



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

EFFECTO DE LA NICOTINA SOBRE LA ACTIVIDAD
NEURONAL DEL NÚCLEO ROSTROMEDIAL
TEGMENTAL (RMTG)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN PSICOLOGÍA

P R E S E N T A :

JOSÉ ENRIQUE RAMÍREZ SÁNCHEZ

TUTOR

DR. SALVADOR LEONARDO HERNÁNDEZ LÓPEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, Cd. Mx., 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

En memoria de J.G.S.G., J.V.R. y B. Amigos increíbles...

*¿Por qué preferir un punto de vista ingenuo basado en buscar la verdad?
¿Por qué preferir un camino oculto tras un velo de obscuro desconocimiento,
habiendo tantos rescates para el "alma"?
¿Por qué construir de manera microscópica los pequeños pasos para obtener
aproximaciones increíbles?*

*La única respuesta que encuentro, por ahora es: para saber, conocer y
sobretudo para aliviar esta angustia que aún no resuelvo de donde surge, pero a
veces, muy pocas, por cierto, no me dejan dormir.*

*Ojalá que cuando los tiempos cambien; se pueda dilucidar cuál increíble es
nuestro organismo y todas las maravillas que realiza de manera humilde, ahí
sin que uno lo note. Solamente, como un accidente, de repente se crea el
pensamiento, los sentimientos, los sueños y mientras eso pasa, sí sólo si eso
pasa, ocurre la vida.*

Agradecimientos

Nunca está de más un pequeño espacio donde expresar el agradecimiento que le tengo a las personas que han socorrido de manera directa, como indirecta a este trabajo y al autor de dicha tesis. Me sobran los recuerdos y sentimientos, pero no las palabras para plasmar todo lo que quiero decir. Aquí está una aproximación muy certera a lo que en verdad siento.

Recuerdo cuando los tiempos eran difíciles. A veces, uno pasa por problemas que lo ahogan y asfixian, donde lo único que se siente además de la tristeza y la ansiedad conjunta, es un nudo en la garganta. Sin embargo (y gracias a ustedes), el pensamiento en esas personas que a lo largo de los momentos compartidos y las consecuencias de esos encuentros, de esas aventuras, lo rescatan; de esta manera logran aminorar esta vida tan dura, pero tan real. Cada uno de ustedes conforman un pedazo en este vitral que en conjunto denomino como mi corazón. Y creanme que aún cuando ustedes se sientan también en una situación similar o piensen en la ilusión de que todo está mal, tengan por seguro que pueden contar con alguien que los estima y daría mucho por ustedes, el mismo que piensa día con día, amancer tras amanecer, que ustedes son las mejores y más grandiosas personas del mundo.

Lo único que tengo por ahora de testimonio es este trabajo de unos cuantos años, que más allá de ser simples experimentos, conllevan muchas cosas. Por ejemplo, el esfuerzo de dejar a un lado algunos caminos fáciles y vacíos, aplazar momentos únicos y dejar atrás oportunidades importantes con seres queridos. Ésta es mi formación como investigador, siguiendo aquel sueño de un niño deseoso de ser espía, me moría por encontrar verdades. Ahora me doy cuenta que voy por buen camino y cual bello es esculpir poco a poco la respuesta a una pregunta.

Dos cuestiones que continuamente se atraviesan en mi pensamiento son: ¿Qué hace que una persona tome un camino y no otro? ¿Qué provoca el ser lo que soy ahora y no lo que pude haber sido?. Encontrando por resolución el entorno, ese contexto en el cual uno se desarrolla y por eso les agradezco, por estar.

A mi madre, Laura del Carmen; principalmente por tu apoyo, cariño, fortaleza, pero sobre todo, la manera tan estricta como me has educado. Me mostraste que la verdad no tiene puntos medios; es todo o nada. Y además, que la vida no es fácil, los problemas no se solucionan únicamente con sentirse mal, necesitan resolverse y seguir adelante teniendo en mente a las personas que son queridas y amadas. Además de nunca dejar de soñar. Gracias.

