores; condiciones que favorecen la identificación de sus efectos.

La acetilcolina se une a receptores colinérgicos de tipo muscarínico y nicotínico. Los receptores nicotínicos son canales ionotrópicos pentaméricos compuestos por diversas combinaciones de subunidades α y β , mientras que los receptores muscarínicos son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G. Se han identificado 5 subtipos principales de receptores muscarínicos (M1 – M5). Los receptores M1 y M5 están acoplados a proteínas Gq que activan a la enzima fosfolipasa C produciendo efectos excitatorios. Los receptores M2, M3 y M4, en cambio, están acoplados a proteínas Gi/o e inhiben a la enzima adenilato ciclasa y decremantan las concentraciones de AMPc (Cooper *et al.*, 2002, Olsen y Li, 2012).

La señalización colinérgica mediada a través de receptores nicotínicos está ampliamente distribuida tanto en el sistema nervioso central como en el sistema nervioso periférico y está involucrada en un gran número de procesos tales como aprendizaje, memoria, atención, vigilia, actividad motora y ansiedad, entre otros (Gotti *et al.*, 1997; Hogg *et al.*, 2003; Picciotto, 2003).

V. Los receptores nicotínicos

Los receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs, por sus siglas en inglés) son pentámeros formados por 5 subunidades, que pueden ser tipo α o β . Cuando los receptores nicotínicos están conformados por 5 subunidades idénticas que suelen ser del tipo α (p.ej., $\alpha 7$ o $\alpha 9$) se les denomina homo-oligómeros. En cambio, cuando

están conformados por la combinación de subunidades α y β se les llama heterómeros (Changeux *et al.*, 1992, 1998). A la fecha se han identificado 9 subunidades α ($\alpha 2 - \alpha 10$), la subunidad $\alpha 8$ está presente en aves pero no en mamíferos (Lindstrom *et al.*, 1996). De la subunidad β se han identificado a la fecha sólo tres tipos ($\beta 2$ - $\beta 4$) (Hogg *et al.*, 2003; Gotti y Clementi, 2004; Dani y Bertrand, 2007).

La combinación de diferentes subunidades da lugar a diversos subtipos de nAChRs nombrados con base en la combinación de las subunidades α y β que contienen. Por ejemplo, existen los subtipos $\alpha 2\beta 2$, $\alpha 2\beta 4$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 7$, etc. (Wu y Lukas, 2011). Sin embargo, se sabe que aproximadamente el 90% de los nAChRs expresados en el sistema nervioso central son de los subtipos $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ (Whiting y Lindstrom, 1986). Las subunidades que constituyen los nAChRs les confieren sus propiedades electrofisiológicas y farmacológicas, pudiendo determinar su afinidad a los agonistas y antagonistas; además influyen la potencia y la eficacia de estos compuestos (Luetje y Patrick, 1991; Harvey *et al.*, 1997; Stauderman *et al.*, 1998).

El receptor nicotínico $\alpha 4\beta 2$ está conformado por 2 subunidades $\alpha 4$ y 3 subunidades $\beta 2$, es el nAChR de mayor distribución en el sistema nervioso central y está localizado principalmente en la corteza cerebral, núcleo estriado, núcleo supraquiasmático, núcleo geniculado lateral, mesencéfalo (Whiting *et al.* 1991; Flores *et al.* 1992). Los receptores $\alpha 4\beta 2$ tienen mucha mayor afinidad (rango nanomolar) por la nicotina que el receptor $\alpha 7$ (rango micromolar) pero se

desensibilizan más rápidamente (Zoli *et al.*, 1998; Lambe *et al.*, 2003; Wooltorton *et al.*, 2003).

Los receptores $\alpha 7$ son homo-oligómeros constituidos por 5 subunidades $\alpha 7$ idénticas. Tienen una amplia distribución en el cerebro; particularmente, son expresados en la corteza, hipocampo y regiones subcorticales límbicas, con una menor distribución en regiones talámicas y ganglios basales (Broide *et al.*, 1995; Breese *et al.*, 1997; Machaalani *et al.*, 2010). Los receptores $\alpha 7$ tienen 10 veces más permeabilidad al calcio que los receptores $\alpha 4\beta 2$ (Role y Berg, 1996) y se desensibilizan con cantidades saturantes de acetilcolina o nicotina (Seguela *et al.*, 1993). Se sabe que, en el encéfalo, los nAChRs se localizan principalmente en las terminales sinápticas donde participan modulando la liberación de diversos neurotransmisores (Wonnacott 1997).

VI. Interacción Acetilcolina-Glutamato en el RMTg

Una de las principales aferencias excitatorias al núcleo RMTg la constituyen las aferentes glutamatérgicas provenientes de la habénula lateral (Jhou *et al.*, 2009a, b; Kaufling *et al.*, 2009, 2010a; Gonçalves *et al.*, 2012). Además, el RMTg recibe aferencias colinérgicas provenientes de los núcleos del tegmento laterodorsal y pedúnculo pontino (Kaufling *et al.*, 2009; Brinschwitz *et al.*, 2010; Barrot *et al.*, 2012; Bourdy y Barrot, 2012). En diversas estructuras cerebrales, como el hipocampo, la corteza y el tálamo entre otras, se ha demostrado que la acetilcolina modula la liberación de glutamato mediante la activación de receptores colinérgicos

nicotínicos presinápticos (McGehee *et al.*, 1995; Girod y Role, 2001; Maggi *et al.*, 2004; Dickinson *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2008). En la mayoría de los casos, el efecto es mediado por receptores nicotínicos (nAChR) del tipo $\alpha 7$, aunque en otros casos se ha observado que la liberación de glutamato involucra la activación de receptores $\alpha 4\beta 2$ (Gioanni *et al.*, 1999; Lambe *et al.*, 2003; Garduño *et al.*, 2012). Resulta entonces importante estudiar si también en el núcleo RMTg la acetilcolina ejerce efectos moduladores sobre la liberación de glutamato a través de la estimulación de receptores nicotínicos presinápticos y si así fuera, identificar el tipo o tipos de receptores involucrados. Trabajos previos han sugerido la presencia de receptores nicotínicos en el núcleo RMTg. Por ejemplo, se ha reportado que la aplicación sistémica de nicotina aumenta la tasa de disparo de las neuronas de este núcleo (Lecca *et al.*, 2011, 2012). Sin embargo, los efectos de la estimulación de receptores nicotínicos en el RMTg y su interacción con la transmisión glutamatérgica, no han sido estudiados en forma detallada (ver figura 3).

Por lo tanto, la pregunta que se plantea como punto de partida para el presente trabajo es, si la acetilcolina, a través de la estimulación de receptores nicotínicos, puede modular la liberación espontánea de glutamato en el núcleo RMTg como ocurre en otras estructuras cerebrales. Esta pregunta es importante pues permitirá contribuir al esclarecimiento de las vías de regulación de la excitabilidad de las neuronas gabaérgicas del RMTg.

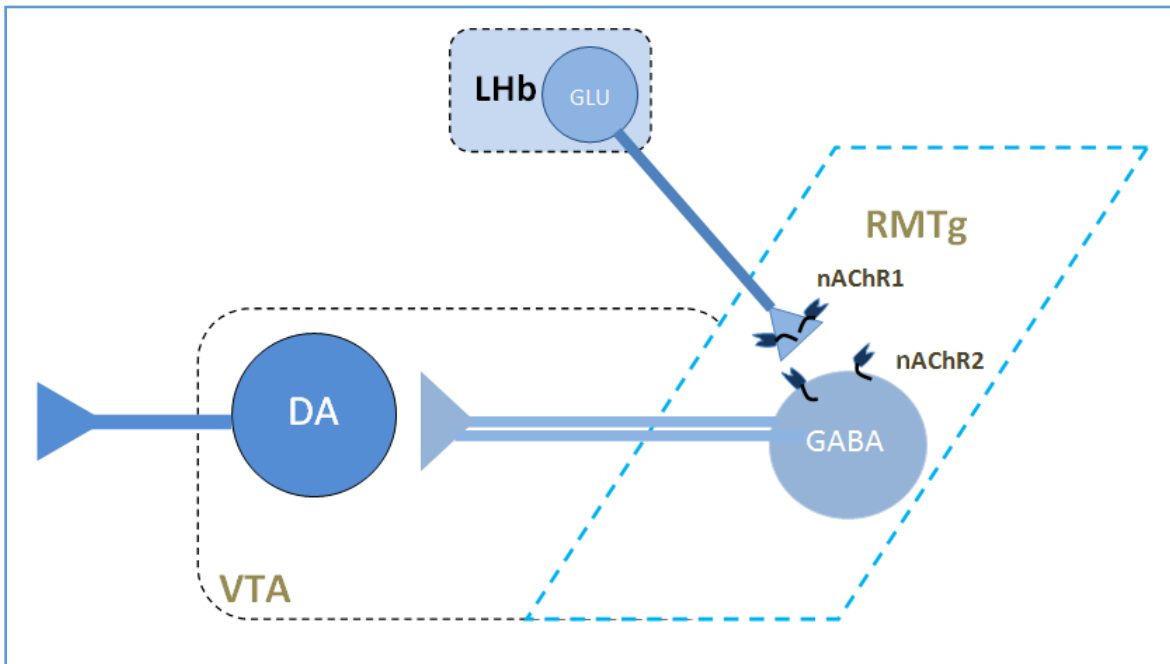


Figura 3. El RMTg como un freno gabaérgico para el sistema dopaminérgico. El esquema representa el RMTg, su principal aferencia glutamatérgica (GLU) (habénula lateral, Lhb) y sus eferencias a los sistemas dopaminérgicos (DA) cercanos. La actividad de las neuronas dopaminérgicas (DA) es reducida por el freno gabaérgico ejercido por las neuronas del RMTg. VTA, área tegmental ventral, nAChR1, receptores nicotínicos presinápticos, nAChR2, receptores nicotínicos postsinápticos. [Modificado de Barrot et al., 2012].

JUSTIFICACIÓN

Como se mencionó, las evidencias anatómicas y funcionales sugieren que el núcleo RMTg juega un papel crucial en la modulación de los sistemas dopaminérgicos. Junto con estos sistemas, el RMTg contribuye a controlar los mecanismos de recompensa y aversión que regulan las conductas adaptativas en los animales, incluyendo los primates. Sin embargo, el estudio de la fisiología del RMTg y particularmente la participación de los receptores nicotínicos en la regulación de la actividad de las neuronas gabaérgicas de este núcleo, requiere de más trabajos que amplíen y profundicen el conocimiento de este núcleo. El presente trabajo se ha realizado con la finalidad de contribuir al conocimiento de la fisiología del RMTg, el cual, se considera un posible blanco de estrategias terapéuticas para tratar enfermedades como la ansiedad en animales y la ansiedad y la depresión en humanos.

Adicionalmente, la nicotina, alcaloide del tabaco y agonista de los receptores nicotínicos, es una de las drogas adictivas más utilizadas a nivel mundial. Anualmente mueren en el mundo alrededor de 6 millones de personas por enfermedades relacionadas con el uso del tabaco (OMS, 2015). Entender la participación de los receptores nicotínicos en la regulación de la actividad de las neuronas gabaérgicas del núcleo RMTg, involucradas en los sistemas de recompensa y aversión, ayudará a comprender cómo la nicotina produce sus efectos adictivos.