A mi tío, Víctor. Por tu sinceridad; me has mostrado lo que es una verdadera amistad. Sembraste en mi, desde niño, una cultura y un conocimiento que nadie podrá arrebatarme. Por tus consejos en los momentos mas difíciles y ser lo más cercano a un ejemplo para mí. Tocaste mi corazón y cambiaste mi destino.

A mi padre; Enrique; por tu esfuerzo y apoyo, velando por salir adelante, sin importar cuanto cueste, ni cuantos sacrificios se necesiten.

A mi tía Guadalupe y mi tío Juan Manuel; por su cariño, paciencia y preocupación.

A Lorena y Rocío; por escuchar y querer incondicionalmente, buscando en todas las ocasiones nuestro bienestar. Gracias por ayudarme en tantos problemas, dándome un consejo preciso, sensible y empático. Han creído en mí y en el camino que tomé; siempre serán como unas hermanas para mí.

A mi más viejo amigo, Aldo Vázquez, su hermana, Valeria, y su madre Rocío Valerio. Por brindarme en tiempos complicados, un hogar donde impera la comprensión, el apoyo, la confianza y la paciencia. Gracias por enseñarme una de las profesiones más bonitas que siempre ejerceré, la panadería; siempre les estaré en deuda.

A Marcos Olvera, Kevin Argáez y Juan Manuel Santiago; por las caminatas, los juegos, las pláticas, las comidas, las fiestas, los enojos, las historias, los sustos, las bromas, los errores, las sinceridades, los consejos, las lágrimas, los malos ratos, las ilusiones y nuestros sueños, por escucharnos; apoyarnos. La Av. Insurgentes Sur siempre será nuestra testigo. Son aquellas personas con las que reíre hasta llorar... Antes de la victoria, amigos.

A mis amigas y compañeras Andrea Mondragón y Gabina Arenas, si tan sólo pudieran ver la manera más sincera y honesta de como yo las miro. Les agradezco por hacerme sentir algo que muy pocas veces he experimentado y eso es el mirarme a los ojos y creer en mí genuinamente. Agradecido por el soporte, en una de las situaciones más complicadas de mi vida. Espero sigamos creciendo y creando conocimientos y momentos juntos.

A Everardo y Paulina; desde los cafés capuccinos acompañados de panquecitos mientras platicamos sobre nuestros problemas, hasta los momentos de deshinción absoluta. Tantas alegrías y reflexiones, como aquella, donde tenemos la certeza de que la realidad nos engaña todo el tiempo y la única verdad verificable es nuestra amistad.

A Paulina Torres y Mariana Vergel; si bien el tiempo nos ha distanciado, traigo siempre presente esas aventuras, risas y preocupaciones. MEP para siempre.

A K. R.; a pesar de lo que nos depara el futuro, te agradezco por el apoyo y la escucha en tantas situaciones. Llegamos a vencer el tiempo, formando y creyendo en ese "nosotros". Tu esfuerzo siempre fué más allá de lo que nuestro vínculo nos pudo demandar. Siempre contarás conmigo.

A Sonia y Diego; gracias por todas esas aventuras y todo el apoyo en el desarrollo de este trabajo.

A los Doctores Salvador Hernández y Julieta Garduño; por su perseverancia y apoyo en mi formación tanto académica, como personal. Sobre todo, por esa confianza y paciencia ante cada locura que a veces suelo decir. Espero que los futuros proyectos también puedan traernos muchas más alegrías.

A ti Gabriela. A veces, me encuentro con la esperanza de que si existiera ese "cielo" que nos educaron a creer, el mío sería repetir ese momento donde aquellos dos niños con tantos sueños e ilusiones caminan día tras día sobre las calles de la colonia Extremadura Insurgentes, tomados de la mano de su abuelo.

Agradecimientos especiales a DGAPA-PAPIIT por el financiamiento del proyecto IN216319 al Dr. Salvador L. Hernández López (tutor de ésta tesis).

Resumen

El núcleo rostromedial tegmental (RMTg) es una estructura situada en la parte posterior del núcleo ventral tegmental (VTA), por ello también es conocido como la “cola” del núcleo VTA (tVTA). Del 70 % al 92 % de las neuronas que lo conforman son GABAérgicas. El núcleo RMTg ha sido descrito como un modulador de la actividad dopaminérgica (DA) del complejo VTA-substancia negra compacta (SNc) el cual tiene un papel fundamental en la codificación de señales aversivas o gratificantes en roedores y primates. Estudios anatómicos han demostrado que el RMTg recibe una densa inervación glutamatérgica proveniente de la habénula lateral (LHb). Asimismo, este núcleo recibe importantes aferencias colinérgicas que se originan de los núcleos tegmentales pedunculopontino y laterodorsal. En varias estructuras del sistema nervioso central (SNC) se ha observado que la acetilcolina es capaz de modular la liberación de diversos neurotransmisores a través de la activación de receptores colinérgicos de tipo nicotínico (nAChRs). Sin embargo, se desconoce si la acetilcolina es capaz de incrementar la liberación de glutamato en el núcleo RMTg. En el presente trabajo se emplearon técnicas de registro electrofisiológico en célula completa (patch clamp), para investigar el efecto de la nicotina sobre la liberación de glutamato en el núcleo RMTg. Asimismo, se utilizó la técnica de imagenología de calcio para determinar el efecto nicotínico sobre la excitabilidad de las neuronas GABAérgicas en este núcleo. La técnica de imagenología de calcio permite estudiar el efecto de la nicotina sobre una población de neuronas de manera simultánea, pero con resolución de célula única.

Se demostró que la nicotina incrementa los sEPSCs en células GABAérgicas del núcleo RMTg. Esto, mediante la activación presináptica de nAChRs homoméricos conformados por la subunidad $\alpha 7$. Además, este efecto de la nicotina fue congruente con una activación poblacional tras la presencia de nicotina, la cual promovió una mayor sincronía en el disparo de las células del núcleo RMTg. La presente tesis tiene importantes implicaciones fisiológicas, conductuales y clínicas ya que el núcleo RMTg ejerce un efecto inhibitorio sobre las neuronas

dopaminérgicas del VTA y la SNc regulando las señales aversivas y el aprendizaje por reforzamiento. El núcleo RMTg se ha propuesto como un posible blanco para el tratamiento de trastornos neuropsiquiátricos como la ansiedad y la depresión, así como de conductas adictivas.

Índice general

Agradecimientos	v
Resumen	ix
1. Introducción	1
2. Marco teórico	4
2.1. Adicción a nicotina	4
2.2. La nicotina y el sistema dopaminérgico mesolímbico	7
2.3. El núcleo rostromedial tegmental.	7
2.3.1. Aferencias del núcleo rostromedial tegmental	9
2.3.2. Eferencias del RMTg	10
2.3.3. RMTg y codificación de señales	11
2.3.4. RMTg y sustancias de abuso	13
2.3.5. La nicotina y el núcleo RMTg	16
2.4. Justificación	17
2.5. Hipótesis	18
2.6. Hipótesis específicas	19
2.7. Objetivo General	20
2.8. Objetivos específicos	21
3. Materiales y Métodos	22
3.1. Animales	22
3.2. Obtención de rebanadas	22
3.3. Electrofisiología	23
3.4. Administración de fármacos	24
3.5. Aplicación local de acetilcolina	24
3.6. Inmunohistoquímica	25
3.7. Imagenología de calcio	25
3.8. Análisis de imágenes	26
3.9. Análisis estadístico	27