HIPÓTESIS

La nicotina aumenta la excitabilidad de las neuronas gabaérgicas del núcleo RMTg, mediante el incremento de la liberación espontánea del neurotransmisor excitatorio glutamato.

OBJETIVOS

1. Identificar el efecto de la nicotina sobre la frecuencia de las corrientes postsinápticas excitatorias espontáneas (EPSCs) mediadas por glutamato registradas en las neuronas gabaérgicas del RMTg.
2. Caracterizar farmacológicamente los receptores nicotínicos involucrados en el efecto de la nicotina utilizando agonistas y antagonistas selectivos de los nAChRs tipo $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$.
3. Identificar mediante inmunocitoquímica la naturaleza gabaérgica de las neuronas registradas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación de Rebanadas. Todos los procedimientos fueron llevados a cabo de acuerdo con la norma oficial mexicana de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para los experimentos se utilizaron ratas Wistar de 21–25 días de edad, provenientes del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM, las cuales estuvieron bajo condiciones controladas de alimento, agua, horas luz-oscuridad y ventilación. El rango de edad de 21-25 días postnatal, se eligió debido a que se ha reportado que a partir de los 20 días de edad la diferenciación celular se ha completado y la expresión de los receptores nicotínicos en la rata no cambia (Van de Kamp y Collins, 1994; Miao *et al.*, 1998; Slotkin *et al.*, 2004). Los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral (400mg/Kg, intraperitoneal) y posteriormente se les dio muerte por decapitación con una guillotina fabricada en la Facultad de Medicina, cuidando los aspectos bioéticos precisos para evitar el sufrimiento innecesario de los animales. Sus cerebros fueron rápidamente removidos y colocados en solución Ringer mantenida a 4°C preparada con las siguientes sustancias (concentración en mM/L): 125 NaCl, 3 KCl, 25 NaHCO₃, 1.25 Na₂HPO₄, 1 MgCl₂, 1.2 CaCl₂, y 25 de glucosa, la osmolaridad fue de 300 mOsm/L y el pH se

ajustó a 7.3. La solución se mantuvo burbujeada con una mezcla de 95%O₂ y 5%CO₂. Con un bisturí se obtuvo un bloque de tejido de la región del mesencéfalo el cual fue adherido con pegamento a una caja de Petri. Ésta fue inmediatamente llenada con solución Ringer fría (4°C). Utilizando un vibratomo (Mod. 1500) se obtuvieron de 4-5 rebanadas coronales de 250 µm de grosor conteniendo el núcleo RMTg. Las rebanadas de tejido fueron mantenidas en solución Ringer a temperatura ambiente al menos por una hora antes de iniciar los registros (Garduño *et al.*, 2012).

Registros Electrofisiológicos. Una rebanada a la vez fue transferida a la cámara de registro de un microscopio de luz infrarroja y perfundida con solución Ringer a una tasa de 4–5 ml/min a 33°C. Los registros en célula completa en las modalidades de fijación de corriente y fijación de voltaje se realizaron utilizando un amplificador Multiclamp® 700A (Molecular Devices™). Las señales de registro fueron obtenidas y monitoreadas con el programa pClamp® 10. Las micropipetas o microelectrodos de registro se fabricaron mediante un estirador de pipetas (Sutter Instruments®, Novato, CA) utilizando tubos de borosilicato (WPI). Los microelectrodos fueron llenados con una solución interna conteniendo (en mM): 140 K-gluconate, 5 NaCl, 1 MgCl₂, 0.02 EGTA, 10 HEPES, 2 Mg₂-ATP, 0.5 Na₂GTP, y 0.1% biocitina. El pH se ajustó a 7.2–7.3 con KOH. La osmolaridad se estableció a un valor entre 280–300 mOsm/L. La resistencia de los microelectrodos varió en un rango de 4-7 MΩ. Las señales electrofisiológicas fueron almacenadas utilizando una interface Digidata® 1420A análogo-digital (Molecular Devices™), a una velocidad de muestreo de 5 kHz. Las neuronas fueron visualizadas mediante un sistema de

videomicroscopía con iluminación infrarroja (BX51WI; Olympus Instruments™) utilizando un objetivo de inmersión en agua de 60X. Las neuronas registradas se localizaron en la parte ventral del mesencéfalo, dorsolateralmente al núcleo interpeduncular y dentro de la decusación del pedúnculo cerebeloso (ver Barrot *et al.*, 2012). Puesto que es una estructura bilateral, se eligieron indistintamente células localizadas dentro de los límites que corresponden al núcleo RMTg, tanto a la izquierda como a la derecha de la línea media. Las neuronas fueron primeramente registradas mediante la técnica de fijación de corriente para examinar sus características electrofisiológicas. Se seleccionaron aquellas células que tenían potenciales de acción de breve duración (≈ 1 ms) y mostraban disparo regular ante la aplicación de un pulso despolarizante, ya que estas son características que se han descrito en las neuronas gabaérgicas de esta región (Lecca, 2011, 2012). Además, sólo se seleccionaron neuronas que exhibieron un sobretiro (overshoot) de 10-20 mV, para asegurar la viabilidad del sello. Una vez cumplidas estas condiciones, se pasó a la modalidad de fijación de voltaje para realizar el registro de las corrientes postsinápticas excitatorias espontáneas (EPSCs). El registro de estas corrientes se hizo de manera continua a un potencial de mantenimiento de -70 mV (Garduño *et al.*, 2012). Todos los experimentos fueron hechos en presencia de gabazina o picrotoxina ($10 \mu\text{M}$) para bloquear los receptores GABA_A y aislar las corrientes excitatorias mediadas por glutamato.

Administración de Fármacos. Todos los fármacos se aplicaron disueltos en la solución Ringer, mediante un sistema de perfusión por gravedad. Después de tomar

un registro control de 15 minutos, la nicotina o sus agonistas se aplicaron durante 8-10 minutos para asegurar que hubiera un equilibrio de la concentración de los fármacos en la cámara de registro. Después de esto, se inicio el retiro (lavado) de los fármacos del baño de perfusión con un recambio de 60 ml de solución Ringer, a lo cual siguió un periodo de registro de al menos 30 minutos que fue tomado para su análisis. Cuando la nicotina se administró en presencia de sus antagonistas o de tetrodotoxina (TTX), estos fármacos se aplicaron primero durante los 15 minutos previos a la administración de nicotina y se mantuvieron en el baño de perfusión aún después del lavado de la nicotina. La fisostigmina o eserina se administró en presencia de atropina para bloquear los efectos de la acetilcolina endógena a través de receptores muscarínicos. La resistencia de entrada de las células (R_i) fue monitoreada mediante pulsos despolarizantes de 5 mV y 50 ms de duración durante el experimento. Cuando la R_i varió más del 15% el experimento fue descartado. Todos los fármacos se prepararon el mismo día del experimento.

Inmunohistoquímica. Las neuronas fueron llenadas con biocitina durante el experimento. La biocitina fue disuelta en la solución interna con la cual se llenaron los microelectrodos de registro. Para determinar la naturaleza gabaérgica de la neurona registrada, se utilizó una combinación de marcaje intracelular e inmunohistoquímica contra la enzima GAD_{65/67}. Al término del experimento las rebanadas conteniendo las neuronas llenadas con biocitina fueron fijadas durante toda la noche en una solución de PBS (0.1 M) con paraformaldehído al 4% y ácido pícrico al 1%, con un pH de 7.4. Posteriormente, la rebanada se lavó con solución

salina amortiguadora de fosfatos (PBS, de *phosphate buffered saline*) y se mantuvo en sacarosa al 30% por media hora. Enseguida, el tejido se incluyó en un bloque de agar para obtener rebanadas de 40 μm de grosor con un vibratomo. Estas rebanadas fueron incubadas de 4–6 horas en PBS conteniendo 0.2% de Triton X-100 y streptavidina conjugada a Cy3 (1 mg/ml; diluida 1:100; Zymed™) para marcar la neurona registrada. La rebanada con la célula marcada se incubó luego en BSA (1%) por media hora e inmediatamente después, se incubó con el anticuerpo anti-GAD_{65/67} (diluido 1:1000; ImmunoStar™) durante dos días. Después de enjuagar con PBS, la rebanada fue reincubada por 2 horas con un anticuerpo secundario (anti-rabbit) conjugado a fluoresceína (diluido 1:100; Vector Laboratories™). La rebanada se montó en un portaobjetos utilizando un medio de montaje (Vectashield®; Vector Laboratories™), para observarla en un microscopio de epifluorescencia e identificar la marca del anticuerpo secundario. Finalmente, la célula marcada se examinó en un microscopio confocal y las imágenes fueron digitalizadas y almacenadas. La omisión del anticuerpo primario resultó en ausencia de señal detectable (datos no mostrados).

Análisis de Datos. La captura de los datos fue llevada a cabo utilizando el programa Clampfit® 10 (Molecular Devices™). El análisis de los datos se efectuó utilizando el programa Mini-Analysis (Synaptosoft®, Decatur, GA) y los paquetes para gráficas y análisis estadístico: Origin® version 8, OriginLab Corporation™, Wellesley Hills MA e Igor® Pro 6, WaveMetrics Inc™, Lake Oswego, OR. Los datos fueron expresados como media \pm error estándar. Las comparaciones estadísticas

entre muestras (registro individual por célula) fueron hechas utilizando la prueba t de Student, (un valor de $p < 0.05$ fue tomado como estadísticamente significativo).

RESULTADOS

Se registraron en total 47 células localizadas dentro del RMTg, obteniéndose un registro individual de las corrientes postsinápticas excitatorias espontáneas (EPSCs).

Primeramente, las neuronas registradas fueron identificadas con base en sus propiedades electrofisiológicas como la frecuencia y características del potencial de acción. Como se mencionó anteriormente, de acuerdo a la literatura, las neuronas gabaérgicas del RMTg tienen una frecuencia de disparo >10 Hz (Jhou *et al*, 2009a) y una duración del potencial de acción relativamente corta (<1.5 ms). Las neuronas que no mostraron estas características fueron descartadas para ser registradas.

Adicionalmente, del total de células registradas, se procesaron 17 células con la técnica de inmunocitoquímica de las cuales 15 fueron identificadas como neuronas gabaérgicas.

En la tabla 1 se muestran los siete grupos experimentales que se utilizaron en el estudio. Se muestra también el total de células registradas de cada grupo.

Grupo experimental	Fármacos empleados	Células registradas
Nic	Nicotina	17
Fisostigmina	Fisostigmina en presencia de atropina	5
TTX+Nic	Nicotina en presencia de Tetrodotoxina (TTX)	4
MLA+Nic	Nicotina en presencia de metilcaconitina (MLA)	6
DHE+Nic	Nicotina en presencia de dihidro-beta-eritroidina (DH β E)	5
PNU-282987	PNU-282987, agonista de receptores nicotínicos α 7	5
RJR	RJR, agonista de receptores nicotínicos α 4 β 2	5

Tabla 1. Grupos experimentales de trabajo. Se muestran los fármacos empleados en cada uno de ellos y el total de células registradas.

Efecto de la nicotina sobre la frecuencia de las EPSCs en neuronas del RMTg

En un primer grupo experimental se probó el efecto de la nicotina (1 μ M) sobre las corrientes postsinápticas excitatorias glutamatérgicas (EPSCs) registradas en las neuronas del núcleo RMTg. En la mayoría de las neuronas registradas (15/17), la nicotina produjo un incremento significativo en la frecuencia de las EPSCs. El efecto fue persistente, aunque reversible después del lavado de la droga (ver figura 4C). En la figura 4B, se muestran los trazos de registro de las EPSCs antes, durante y después de la aplicación de nicotina; la imagen que está insertada muestra, a un barrido más lento, un fragmento del registro de las EPSCs en presencia de nicotina

(delimitado por la caja en rojo). Se puede observar, la cinética típica de las corrientes sinápticas con una fase ascendente rápida de ≈ 1 ms y una fase de decaimiento más lenta de ≈ 12 ms. En algunos experimentos, después del lavado, se aplicó el antagonista de receptores AMPA-kainato, CNQX ($10 \mu\text{M}$). El CNQX suprimió por completo las EPSCs (ver figura 4E), sugiriendo que las EPSCs registradas en neuronas gabaérgicas del RMTg son provocadas por la estimulación glutamatérgica de los receptores AMPA/kainato. El incremento en la frecuencia de las EPSCs producido por la nicotina fue de un $174 \pm 26\%$ normalizada con respecto al control (ver imagen insertada de la figura 4C) ($p < 0.05$, $n = 17$). Como se muestra en las gráficas de fracción acumulada del intervalo inter-evento (IE) y la amplitud (figura 4D), la nicotina incrementó la frecuencia ya que produjo un desplazamiento hacia la izquierda de la curva, pero no produjo ningún cambio en la amplitud de las EPSCs.

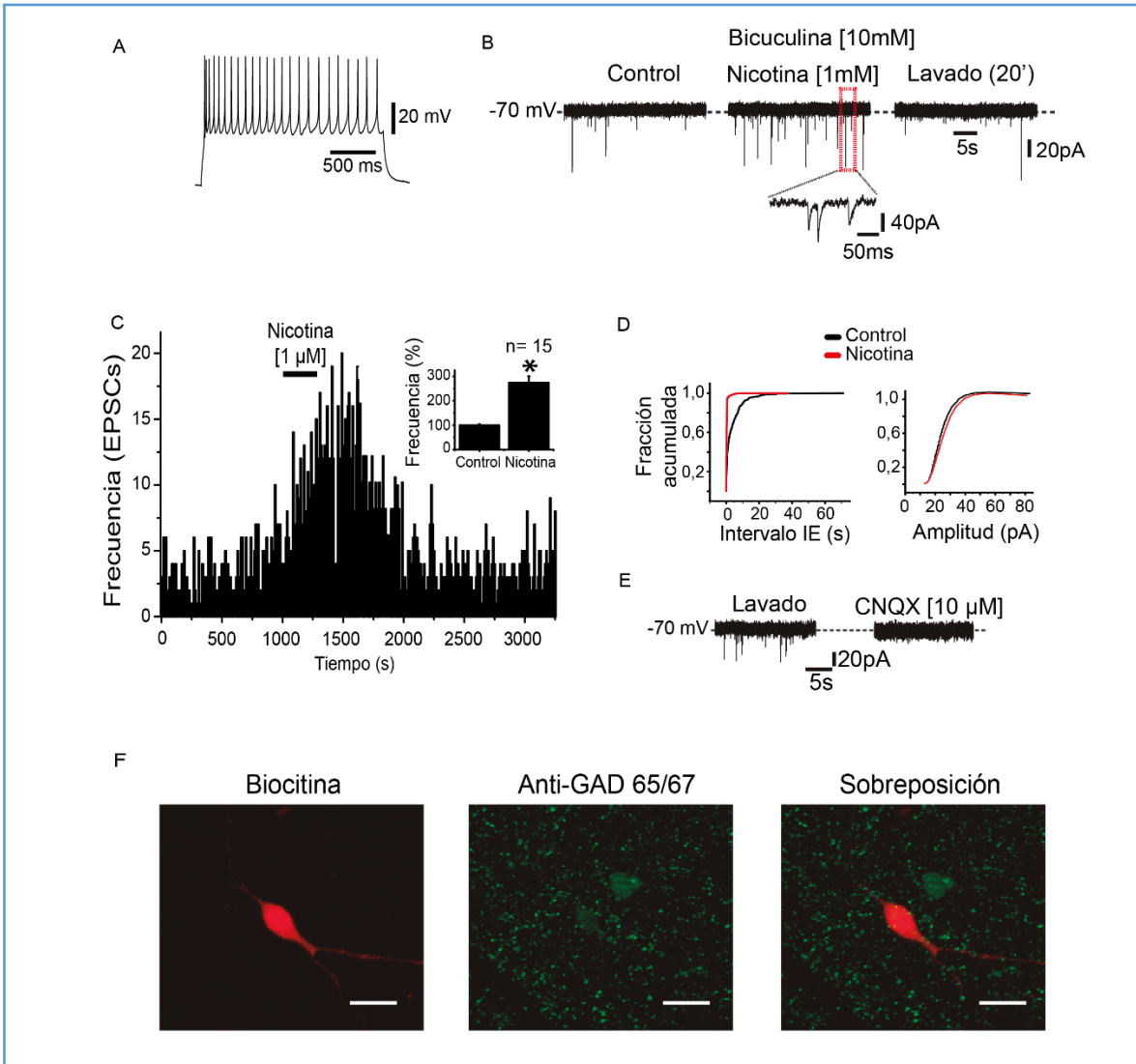


Figura 4. La nicotina aumenta la frecuencia de las corrientes postsinápticas excitatorias espontáneas (EPSCs) en neuronas gabaérgicas del RMTg. (A) Disparo típico de una neurona gabaérgica del RMTg obtenido en fijación de corriente. (B) Registros en fijación de voltaje de las EPSCs de la misma neurona en condiciones control (trazo izquierdo), tras la aplicación de nicotina (1 μ M, trazo medio) y después del lavado. (C) Histograma de frecuencias mostrando el curso temporal del efecto de la nicotina y gráfica de barras (imagen inserta) que muestra la frecuencia de las EPSCs normalizada con respecto al control (n=15). (D) Gráficas de fracción acumulada de la amplitud e intervalo interevento de las EPSCs en condiciones control (línea negra) y tras la aplicación de nicotina (línea roja). (E) Trazos que muestran, en otra célula, los efectos de la aplicación de CNQX (10 μ M) sobre las EPSCs. (G) Imágenes de inmunocitoquímica de la célula registrada. A la izquierda (en rojo) se muestra la célula registrada marcada con biocitina. En medio (verde) se muestra el marcaje con el anticuerpo anti-GAD 65/67. A la derecha, la sobreposición de ambas marcas (escala 15 μ m).

Efecto de la fisostigmina sobre la frecuencia de corrientes postsinápticas excitatorias espontáneas en neuronas del RMTg

Se registraron 5 células a las cuales se aplicó fisostigmina (10 μ M), un inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa, que favorece la persistencia de la acetilcolina endógena en el espacio sináptico. Todos los experimentos se hicieron en presencia de atropina (10 μ M) para evitar una posible estimulación de receptores muscarínicos. En 4/5 células la fisostigmina mimetizó el efecto de la nicotina, esto es, provocó un incremento significativo con respecto al control en la frecuencia de EPSCs (81 \pm 5%). A semejanza de la nicotina, el efecto fue reversible, pero persistió por al menos 15 minutos después del lavado de la droga (ver figura 5B). Al igual que la nicotina, la fisostigmina produjo un incremento en la frecuencia, pero no en amplitud de las EPSCs (Fig. 5C).

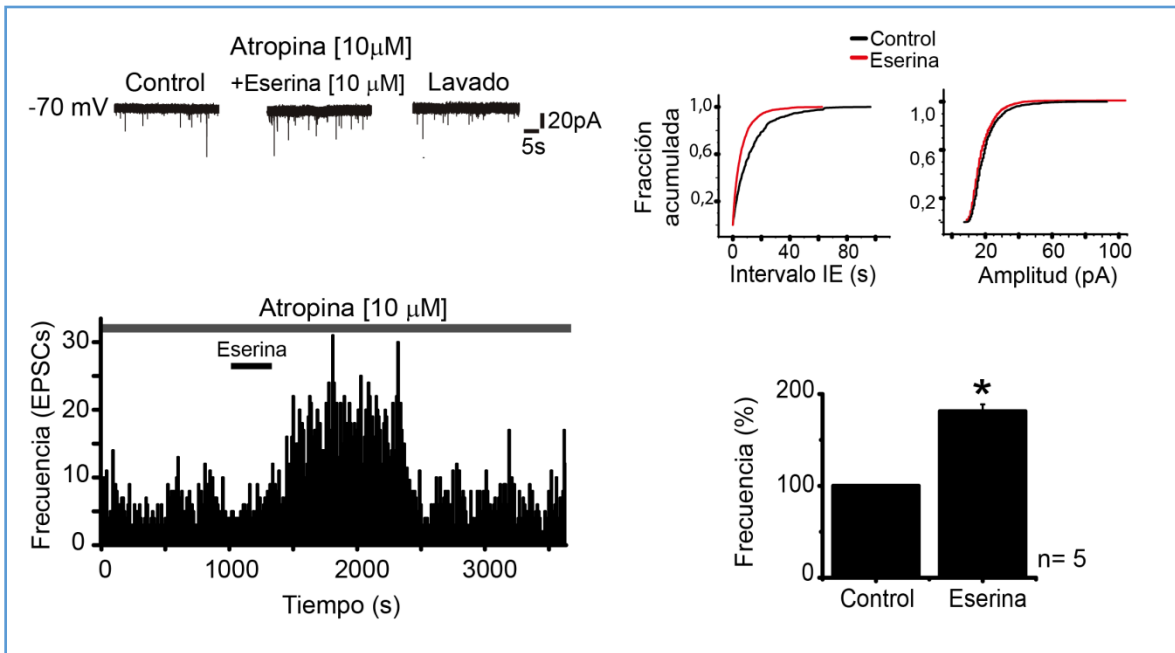


Figura 5. La fisostigmina (eserina) mimetiza el efecto de la nicotina sobre las EPSCs en neuronas gabaérgicas del RMTg. (A) Registros, en fijación de voltaje, de las EPSCs de una neurona en condiciones control (trazo izquierdo), tras la aplicación de fisostigmina (10 μ M, trazo medio) y lavado. Los experimentos se hicieron en presencia atropina (10 μ M) para aislar el componente muscarínico. (B) Histograma de frecuencia mostrando del curso temporal de la aplicación de fisostigmina de un registro obtenido a un potencial de mantenimiento de -70 mV. (C) Gráficas de fracción acumulada de la amplitud e intervalo inter-evento de las EPSCs en condiciones control (línea negra) y tras la aplicación de fisostigmina (línea roja). (D) Gráfica de barras mostrando la frecuencia normalizada de las EPSCs condiciones control y en presencia de fisostigmina (n= 5, p<0.05).