4. Resultados	29
4.1. Electrofisiología	29
4.1.1. La nicotina afecta la frecuencia de las sEPSCs en las células GABAérgicas del núcleo RMTg	29
4.1.2. El antagonismo de los nAChRs tipo $\alpha 7$, previene los efectos de la nicotina sobre las células del núcleo RMTg.	32
4.1.3. La adición de un agonista selectivo a receptores $\alpha 7$, tiene efectos similares a los de la nicotina sobre las células del núcleo RMTg.	33
4.1.4. El antagonismo específico a receptores tipo $\alpha 4\beta 2$, no previene los efectos de la nicotina sobre las células GABAérgicas del núcleo RMTg.	35
4.1.5. Un agonista selectivo a receptores $\alpha 4\beta 2$, no tiene efecto sobre las sEPSCs en células del núcleo RMTg.	36
4.2. Imagenología de Calcio	37
4.2.1. La nicotina incrementa el disparo neuronal poblacional en el núcleo RMTg	37
4.2.2. Los efectos de la nicotina sobre las poblaciones celulares del núcleo RMTg son prevenidos por un antagonista selectivo a los nAChRs $\alpha 7$	38
5. Discusión	41
6. Conclusiones	47

Índice de figuras

2.1. Receptores nicotínicos.	6
2.2. Nicotina y sus efectos en el sistema DA mesolímbico.	8
2.3. Localización del núcleo RMTg.	9
2.4. Aferencias del núcleo RMTg.	10
2.5. Eferencias del núcleo RMTg.	11
2.6. Modelo del eje LHb-RMTg-VTA/SNc.	12
2.7. RMTg y su respuesta a diversas sustancias de abuso.	15
3.1. Técnica de imagenología de calcio.	28
4.1. Efecto de la nicotina sobre la actividad eléctrica de células del núcleo RMTg	31
4.1. Efecto de la nicotina sobre la actividad eléctrica de células del núcleo RMTg	32
4.2. Los efectos de la nicotina sobre las sEPSCs son bloqueados por un antagonista selectivo a nAChRs del subtipo $\alpha 7$	32
4.2. Los efectos de la nicotina sobre las sEPSCs son bloqueados por un antagonista selectivo a nAChRs del subtipo $\alpha 7$	33
4.3. Un agonista selectivo de los nAChRs tipo $\alpha 7$ mimetiza los efectos de la nicotina en las sEPSCs de las células del núcleo RMTg. . .	34
4.4. La presencia de un antagonista selectivo a nAChRs tipo $\alpha 4\beta 2$ no previene los efectos de la nicotina sobre las sEPSCs.	35
4.5. Un agonista con alta afinidad por los nAChRS tipo $\alpha 4\beta 2$ no mimetiza los efectos de la nicotina.	36
4.6. Registro poblacional de la actividad neuronal producida por nicotina en el núcleo RMTg.	37
4.6. Registro poblacional de la actividad neuronal producida por nicotina en el núcleo RMTg.	38
4.7. Registro poblacional de la actividad neuronal producida por nicotina en presencia de MLA en el núcleo RMTg.	39
5.1. Nicotina y el control de la actividad DA mediante nAChRs $\alpha 7$. .	44

Lista de abreviaturas

ACh Acetilcolina

CBR₁ Receptor a cannabinoides tipo 1

DA Dopamina / Dopaminérgico

DMSO Dimetilsufóxido

DR Rafé dorsal

EPSC Corrientes excitatorias postsinápticas

FR Fascículo retroflexus

GABA Ácido gamma-aminobutírico

IP Núcleo interpeduncular

IPSPs Potenciales postsinápticos inhibitorios

LDTg Núcleo laterodorsal tegmental

LHb Habénula lateral

NAc Núcleo accumbens

nAChRs Receptores de acetilcolina nicotínicos

NIDA Intituto nacional del abuso de drogas-E.U.

PPTg Núcleo pedunculopontino tegmental

RMTg Núcleo rostromedial tegmental

RR Campo retrorubral

SEPSCs Corrientes postsinápticas excitatorias espontáneas

SNC Sistema nervioso central

SNc Sustancia negra compacta

TH Tirosina hidroxilasa

VTA Área ventral tegmental

Introducción

Las recompensas y los castigos son eventos esenciales en el moldeamiento conductual de los animales. Dichos eventos definirán las respuestas conductuales futuras, siempre y cuando exista una contingencia entre ellas, generando un aprendizaje adaptativo (Schultz, 2016). Todo organismo busca emitir una conducta óptima donde se obtengan reforzantes y se eviten los castigos (Bromberg-Martin et al., 2010). Sin embargo, existen alteraciones o desórdenes psicológicos que pueden afectar la emisión de una respuesta adecuada ante cierta situación que se enfrente, lo cual conduce a una desadaptación al entorno (Schultz, 2016).

Ejemplos de estos desórdenes son las adicciones, definidas por el Instituto Nacional sobre el Abuso de Drogas (NIDA, 2016), como un trastorno crónico y recurrente, caracterizado por la búsqueda compulsiva y el uso de alguna sustancia nociva sin importar las consecuencias. El abuso de drogas es considerado un desorden del sistema nervioso central (SNC), debido a que ocurre un cambio funcional en los circuitos cerebrales, implicados en la codificación de recompensas, estrés y autocontrol. Estos cambios tienen una duración muy amplia en el tiempo, inclusive aún después de que la persona haya detenido el consumo de la sustancia nociva (Hyman et al., 2006).

El sistema dopaminérgico mesolímbico, el cual es fundamental en el aprendizaje de reforzadores y castigos, es uno de los principales sistemas neuronales alterados en las adicciones (Goldstein y Volkow, 2002). Dicho sistema está constituido por los núcleos mesencefálicos del área ventral tegmental (VTA), la

substancia negra compacta (SNc) y sus proyecciones dopaminérgicas a la corteza prefrontal y áreas subcorticales. El neurotransmisor dopamina (DA) tiene un papel fundamental en el control de la motivación mediante el procesamiento de aspectos específicos de las consecuencias de la respuesta de un animal, como lo son: la cantidad, probabilidad y el valor subjetivo de los estímulos. Por lo tanto, este sistema es vital para el aprendizaje y la toma de decisiones (Bjorklund y Dunnett, 2007; Bromberg-Martin et al., 2010).

Otra estructura fundamental en los procesos de aprendizaje por reforzamiento y aversión es el núcleo rostromedial tegmental (RMTg). Ésta, es una estructura bilateral situada en la parte posterior del VTA. Por ello, también es conocido como la “cola” del núcleo VTA (tVTA). El núcleo RMTg ha sido descrito como un modulador GABAérgico de la actividad dopaminérgica del complejo VTA-SNc y tiene un papel fundamental en la codificación de señales aversivas y gratificantes en roedores (Jhou et al., 2009; Sánchez-Catalán et al., 2017; Stamatakis y Stuber, 2012) y en primates (Hong et al., 2011).

El descubrimiento de este núcleo fue debido a una serie de observaciones que demostraron la conectividad de un grupo de neuronas que expresaban genes de expresión temprana después de la administración de drogas psicoestimulantes (Scammell et al., 2000; Jhou, 2005; Perrotti et al., 2005; Zahm et al., 2010). Éstas mismas neuronas mostraban un notable marcaje después de la inyección de trazadores retrógrados en el núcleo VTA (Geisler et al., 2008; Jhou, 2005; Jhou et al., 2009) y expresaban la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD) lo cual indica el uso de GABA como neurotransmisor (Jhou et al., 2009; Kaufling et al., 2010). Finalmente, otra región importante en el establecimiento y las consecuencias de las adicciones (sensibilización y abstinencia) es la habénula lateral (LHb) la cual origina una gran densidad de proyecciones glutamatérgicas hacia las neuronas GABAérgicas del RMTg constituyendo la principal entrada excitatoria a este núcleo (Jhou et al., 2009). Se sabe que los estímulos aversivos producen una activación de las neuronas de la LHb las cuales tienen un efecto excitatorio glutamatérgico sobre las neuronas GABAérgicas del RMTg. Éstas, a su vez, producen un efecto inhibitorio mediado por GABA sobre las neuronas DA del VTA. A través de esta vía, la LHb provoca la inhibición de alrededor del 95 % de células dopaminérgicas del VTA (Ji y Shepard, 2007). Esto ha llevado a

sugerir que el núcleo RMTg funciona como un freno del sistema dopaminérgico mesolímbico (Bourdy y Barrot, 2012).