Efecto de la nicotina en presencia de TTX

Con el fin de investigar si el efecto de la nicotina sobre la frecuencia de las EPSCs glutamatérgicas depende del disparo de potenciales de acción, se realizaron experimentos en los cuales la nicotina se administró en presencia tetrodotoxina (TTX, 500 nM) un bloqueador de los canales de sodio dependientes de voltaje. En la figura 6 se observa el efecto de nicotina en presencia de TTX en una neurona registrada. Como puede observarse, la TTX no bloqueó el incremento en la frecuencia de las EPSCs producido por nicotina (Figura 6 A-C). Sin embargo, el

incremento producido por nicotina en presencia de TTX ($77 \pm 5\%$, $n=4$) fue menor al observado cuando se administra nicotina sola. Cabe señalar que la aplicación de TTX por si sola produjo un decremento en la frecuencia de las EPSCs de $\approx 17\%$ (no mostrado). Como se observa en la figura 6A, también en presencia de TTX el efecto de la nicotina fue persistente.

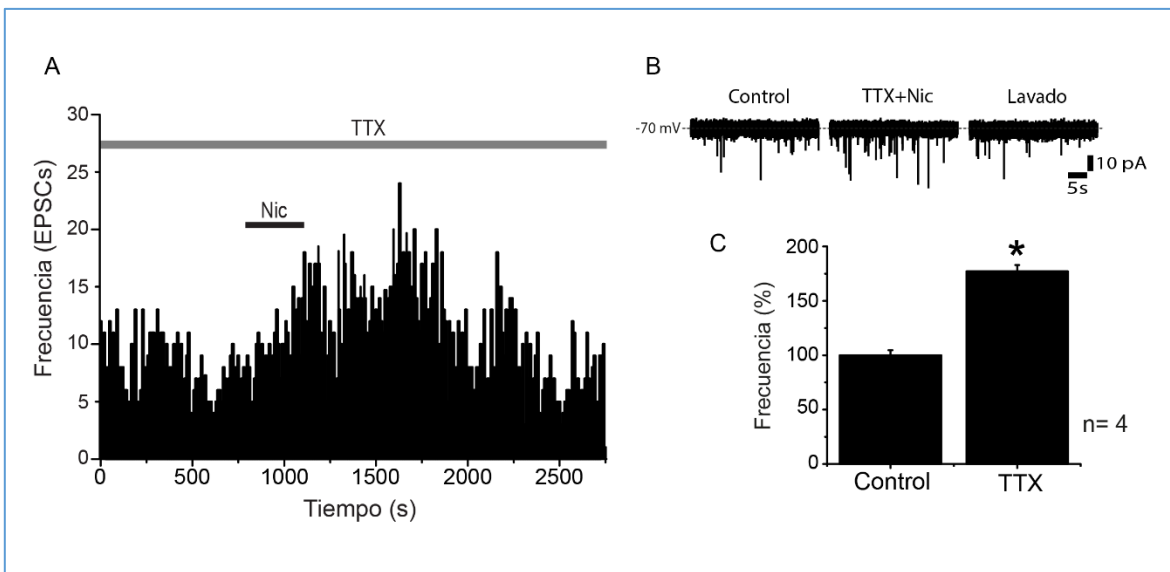


Figura 6. Tetrodotoxina no bloquea el efecto de la nicotina sobre las EPSCs en neuronas gabaérgicas del RMTg. (A) Histograma de frecuencia que muestra del curso temporal del efecto de la nicotina en presencia de 500nM de TTX. Se observa que la frecuencia de las EPSCs aumenta tras la aplicación de 1 μ M de nicotina. (B) Trazos del registro de las EPSCs en fijación de voltaje en condiciones control (izquierda), tras la aplicación de nicotina (medio) y lavado. (C) Gráfica de barras que compara la frecuencia de EPSCs normalizada en condiciones control (sólo TTX) y con nicotina en presencia de TTX (TTX+Nic) ($n=4$, $p<0.05$).

Efecto de metilcaconitina, un antagonista selectivo de receptores nicotínicos $\alpha 7$, sobre las EPSCs en neuronas del RMTg

A fin de determinar el subtipo de receptor involucrado en el efecto de la nicotina, ésta se administró en presencia de antagonistas selectivos de los receptores nicotínicos. Primeramente, se utilizó un grupo experimental (MLA+Nic, n=6, ver tabla 1) en el cual la nicotina se aplicó en presencia de metilcaconitina (MLA, 100nM) un antagonista selectivo de los receptores nicotínicos tipo $\alpha 7$. Se observó que al aplicar nicotina en presencia de MLA no hubo variación en la frecuencia de las EPSCs (figura 7 A-C, n=6) por lo que este antagonista bloquea por completo el efecto de la nicotina en neuronas del RMTg. Estos primeros resultados sugieren que el efecto de nicotina sobre neuronas del RMTg está mediado a través de receptores colinérgicos nicotínicos $\alpha 7$.

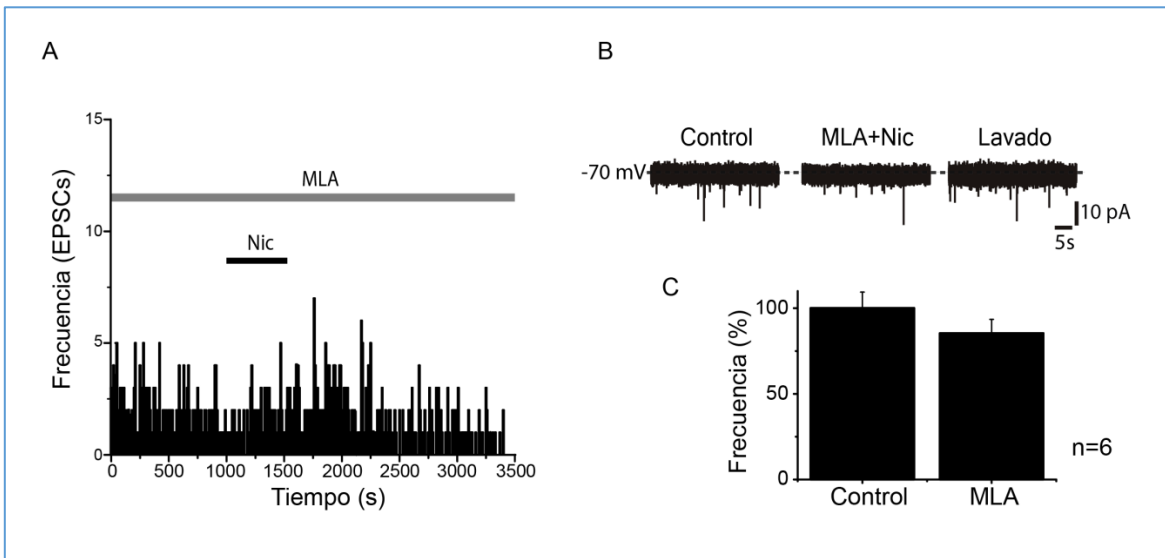


Figura 7. El efecto de la nicotina sobre las EPSCs en neuronas gabaérgicas del RMTg es bloqueado por MLA. (A) Histograma de frecuencia que ilustra el curso temporal de la aplicación de nicotina en presencia de MLA. La frecuencia de EPSCs no cambia significativamente tras la aplicación de $1 \mu\text{M}$ de nicotina. (B) Trazos de las EPSCs del registro en fijación de voltaje en condiciones control (trazo izquierdo), tras la aplicación de nicotina en presencia de MLA (trazo medio) y lavado. (C) Gráfica de barras que muestra la frecuencia normalizada de las EPSCs en condiciones control (sólo MLA) y con nicotina en presencia de MLA (MLA+Nic) ($n=6$, $p>0.05$).

DH β E, un antagonista de receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$, no bloquea el efecto de la nicotina sobre las EPSCs de neuronas del RMTg

Posteriormente, se utilizó otro grupo experimental (DH β E+Nic, $n=5$, ver tabla 1) en el cual la nicotina se administró en presencia de dihidro- β -eritroidina (DH β E, 100nM) antagonista selectivo de los receptores nicotínicos tipo $\alpha 4\beta 2$. En la figura 8, se muestra un experimento en el cual la nicotina se administró en presencia de DH β E. Como puede observarse, aún en presencia del antagonista, la nicotina incrementó la frecuencia de las EPSCs. El incremento causado por la nicotina fue de $(149 \pm 12\%$, $n=5)$. Estos datos sugieren que la modulación de la liberación de glutamato por nicotina no está mediada por receptores nicotínicos tipo $\alpha 4\beta 2$.

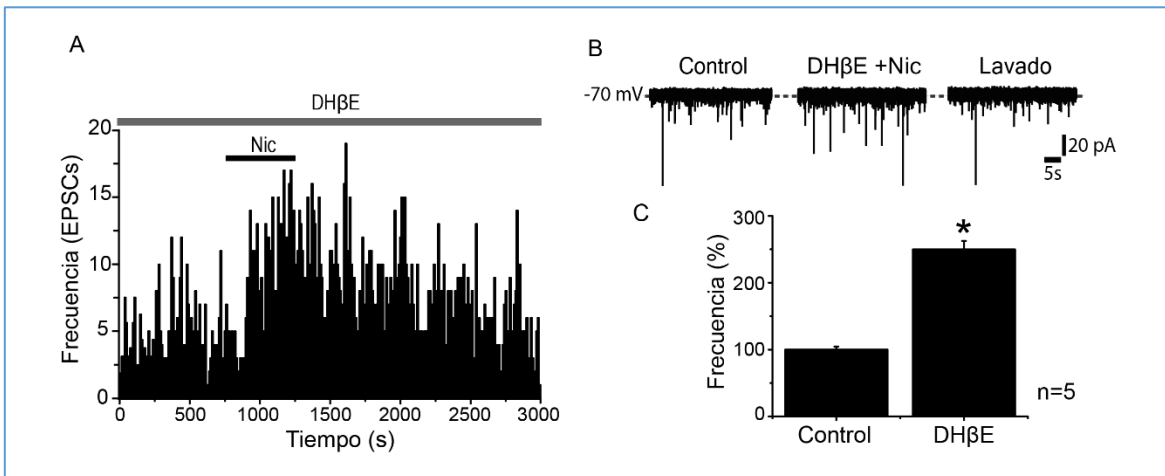


Figura 8. La dihidro-beta-eritroidina (DH β E) no bloquea el efecto de la nicotina sobre las EPSCs en las neuronas gabaérgicas del RMTg. (A) Histograma de frecuencia mostrando el curso temporal del efecto de la nicotina en presencia de DH β E. Se observa que la frecuencia de las EPSCs aumenta tras la aplicación de 1 μ M de nicotina. (B) Trazos que muestran el registro de las EPSCs en fijación de voltaje en condiciones control (trazo izquierdo), tras la aplicación de nicotina en presencia de DH β E (trazo medio) y lavado. (C) Gráfica de barras de la frecuencia normalizada que compara el control (sólo DH β E) y después de la aplicación de nicotina en presencia de DH β E (DH β E+Nic) (n=5, p<0.05).