El núcleo RMTg recibe importantes aferencias colinérgicas que ejercen sus efectos a través de receptores colinérgicos de tipo nicotínico (nAChRs). Éste es el tema central del presente trabajo de tesis, pues el interés principal fue investigar si la nicotina, la cual es una droga de abuso común, podría modular la actividad del RMTg. Debido al control tónico que el núcleo RMTg ejerce sobre las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, es válido inferir que la regulación de la actividad de este núcleo por la nicotina tendría consecuencias importantes sobre el funcionamiento del sistema dopaminérgico mesolímbico y el aprendizaje de conductas por reforzamiento. Para estudiar el efecto de la nicotina en el RMTg, en este trabajo se emplearon técnicas electrofisiológicas y de imagenología de calcio.

Capítulo 2

Marco teórico

2.1. Adicción a nicotina

El consumo de tabaco es un problema mundial de salud pública, causando el deceso de más de 7 millones de consumidores directos y 1.2 millones de personas expuestas a humo ajeno. A pesar de sus negativas consecuencias, el tabaco es usado comúnmente en todo el mundo, ya que aproximadamente 1.1 billones de personas lo consumen y cerca del 80 % de estos consumidores viven en países de ingresos medianos o bajos (OMS, 2015). Por otra parte, sólo el 5 % de intentos de parar el consumo de esta droga, sin ayuda especializada, son exitosos. Fumar es altamente coincidente con ciertos desórdenes psiquiátricos incluyendo depresión, ansiedad y adicciones a otras drogas de abuso (Miller y Picciotto, 2016).

De acuerdo con el manual diagnóstico y estadístico de desórdenes mentales en su quinta edición (DSM-5, por sus siglas en inglés), la adicción al tabaco es diagnosticado cuando un paciente presenta al menos dos de once criterios, en los cuales están incluidos: el control deficitario sobre su uso, deseos insistentes en dejar o controlar su consumo, así como fallos en estos intentos, alta inversión de tiempo intentando obtener la sustancia, deseo intenso de consumo a pesar de tener problemas recurrentes causados o exacerbados en torno al uso de la droga, riesgos físicos, tolerancia y abstinencia (American Psychiatric Association, 2013). Además, dos indicadores fuertes en la adicción a nicotina son el número de cigarrillos fumados al día y el tiempo que transcurre desde despertarse hasta consumir el primer cigarrillo del día (Miller y Picciotto, 2016).

La nicotina es el principal componente psicoactivo del tabaco. Es un alcaloide altamente adictivo y responsable de la gran prevalencia del uso de tabaco. Ésta droga ejerce sus efectos por medio de su unión, activación y desensibilización de los nAChRs expresados en todo el SNC que se encuentran en elementos neuronales, tanto presinápticos como postsinápticos (Miller y Piccioto, 2016).

Los nAChRs 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.e., $\alpha 7$ ó $\alpha 9$) 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). Actualmente, se han identificado 9 subunidades α ($\alpha 2 - \alpha 10$), la subunidad $\alpha 8$ se ha localizado en aves pero no se encuentra en mamíferos (Lindstrom et al., 1996). De la subunidad β se han identificado a la fecha sólo tres tipos ($\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta 4$; 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 (Fig 2.1). 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 SNC 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, determinando 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 $\beta 2$. Si bien, se ha descrito otra estequiometría de este receptor, la relación en la expresión de estas dos conformaciones proteicas aún no está bien esclarecida (Lucero et al., 2016; Carbone et al., 2009). Este es el nAChR de mayor distribución en el SNC y está localizado principalmente en la corteza cerebral, núcleo estriado, núcleo supraquiasmático, núcleo geniculado lateral y el mesencéfalo (Whiting et al. 1991; Flores et al. 1992). Los receptores $\alpha 4\beta 2$ tienen mucha mayor afinidad (rango nanomolar) por la nicotina en comparación con 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 incluyendo la corteza, el hipocampo y las regiones subcorticales límbicas, con una menor distribución en regiones talámicas y ganglios basales (Breese et al., 1997; Broide et al., 1995; 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 et al., 1997).