PNU-282987, un agonista específico de receptores α 7, aumenta la frecuencia de EPSCs en neuronas del RMTg

Para confirmar la participación de los receptores tipo α 7 en el efecto nicotínico, se utilizó un grupo experimental al cual se aplicó PNU-282987 (PNU, 100nM) un agonista selectivo de los receptores α 7. Como puede observarse en figura 9 A-C, la administración de PNU, por sí sola provocó un incremento en la frecuencia de las EPSCs glutamatérgicas. Esto es, el PNU mimetizó el efecto de la nicotina, aunque el incremento de frecuencia de las EPSCs fue menor ($69 \pm 6\%$ y $174 \pm 26\%$) para PNU y nicotina sola, respectivamente. Estos resultados apoyan la idea de que el efecto de la nicotina sobre la frecuencia de las EPSCs registrados en las neuronas gabaérgicas del RMTg es mediado a través de receptores nicotínicos α 7.

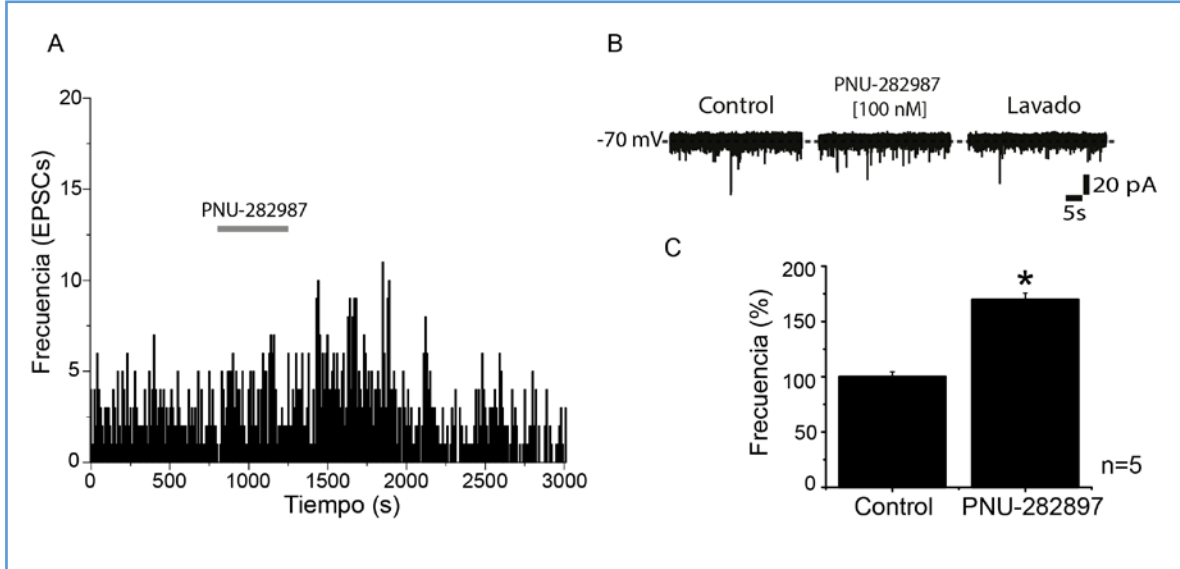


Figura 9. PNU-282987 aumenta la frecuencia de las EPSCs en neuronas gabaérgicas del RMTg. (A) Histograma de frecuencia que muestra el curso temporal del efecto del agonista $\alpha 7$. Se observa un incremento en la frecuencia de las EPSCs tras la aplicación de PNU. (B) Trazos del registro en fijación de voltaje en condiciones control (trazo izquierdo), tras la aplicación de PNU (trazo medio) y lavado. Note que tras la aplicación de PNU, las EPSCs aumentan su frecuencia y este efecto desaparece tras el lavado del fármaco. (C) Gráfica de barras que ilustra la frecuencia normalizada en condiciones control y después de la aplicación de PNU ($n=5$, $p<0.05$).

El agonista del receptor nicotínico $\alpha 4\beta 2$, RJR, no cambia la frecuencia de EPSCs en neuronas del RMTg

Por último, se probó la aplicación RJR (100nM) un agonista selectivo de los receptores $\alpha 4\beta 2$. Como puede observarse en la figura 10 A-C, la aplicación de este fármaco no produjo ningún efecto significativo sobre la frecuencia de las EPSCs glutamatérgicas registradas en las neuronas gabaérgicas del RMTg. Estos resultados son congruentes con la idea de que la liberación de glutamato por nicotina, en el núcleo RMTg no es mediada a través de receptores tipo $\alpha 4\beta 2$.

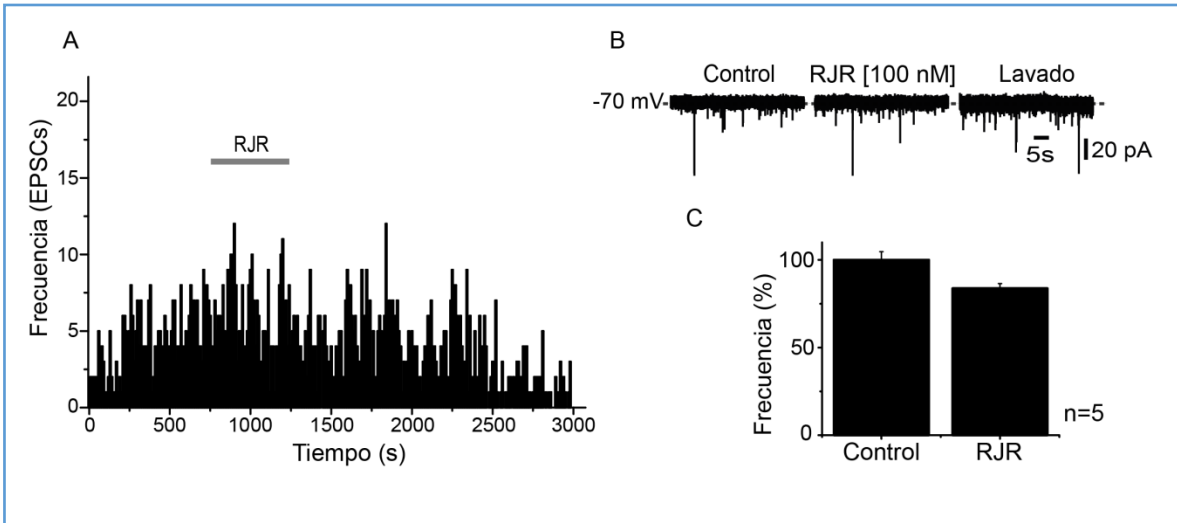


Figura 10. RJR no aumenta la frecuencia de las EPSCs en neuronas gabaérgicas del RMTg. (A) Histograma de frecuencia que muestra el curso temporal del efecto del RJR. La frecuencia de las EPSCs no cambia tras la aplicación del agonista $\alpha 4\beta 2$. (B) Trazos del registro en fijación de voltaje en condiciones control (trazo izquierdo), tras la aplicación de RJR (trazo medio) y lavado. Note que durante la aplicación de RJR y tras el lavado del fármaco, la frecuencia de las EPSCs se mantiene sin cambios significativos. (C) Gráfica de barras que muestra la frecuencia normalizada en condiciones control y después de aplicar RJR (n=5, p<0.05).

DISCUSIÓN

La principal aportación del presente trabajo consistió en el hallazgo que la activación del receptor nicotínico tipo $\alpha 7$ modula la liberación espontánea de glutamato en el núcleo RMTg. La administración de nicotina provocó aumento de la frecuencia de las corrientes espontáneas (EPSCs) en las neuronas gabaérgicas del núcleo RMTg, lo cual implica un incremento de la excitabilidad de estas células, que puede traducirse en un aumento de la liberación de GABA en las áreas de proyección de estas neuronas, como el VTA. Estos datos concuerdan con los hallazgos de Lecca *et al.* (2011), quienes encontraron que la nicotina incrementa la frecuencia de disparo en neuronas presuntamente gabaérgicas del núcleo RMTg. Sin embargo, en nuestro estudio la naturaleza gabaérgica de las neuronas del núcleo RMTg se determinó primeramente por sus características electrofisiológicas que resultaron indistinguibles de las reportadas en células gabaérgicas de la sustancia nigra reticulata. Esto es, tienen una frecuencia promedio de disparo de $\approx 17-30$ Hz y un potencial de acción de breve duración ≈ 1 ms (Gulley *et al.*, 1999; Zhou y Lee, 2011). Adicionalmente, en este trabajo se utilizaron técnicas inmunocitoquímicas para determinar la identidad gabaérgica de las células registradas utilizando un anticuerpo contra la enzima GAD 65/67. La naturaleza glutamatérgica de las EPSCs registradas en las neuronas gabaérgicas se comprobó con la observación que la administración de CNQX, un antagonista de los receptores glutamatérgicos AMPA/KA, suprimió por completo dichas corrientes (ver figura 4). El efecto de la

nicotina fue persistente, pues se mantuvo por al menos 15 minutos después de suspender la aplicación del fármaco.

Efecto colinérgico tónico sobre el núcleo RMTg

El efecto de la administración de fisostigmina, un inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa, que favorece la persistencia de la acetilcolina endógena, fue similar al de la nicotina. Esta observación se hizo en presencia de atropina, un bloqueador de los receptores muscarínicos. Este resultado sugiere que hay un tono colinérgico funcional dentro del núcleo RMTg el cual estaría activando a los receptores colinérgicos de tipo nicotínico y estaría controlado por la enzima acetilcolinesterasa. Esto además, es congruente con estudios anatómicos que reportan aferentes al RMTg con origen en los núcleos tegmental laterodorsal y tegmental pedúnculo pontino (Barrot *et al.*, 2012; Bourdy y Barrot, 2012) los cuales contienen neuronas colinérgicas (Woolf y Butcher, 1989).

Determinación del efecto presináptico de la nicotina

La observación que tanto la nicotina como la fisostigmina incrementaron la frecuencia de las EPSCs sin producir cambios en la amplitud de las mismas, indica que el efecto nicotínico sobre la liberación de glutamato en el núcleo RMTg es mediado por un mecanismo presináptico, esto es, a través de receptores localizados en las terminales glutamatérgicas (Garduño *et al.*, 2012). Si el efecto de la nicotina fuese postsináptico, es decir, por activación de receptores o conductancias presentes en las propias neuronas gabaérgicas, ello implicaría un cambio en la

resistencia de entrada de estas neuronas, lo cual necesariamente provocaría un cambio en la amplitud de las EPSCs. Asimismo, los resultados expuestos demuestran que el efecto de la nicotina no depende del disparo de potenciales de acción por parte de las neuronas glutamatérgicas que proyectan al núcleo RMTg. Sin embargo, en presencia de TTX, se observó que el efecto de la nicotina fue mucho menor al compararlo con el de la nicotina sola (Figuras 4 y 6). Esto sugiere que hay una liberación sostenida de glutamato, probablemente debida al disparo tónico de potenciales de acción de las células glutamatérgicas que proyectan al núcleo RMTg que facilita la acción nicotínica sobre la liberación del transmisor. Esta idea es reforzada por el hecho que la TTX por sí sola decrementó la frecuencia de las EPSCs. Pero dado que la aplicación de TTX no bloquea el incremento nicotínico de las EPSCs se puede sugerir que la nicotina tiene un efecto directo sobre las terminales glutamatérgicas que es independiente de potenciales de acción.

Caracterización farmacológica de la participación del receptor $\alpha 7$

Los resultados del presente trabajo concuerdan con el conocimiento establecido que los receptores nicotínicos en encéfalo se encuentran, en su mayoría, localizados en terminales presinápticas donde regulan la liberación de diversos neurotransmisores (Wonnacott, 1997; Sher *et al.*, 2004; Jensen *et al.*, 2005). Uno de los efectos presinápticos más comunes de la nicotina es precisamente modular la liberación de glutamato y esta modulación es frecuentemente mediada a través de receptores $\alpha 7$. Esto ha sido observado, por ejemplo, en la corteza prefrontal (Wang *et al.*, 2006; Konradsson-Geuken *et al.*, 2009), el hipocampo (Maggi *et al.*,

2003; Sharma y Vijayaraghavan, 2003; Maggi *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2008; Bancila *et al.*, 2009), el área ventral tegmental (Mansvelder y McGehee, 2000; Schilström *et al.*, 2000) y la habénula medial (McGehee, 1995; Girod y Role, 2001). Sin embargo, en algunas otras áreas, también se ha reportado modulación de la liberación de glutamato por receptores tipo $\alpha 4\beta 2$ (Gioanni *et al.*, 1999; Lambe *et al.*, 2003; Rousseau *et al.*, 2005; Couey *et al.*, 2007; Garduño *et al.*, 2012). Por tal motivo, para este trabajo de tesis se probaron agonistas y antagonistas selectivos de ambos tipos de receptores nicotínicos.

El antagonista selectivo de los receptores tipo $\alpha 7$ bloqueó el incremento de las EPSCs provocado por la nicotina, mientras que el agonista selectivo PNU-282987 mimetizó dicho efecto (ver figura 9). El efecto de PNU fue menor al evocado por la nicotina, pero debe tenerse en cuenta que se utilizaron concentraciones muy bajas del agonista (del orden nanomolar) para estos experimentos. Esto se hizo debido a que a concentraciones más altas el agonista pierde selectividad. Por otra parte, el agonista selectivo de los receptores $\alpha 4\beta 2$, RJR, no tuvo ningún efecto sobre las EPSCs. Asimismo, el antagonista de estos receptores no bloqueó el efecto nicotínico. Tomados juntos, todos estos datos sugieren que la nicotina activa receptores del tipo $\alpha 7$ localizados en las terminales glutamatérgicas dentro de núcleo RMTg, incrementando la liberación de glutamato y la excitabilidad de las neuronas gabaérgicas en este núcleo.

Los receptores nicotínicos y el papel regulador del calcio

Puesto que la entrada de calcio en las terminales juega un papel central en la eficiencia sináptica, es importante señalar que los receptores nicotínicos tipo $\alpha 7$ tienen mayor permeabilidad al calcio que los $\alpha 4\beta 2$ (Albuquerque *et al.*, 2009). Estudios previos han demostrado que la facilitación de la liberación de neurotransmisores ejercida por la nicotina a través de receptores $\alpha 4\beta 2$ requiere de la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje (VDCC), lo que no es indispensable en el caso de los receptores nicotínicos $\alpha 7$. En el caso de los receptores $\alpha 4\beta 2$, la entrada de calcio a través del canal nicotínico produce una despolarización de la terminal presináptica que provoca la activación de los VDCC. A su vez, el influjo de calcio a través de estos canales promueve la liberación de calcio inducida por calcio (CICR) de las pozas intracelulares (retículo endoplásmico), resultando en una potenciación de la eficiencia sináptica (Tsuneki *et al.*, 2000; Shoop *et al.*, 2001; Dajas-Bailador *et al.*, 2002; Dickinson *et al.*, 2008; Garduño *et al.*, 2012). En cambio, en la liberación de glutamato por activación de los receptores tipo $\alpha 7$, la cantidad de calcio que entra a través de este canal nicotínico es suficiente para producir CICR y facilitar la liberación del neurotransmisor sin la participación de los VDCC (Gray *et al.*, 1996; Sharma y Vijayaraghavan, 2003; Sharma *et al.*, 2008). Los hallazgos de este trabajo, permiten suponer que es este último, el mecanismo responsable del incremento en la liberación de glutamato inducido por nicotina en el núcleo RMTg, toda vez que,

como se demostró, el receptor nicotínico tipo $\alpha 7$ es el que está involucrado en este efecto.

Implicaciones Fisiológicas

Como ya se mencionó, el núcleo RMTg tiene proyecciones gabaérgicas profusas hacia las neuronas dopaminérgicas del VTA por lo cual actúa como un “freno” de estos sistemas dopaminérgicos. Uno de los hallazgos más importantes de este trabajo es que la acetilcolina endógena está ejerciendo un tono excitatorio constante sobre las neuronas gabaérgicas del núcleo RMTg mediante la liberación de glutamato. Esto implica que el núcleo RMTg está inhibiendo de manera sostenida a las neuronas del VTA. De acuerdo con esto, se ha observado que la inhibición de la actividad de las neuronas del núcleo RMTg con muscimol, un agonista de los receptores GABA_A, aumenta la actividad espontánea de las neuronas dopaminérgicas del VTA y la SNc (Jalabert *et al.*, 2011). En condiciones fisiológicas normales, el RMTg estaría ajustando la frecuencia y el patrón de disparo de las neuronas dopaminérgicas para regular estados motivacionales opuestos de reforzamiento y aversión que, a su vez, controlan conductas adaptativas. En presencia de nicotina, por ejemplo en fumadores, los receptores tipo $\alpha 7$ localizados en las terminales glutamatérgicas serían sobreestimulados, ya que estos receptores poseen alta afinidad por la nicotina y ésta no es degradada por la enzima acetilcolinesterasa como ocurre con la acetilcolina. La sobreactivación de los receptores $\alpha 7$ produciría un incremento en la liberación de glutamato en el núcleo RMTg. Cabe señalar que la concentración de 1 μ M de nicotina utilizada en este

estudio, es muy cercana a la reportada en el plasma de fumadores 20 minutos después de consumir un cigarro (Dani y Heinemann, 1996). El presente trabajo mostró que el efecto de la nicotina es persistente pues perdura por al menos 15 minutos después de haber retirado la droga. Más aún, aunque la nicotina produce una rápida desensibilización de los receptores (Wooltorton *et al.*, 2003) el efecto potenciador sobre la liberación de glutamato se mantiene, lo cual indica que los cambios en la maquinaria de liberación y el incremento de la eficiencia sináptica producidos por la nicotina, persisten aún después de la desensibilización de los receptores. Al aumentar de manera persistente la liberación de glutamato, la nicotina estaría incrementando la excitabilidad y la tasa de disparo de las neuronas gabaérgicas que proyectan hacia el VTA y la SNc. Esto alteraría el balance entre las entradas excitatorias e inhibitorias que modulan la actividad de los sistemas dopaminérgicos que controlan los mecanismos de reforzamiento asociados a diversas conductas adaptativas. Es bien conocido que la nicotina puede tener efectos, tanto ansiogénicos como ansiolíticos, dependiendo de diversos factores como son, el régimen de administración (p.ej., agudo o crónico), vía de administración, estado conductual de los animales de experimentación (relajación-estrés) o bien condiciones de abstinencia a la propia nicotina (Picciotto *et al.*, 2008). Los resultados del presente trabajo sugieren que las acciones nicotínicas en el núcleo RMTg tendrían un efecto ansiogénico, pues un incremento de la actividad gabaérgica en este núcleo estaría inhibiendo los sistemas dopaminérgicos de reforzamiento. En concordancia con esto, se ha reportado que la estimulación de

las aferentes glutamatérgicas al núcleo RMTg, produce conductas de aversión y de evitación ante estímulos que normalmente son inocuos (Stamatakis y Stuber, 2012). Por otra parte, estudios en fumadores han mostrado que la nicotina puede reducir la ansiedad y aliviar el estrés (Pomerleau, 1986; Gilbert *et al.*, 1989). Estas aparentes inconsistencias pueden atribuirse a la diversidad de receptores sobre los cuales actúa la nicotina en las distintas áreas del cerebro pero también, como se mencionó antes, a diversos factores como la vía y el régimen de administración de la droga. Por ejemplo, se sabe que la exposición crónica a la nicotina, produce efectos a corto y a largo plazo como desensibilización e incluso incremento en la expresión (“upregulation”) de algunos de los subtipos de receptores nicotínicos (Peng *et al.*, 1994; Kuryatov *et al.*, 2005; Dani, 2015) lo cual podría traducirse en cambios de los efectos de la nicotina sobre la conducta y los estados motivacionales.

CONCLUSIONES

1. La nicotina aumenta la liberación espontánea de glutamato en el núcleo RMTg activando receptores de tipo $\alpha 7$ pero no receptores tipo $\alpha 4\beta 2$, como lo demuestran los experimentos farmacológicos.
2. El efecto de la nicotina es presináptico ya que tanto la acetilcolina endógena como los agonistas de los receptores nicotínicos aumentan la frecuencia de las EPSCs sin modificar la amplitud de las mismas.
3. El efecto de la nicotina no depende de potenciales de acción ya que éste se sigue observando aún en presencia del bloqueador de canales de sodio, TTX. Esto sugiere que la nicotina actúa directamente modificando alguna fase del proceso de liberación a nivel de las terminales sinápticas.
4. El efecto de la nicotina en el núcleo RMTg es aumentar la excitabilidad de las neuronas gabaérgicas. El efecto excitatorio de la nicotina es mediado por un aumento en la liberación de glutamato sobre las neuronas gabaérgicas.
5. El efecto indirecto de la nicotina sobre las neuronas dopaminérgicas del VTA, mediado a través del núcleo RMTg, es inhibitorio, ya que al incrementar la actividad de las neuronas gabaérgicas, produce un incremento de la estimulación inhibitoria ejercida por éstas sobre las neuronas dopaminérgicas del VTA.

PERSPECTIVAS

Como perspectivas, sería importante para un trabajo posterior:

- Precisar el papel que juega el calcio en el efecto nicotínico, tanto el que proviene de canales de dependientes de voltaje, como el que es liberado de pozas intracelulares. Para ello podrían realizarse experimentos con cadmio o bien bloqueadores selectivos de los VDCC. Asimismo, podrían emplearse bloqueadores selectivos de los canales de calcio del retículo endoplásmico como la rianodina, el ácido ciclopiazónico etc.
- También, se podrían realizar experimentos con el quelante de calcio BAPTA, para determinar si el calcio de la célula postsináptica tiene algún papel en el efecto nicotínico.
- Observar si ocurren cambios en los efectos nicotínicos dentro del núcleo RMTg como resultado de la exposición crónica a la nicotina.
- Más aún, sería importante investigar si en los animales tratados con nicotina crónica, la suspensión en la administración de nicotina, lo cual se considera equivalente al síndrome de abstinencia en fumadores, cambia el patrón o la tasa de disparo de las neuronas del RMTg.

Esto último, combinado con experimentos conductuales estandarizados para medir la ansiedad en animales, podría ayudar a entender mejor los efectos adictivos de la nicotina.