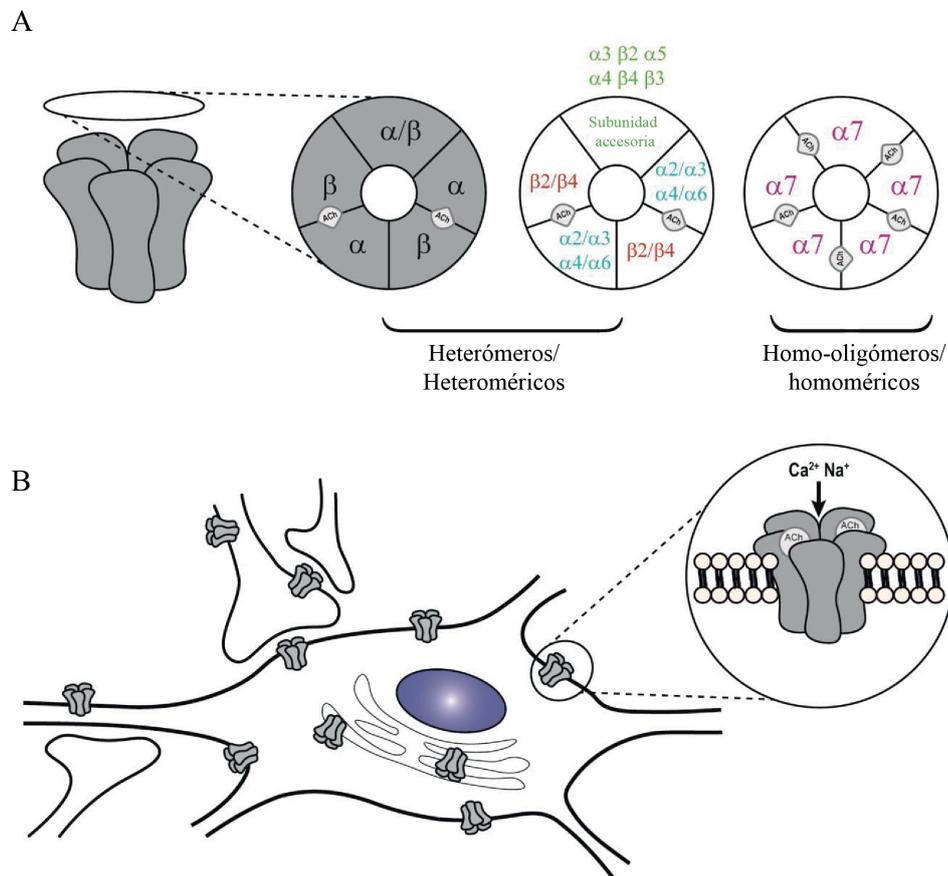


Figura 2.1: Receptores nicotínicos.

A) Ilustración esquemática de los nAChRs como pentámeros conformados por 5 subunidades las cuales pueden ser α y β . Los receptores que están conformados por diferentes subunidades se les conoce como heterómeros o heteroméricos, en cambio, los receptores que son conformados por 5 subunidades idénticas son llamados homólogos u homoméricos. B) La conformación que tiene el receptor le confiere propiedades farmacológicas y físicas específicas, por ejemplo, su afinidad por el ligando, sus cinéticas de activación e inactivación, su permeabilidad a cationes como Ca^{+2} o Na^+ , etc. La localización de estos receptores es principalmente presináptica, sin embargo, también se encuentra en elementos neuronales postsinápticos como dendritas y somas (Modificada de Cali et al., 2019).