REFERENCIAS

1. Albuquerque EX, Pereira EFR, Alkondon M, Rogers SW. 2009. Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function. *Physiol Rev*, 89(1):73–120.
2. Balcita-Pedicino JJ, Omelchenko N, Bell R, Sesack SR. 2011. The inhibitory influence of the lateral habenula on midbrain dopamine cells: Ultrastructural evidence for indirect mediation via the rostromedial mesopontine tegmental nucleus. *J Comp Neurol*, 519 (6):1143-64.
3. Bancila V, Cordeiro JM, Bloc A, Dunant Y. 2009. Nicotine-induced and depolarisation-induced glutamate release from hippocampus mossy fibre synaptosomes: Two distinct mechanisms. *J Neurochem*, 110(2):570-80.
4. Barrot M, Sesack SR, Georges F, Pistis M, Hong S, Jhou TC. 2012. Braking Dopamine Systems: A New GABA Master Structure for Mesolimbic and Nigrostriatal Functions. *Journal of Neuroscience*, 32:14094 – 14101.
5. Berridge KC. 2004. Motivation concepts in behavioral neuroscience. *Physiology Behavior*, 81:179 – 209.
6. Bourdy R, Barrot M. 2012. A new control for dopaminergic systems: Pulling the VTA by the tail. *Trends Neurosci. Advance*, 35:681 – 690.
7. Breese CR, Adams C, Logel J, Drebing C, Rollins Y, Barnhart M, Sullivan B, Demasters BK, Freedman R, Leonard S. 1997. Comparison of the regional expression of nicotinic acetylcholine receptor alpha7 mRNA and [125I]-alpha-bungarotoxin binding in human postmortem brain. *J Comp Neurol*, 387: 385–398.
8. Brinschwitz K, Dittgen a, Madai V, Lommel R, Geisler S, Veh R. 2010. Glutamatergic axons from the lateral habenula mainly terminate on GABAergic neurons of the ventral midbrain. *Neuroscience*, 168(2):463-476.
9. Brischoux F, Chakraborty S, Brierley DI, Ungless MA. 2009. Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(12):4894 – 4899.
10. Broide RS, O'Connor LT, Smith MA, Smith JA, Leslie FM. 1995. Developmental expression of alpha 7 neuronal nicotinic receptor messenger RNA in rat sensory cortex and thalamus. *Neuroscience*, 67(1):83-94.
11. Changeux JP, Bertrand D, Corringer PJ, Dehaene S, Edelstein S, Léna C, Le Novère N, Marubio L, Picciotto M, Zoli M. 1998. Brain nicotinic receptors: Structure and regulation, role in learning and reinforcement. *Brain Res Rev*, 26:198–216.
12. Changeux JP, Galzi JL, Devillers-Thiéry A, Bertrand D. 1992. The functional architecture of the acetylcholine nicotinic receptor explored by affinity labelling and site-directed mutagenesis. *Q Rev Biophys*, 25:395–432.
13. Cooper JR, Bloom FE, Roth, RH. Ch 8: Amino acid transmitters, “Glutamic acid” in “The Biochemical Basis of Neuropharmacology”, 8th ed. Oxford University Press:USA. 132 – 148.
14. Couey JJ, Meredith RM, Spijker S, Poorthuis RB, Smit AB, Brussaard AB, Mansvelder HD. 2007. Distributed network actions by nicotine increase the threshold for spike-timing-dependent plasticity in prefrontal cortex. *Neuron*, 54:73–87.

15. Dajas-Bailador FA, Mogg AJ, Wonnacott S. 2002. 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.
16. Dani JA. 2015. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor structure and function and response to nicotine. *Int Rev Neurobiol*, 124:3-19.
17. Dani, JA, Heinemann S. 1996. Molecular and cellular aspects of nicotine abuse. *Neuron*, 16, 905–908.
18. Dani JA, Bertrand D. 2007. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47:699–729.
19. Dani JA, Radcliffe KA, Pidoplichko VI. 2000. Variations in desensitization of nicotinic acetylcholine receptors from hippocampus and midbrain dopamine areas. *Eur J Pharmacol*, 393:31-38.
20. Dickinson JA, Kew JN, Wonnacott S. 2008. 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.
21. Ferreira JG, Del-Fava F, Hasue RH, Shammah-Lagnado SJ. 2008. Organization of ventral tegmental area projections to the ventral tegmental area-nigral complex in the rat. *Neuroscience*, 153:196–213.
22. Flores CM, Rogers SW, Pabreza LA, Wolfe BB, Kellar KJ. 1992. A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of alpha 4 and beta 2 subunits and is up-regulated by chronic nicotine treatment. *Molecular Pharmacology*, 41(1):31-37.
23. Freund TF, Gulyas AI. 1991. GABAergic interneurons containing calbindin D28K or somatostatin are major targets of GABAergic basal forebrain afferents in the rat neocortex. *J Comp Neurol*, 314:187–99.
24. Garduño J, Galindo-Charles L, Jiménez-Rodríguez J, Galarraga E, Tapia D, Mihailescu S, Hernandez-Lopez S. 2012. Presynaptic $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors increase glutamate release and serotonin neuron excitability in the dorsal raphe nucleus. *J Neurosci*, 32(43):15148-57.
25. Geisler S, Zahm D. 2005. Afferents of the ventral tegmental area in the rat-anatomical substratum for integrative functions. *Journal of Comparative Neurology*, 490(3):270-294.
26. Gilbert DG, Robinson JH, Chamberlin CL, Spielberger CD. 1989. Effects of smoking/nicotine on anxiety, heart rate, and lateralization of EEG during a stressful movie. *Psychophysiology*, 26:311–320.
27. Gioanni Y, Rougeot C, Clarke PB, Lepousé C, Thierry AM, Vidal C. 1999. Nicotinic receptors in the rat prefrontal cortex: Increase in glutamate release and facilitation of mediodorsal thalamo-cortical transmission. *Eur J Neurosci*, 11:18 –30.
28. Girod R, Role LW. 2001. Long-lasting enhancement of glutamatergic synaptic transmission by acetylcholine contrasts with response adaptation after exposure to low-level nicotine. *J Neurosci*, 21:5182–5190.
29. Gonçalves L, Seago C, Metzger M. 2012. Differential projections from the lateral habenula to the rostromedial tegmental nucleus and ventral tegmental area in the rat. *J Comp Neurol*, 520:1278 –1300.

30. Gotti C, Clementi F. 2004. Neuronal nicotinic receptors: From structure to pathology. *Prog Neurobiol*, 74:363 – 396.
31. Gotti C, Fornasari D, Clementi F. 1997. Human neuronal nicotinic receptors. *Prog Neurobiol*, 53:199–237.
32. Gray R, Rajan AS, Radcliffe KA, Yakehiro M, Dani JA. 1996. Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature*, 383:713–716.
33. Gulley JM, Kuwajima M, Mayhill E, Rebec GV. 1999. Behavior-related changes in the activity of substantia nigra pars reticulata neurons in freely moving rats. *Brain Research*, 845(1):68 – 76.
34. Haber S, Knutson B. 2010. The reward circuit: Linking primate anatomy and human imaging. *Neuropsychopharmacology*, 35(1):4-26.
35. Harvey SC, McIntosh JM, Cartier GE, Maddox FN, Luetje CW. 1997. Determinants of specificity for α -conotoxin MII on $\alpha 3\beta 2$ neuronal nicotinic receptors. *Mol Pharmacol*, 51:336–342.
36. Hogg RC, Raggenbass M, Bertrand D. 2003. Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 147:1–46.
37. Hökfelt T, Johansson O, Goldstein M. 1984. Chemical anatomy of the brain. *Science*, 225(4668):1326-1334.
38. Holstege G. 1992. The emotional motor system. *Eur J Morphol*. 30:67–79.
39. Holstege, G. 2009. The mesopontine rostromedial tegmental nucleus and the emotional motor system: role in basic survival behavior. *J Comp Neurol*, 513:559–565.
40. Hong S, Jhou T, Smith M, Saleem K, Hikosaka O. 2011. Negative reward signals from the lateral habenula to dopamine neurons are mediated by rostromedial tegmental nucleus in primates. *Journal of neuroscience*, 31(32):11457-11471.
41. Jalabert M, Bourdy R, Courtin J, Veinante P, Manzoni OJ, Barrot M, et al. 2011. Neuronal circuits underlying acute morphine action on dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108:16446–16450.
42. Jensen AA, Frølund B, Liljefors T, Krogsgaard-Larsen P. 2005. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: Structural revelations, target identifications, and therapeutic inspirations. *J Med Chem*, 48:4705–4745.
43. Jhou TC. 2005. Neural mechanisms of freezing and passive aversive behaviors. *J Comp Neurol*, 493:111–114.
44. Jhou TC, Fields HL, Baxter MG, Saper CB, Holland PC. 2009a. The rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a GABAergic afferent to midbrain dopamine neurons, encodes aversive stimuli and inhibits motor responses. *Neuron*, 61:786 – 800.
45. Jhou TC, Geisler S, Marinelli M, Degarmo BA, Zahm DS. 2009b. The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: a structure targeted by the lateral habenula that projects to the ventral tegmental area of Tsai and substantia nigra compacta. *J Comp Neurol*, 513:566 –596.
46. Jhou TC, Xu SP, Lee MR, Gallen CL, Ikemoto S. 2012. Mapping of reinforcing and analgesic effects of the mu opioid agonist endomorphin-1 in the ventral midbrain of the rat. *Psychopharmacology (Berl)*, 224(2):303-12.
47. Kaufling J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier MJ, Barrot M. 2009. Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat. *J Comp Neurol*, 513:597– 621.

48. Kaufling J, Veinante P, Pawlowski SA, Freund-Mercier MJ, Barrot M. 2010. Gamma-aminobutyric acid cells with cocaine-induced DeltaFosB in the ventral tegmental area innervate mesolimbic neurons. *Biol Psychiat*, 67:88 – 92.
49. Kaufling J, Waltisperger E, Bourdy R, Valera A, Veinante P, Freund-Mercier MJ, Barrot M. 2010. Pharmacological recruitment of the GABAergic tail of the ventral tegmental area by acute drug exposure. *Br J Pharmacol*, 161:1677–1691.
50. Kleppner SR, Tobin AJ. 2002. GABA. In Ramachandran VS (editor-in-chief), *Encyclopedia of the human brain*. Vol. 2. 353 – 367. San Diego, California: Academic, c2002.
51. Konradsson-Geuken Å, Gash CR, Alexander K, Pomerleau F, Huettl P, Gerhardt GA, Bruno JP. 2009. Second-By-Second Analysis of Alpha 7 Nicotine Receptor Regulation of Glutamate Release in the Prefrontal Cortex of Awake Rats. *Synapse*, 63(12): 1069–1082.
52. Kuryatov A, Luo J, Cooper J, Lindstrom J. 2005. Nicotine acts as a pharmacological chaperone to up-regulate human $\alpha 4\beta 2$ acetylcholine receptors. *Mol. Pharmacol*, 68:1839–1851.
53. Lambe EK, Picciotto MR, Aghajanian GK. 2003. Nicotine induces glutamate release from thalamocortical terminals in prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*, 28:216 –225.
54. Lavezzi HN, Zahm DS. 2011. The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: an integrative modulator of the reward system. *Basal Ganglia*, 1(4): 191–200.
55. Lecca S, Melis M, Luchicchi A, Ennas M, Castelli M, Muntoni A, Pistis M. 2011. Effects of drugs of abuse on putative rostromedial tegmental neurons, inhibitory afferents to midbrain dopamine cells. *Neuropsychopharmacology*, 36 (3):589-602.
56. Lecca S, Melis M, Luchicchi A, Muntoni AL, Pistis M. 2012. Inhibitory inputs from rostromedial tegmental neurons regulate spontaneous activity of midbrain dopamine cells and their responses to drugs of abuse. *Neuropsychopharmacology*, 37(5):1164-76.
57. Lindstrom J, Anand R, Gerzanich V, Peng X, Wang F, Wells G. 1996. Structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Prog Brain Res*, 109:125–137.
58. Luetje CW, Patrick J. 1991. Both α - and β -subunits contribute to the agonist sensitivity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci*, 11:837–845.
59. Machaalani R, Kashi PK, Waters KA. 2010. Distribution of nicotinic acetylcholine receptor subunits $\alpha 7$ and $\beta 2$ in the human brainstem and hippocampal formation. *J Chem Neuroanat*, 40(3):223-31.
60. Maggi L, Le Magueresse C, Changeux JP, Cherubini E. 2003. Nicotine activates immature “silent” connections in the developing hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(4):2059–2064.
61. Maggi L, Sola E, Minneci F, Le Magueresse C, Changeux JP, Cherubini E. 2004. Persistent decrease in synaptic efficacy induced by nicotine at Schaffer collateral-CA1 synapses in the immature rat hippocampus. *J Physiol*, 559:863– 874.
62. Mansvelder HD, McGehee DS. 2000. Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. *Neuron*, 27:349–357.
63. Matsui a, Williams J. 2011. Opioid-Sensitive GABA Inputs from Rostromedial Tegmental Nucleus Synapse onto Midbrain Dopamine Neurons. *Journal of Neuroscience*, 31 (48):17729-17735.

64. McGehee DS, Heath MJ, Gelber S, Devay P, Role LW. 1995. Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors. *Science*, 269:1692–1696.
65. Miao H, Liu C, Bishop K, Gong ZH, Nordberg A, Zhang X. 1998. Nicotine Exposure During a Critical Period of Development Leads to Persistent Changes in Nicotinic Acetylcholine Receptors of Adult Rat Brain. *J Neurochem*, 70:752–762.
66. Miralles CP, Li M, Mehta AK, Khan ZU, De Blas AL. 1999. Immunocytochemical localization of the $\beta 3$ subunit of the GABAA receptor in the rat brain. *J Comp Neurol*, 413:535–548.
67. Nestler E, Carlezon W. 2006. The Mesolimbic Dopamine Reward Circuit in Depression. *Biological Psychiatry*, 59 (12):1151-1159.
68. Olsen RW, Li Guo-Dong. 2012. Ch. 18: GABA, in “Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology”, 8th ed. Elsevier. 367 – 376.
69. Olson VG, Nestler EJ. 2007. Topographical organization of GABAergic neurons within the ventral tegmental area of the rat. *Synapse*, 61(2):87-95.
70. [OMS] Organización Mundial de la Salud. 2015. *Informe global OMS sobre la epidemia mundial de tabaquismo, 2015 – Aumentar los impuestos al tabaco*. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/181425/1/WHO_NMH_PND_15.5_spa.pdf?ua=1&ua=1 [consulta: 20 abr 2016]
71. Peng X, Anand R, Whiting P, Lindstrom J. 1994. Nicotine-induced upregulation of neuronal nicotinic receptors results from a decrease in the rate of turnover. *Mol Pharmacol*, 46:523–530.
72. Perrotti LI, Bolaños CA, Choi KH, Russo SJ, Edwards S, Ulery PG, Wallace DL, Self DW, Nestler EJ, Barrot M. 2005. DeltaFosB accumulates in a GABAergic cell population in the posterior tail of the ventral tegmental area after psychostimulant treatment. *Eur J Neurosci*, 21(10):2817-24.
73. Picciotto MR. 2003. Nicotine as a modulator of behavior: Beyond the inverted U. *Trends Pharmacol Sci*, 24:493–499.
74. Picciotto MR, Addy NA, Mineur YS, Brunzell DH. 2008. It is not "either/or": Activation and desensitization of nicotinic acetylcholine receptors both contribute to behaviors related to nicotine addiction and mood. *Progress in Neurobiology*, 84(4):329-342.
75. Pidoplichko V, DeBiasi M, Williams JT, Dani JA. 1997. Nicotine activates and desensitizes midbrain neurons. *Nature*, 390:401-404.
76. Pomerleau OF. 1986. Nicotine as a psychoactive drug: Anxiety and pain reduction. *Psychopharm Bull*, 22:865–869.
77. Role LW, Berg DK. 1996. Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron*, 16:1077–1085.
78. Rousseau SJ, Jones IW, Pullar IA, Wonnacott S. 2005. Presynaptic $\alpha 7$ and non- $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors modulate [3 H] D-aspartate release from rat frontal cortex in vitro. *Neuropharmacology*, 49:59–72.
79. Rowley NM, Madsen KK, Schousboe A, White H. 2012. Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. *Neurochemistry international*, 61(4):546 – 558.
80. Russo SJ, Mazei-Robison MS, Ables JL, Nestler EJ. 2009. Neurotrophic factors and structural plasticity in addiction. *Neuropharmacology*, 56 (1):73-82.

81. Russo S, Nestler E. 2013. The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(9):609-625.
82. Sanchez-Catalan M, Kaufling J, Georges F, Veinante P, Barrot M. 2014. The Antero-Posterior Heterogeneity of the Ventral Tegmental Area. *Neuroscience*, 282:198-216.
83. Saunders B, Richard J. 2011. Shedding Light on the Role of Ventral Tegmental Area Dopamine in Reward. *Journal of Neuroscience*, 31 (50):18195-18197.
84. Schilström B, Fagerquist MV, Zhang X, Hertel P, Panagis G, Nomikos GG, Svensson TH. 2000. Putative role of presynaptic $\alpha 7^*$ nicotinic receptors in nicotine stimulated increases of extracellular levels of glutamate and aspartate in the ventral tegmental area. *Synapse*, 38:375–383.
85. Schousboe A, Waagepetersen HS. 2009. Gamma-Aminobutyric Acid (GABA). In Squire LR (editor-in-chief), *Encyclopedia of neuroscience*. Vol. 4. 511 – 515. Boston, Massachusetts: Elsevier, [2009].
86. Seguela P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, Patrick JW. 1993. Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain $\alpha 7$: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci*, 13:596–604.
87. Sharma G, Grybko M, Vijayaraghavan S. 2008. Action potential-independent and nicotinic receptor-mediated concerted release of multiple quanta at hippocampal CA3–mossy fiber synapses. *J Neurosci*, 28:2563–2575.
88. Sharma G, Vijayaraghavan S. 2003. Modulation of presynaptic store calcium induces release of glutamate and postsynaptic firing. *Neuron*, 38(6):929-39.
89. Sher E, Chen Y, Sharples TJ, Broad LM, Benedetti G, Zwart R, McPhie GI, Pearson KH, Baldwinson T, De Filippi G. 2004. Physiological roles of neuronal nicotinic receptor subtypes: new insights on the nicotinic modulation of neurotransmitter release, synaptic transmission and plasticity. *Curr Top Med Chem*, 4(3):283-97.
90. Shoop RD, Chang KT, Ellisman MH, Berg DK. 2001. Synaptically driven calcium transients via nicotinic receptors on somatic spines. *J Neurosci*, 21:771–781.
91. Slotkin TA, Southard MC, Adam SJ, Cousins MM, Seidler FJ. 2004. $\alpha 7$ Nicotinic acetylcholine receptors targeted by cholinergic developmental neurotoxicants: nicotine and chlorpyrifos. *Brain Research Bulletin*, 64:227–235.
92. Stamatakis A, Stuber G. 2012. Activation of lateral habenula inputs to the ventral midbrain promotes behavioral avoidance. *Nature Neuroscience*, 15 (8):1105-1107.
93. Stauderman KA, Mahaffy LS, Akong M, Velicelebi G, Chavez-Noriega LE, Crona JH, Johnson EC, Elliott KJ, Gillespie A, Reid RT, Adams T, Harpold MM, Corey-Naeve J. 1998. Characterization of human recombinant neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit combinations $\alpha 2\beta 4$, $\alpha 3\beta 4$ and $\alpha 4\beta 4$ stably expressed in HEK293 cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 284:777–789.
94. Tsuneki H, Klink R, Léna C, Korn H, Changeux JP. 2000. Calcium mobilization elicited by two types of nicotinic acetylcholine receptors in mouse substantia nigra pars compacta. *Eur J Neurosci*, 12:2475–2485.
95. Van de Kamp JI, Collins AC. 1994. Prenatal Nicotine Alters Nicotinic Receptor Development in the Mouse Brain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 47(4):889-900.
96. Walls AB, Nilsen LH, Eyjolfsson EM, Vestergaard HT, Hansen SL, Schousboe A, Sonnewald U, Waagepetersen HS. 2010. GAD65 is essential for synthesis of GABA

- destined for tonic inhibition regulating epileptiform activity. *Journal of Neurochemistry*, 115(6):1398 – 1408.
97. Walsh J, Han M. 2014. The heterogeneity of ventral tegmental area neurons: Projection functions in a mood-related context. *Neuroscience*, 282:101-108.
 98. Wang BW, Liao WN, Chang CT, Wang SJ. 2006. Facilitation of glutamate release by nicotine involves the activation of a Ca²⁺/calmodulin signaling pathway in rat prefrontal cortex nerve terminals. *Synapse*, 59(8):491-501.
 99. Whiting P, Lindstrom J. 1986. Pharmacological properties of immuno-isolated neuronal acetylcholine receptors. *J Neurosci*, 6:3061–3069.
 100. Whiting P, Schoepfer R, Lindstrom J, Priestley T. 1991. Structural and pharmacological characterization of the major brain nicotinic acetylcholine receptor subtype stably expressed in mouse fibroblasts. *Mol Pharmacol*, 40(4):463-72.
 101. Wonnacott S. 1997. Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci*, 20:92–98.
 102. Woolf NJ, Butcher LL. 1989. Cholinergic systems in the rat brain. IV. Descending projections of the pontomesencephalic tegmentum. *Brain Res Bull*, 23:519-540.
 103. Woollorton JR, Pidoplichko VI, Broide RS, Dani JA. 2003. Differential desensitization and distribution of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in midbrain dopamine areas. *J Neurosci*, 23:3176 –3185.
 104. Wu J, Lukas RJ. 2011. Naturally-expressed nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Biochem Pharmacol*, 82:800–807.
 105. Zhao C, Eisinger B and Gammie SC. 2013. Characterization of GABAergic neurons in the mouse lateral septum: A double fluorescence in situ hybridization and immunohistochemical study using tyramide signal amplification. *PloS One*, 8(8):e73750.
 106. Zhou F-M, Lee CR. 2011. Intrinsic and integrative properties of substantia nigra pars reticulata neurons. *Neuroscience*, 198:69–94.
 107. Zoli M, Léna C, Picciotto MR, Changeux JP. 1998. Identification of four classes of brain nicotinic receptors using β 2 mutant mice. *J Neurosci*, 18:4461– 4472.