2.2. La nicotina y el sistema dopaminérgico mesolímbico

Las propiedades adictivas de la nicotina son mediadas por el sistema DA mesolímbico y sus proyecciones hacia el núcleo accumbens (NAc), además de las eferencias de este último a la corteza, el neocórtex, la amígdala, el hipocampo y otras áreas subcorticales (Björklund y Dunnett, 2007). La nicotina incrementa la transmisión de DA del núcleo VTA mediante múltiples mecanismos mediados por nAChRs. Por ejemplo, la activación de nAChRs $\alpha 4\beta 2$ en el soma de células DA incrementan su excitabilidad y la tasa de disparo. Además nAChRs $\alpha 4\beta 2\alpha 6$ en terminales dopaminérgicas incrementan la liberación de DA en el NAc (Picciotto et al., 1998; Zoli et al., 2002). Finalmente, la nicotina puede activar receptores presinápticos nAChRs $\alpha 7$ de terminales glutamatérgicas en el VTA, lo cual induce el incremento de liberación de glutamato sobre neuronas DA (Fig. 2.2) (Miller y Picciotto, 2016).

Precisamente, una de las vías importantes que es alterada, por el abuso de nicotina, es la proyección dopaminérgica del VTA al NAc, lo cual contribuye a las propiedades adictivas y reforzadoras de esta droga (Mao et al., 2011). Por ejemplo, previamente se ha demostrado que la exposición aguda a nicotina en rebanas cerebrales de ratas jóvenes promueve la potenciación a largo plazo (LTP) dependiente de receptores NMDA en sinapsis excitatorias de neuronas DA del VTA. Además, se observó un incremento en la tasa de expresión de los receptores AMPA/NMDA en neuronas dopaminérgicas, siendo consistente con la generación de LTP en estas sinapsis (Gao et al., 2010). Por otra parte, se ha reportado que, en el NAc, la aplicación aguda de nicotina produce un incremento persistente en la transmisión glutamatérgica (Mansvelder et al., 2002).

2.3. El núcleo rostromedial tegmental.

El núcleo RMTg también llamado cola del VTA (tVTA; Kauffling et al., 2009; Perrotti et al., 2005), es parte de la formación reticular medial mesopontina (Zahm, 2010), ha sido descrito en primates (Hong., 2011) y en roedores (Stamatakis y Stuber, 2012) como una estructura bilateral, conformada por un 70 %-90 % de células GABAérgicas.

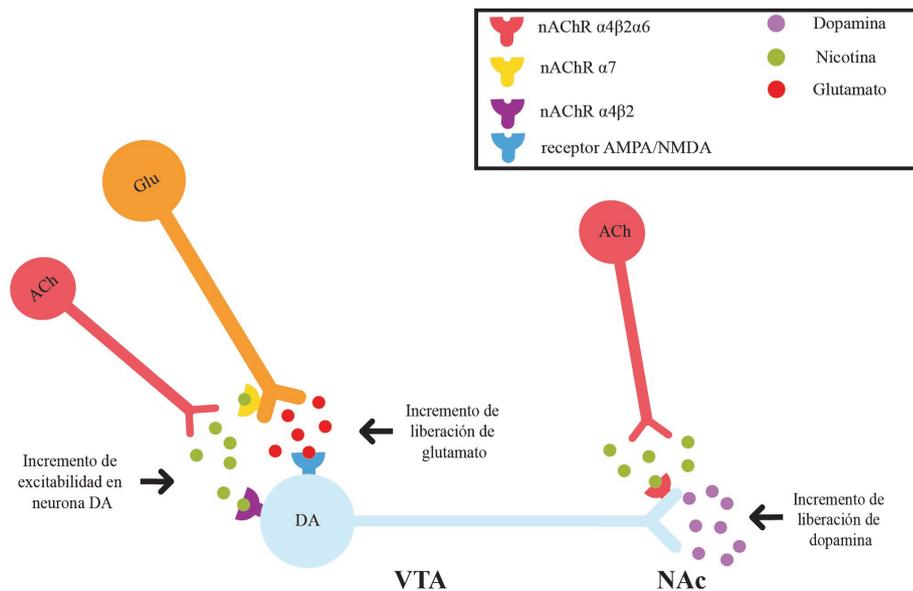


Figura 2.2: Nicotina y sus efectos en el sistema DA mesolímbico. Representación esquemática del mecanismo celular y molecular subyacente al incremento dopaminérgico (DA) por la activación de nAChRs. Área ventral tegmental (VTA), núcleo accumbens (NAc), neurona colinérgica (ACh), neurona glutamatérgica (Glu), neurona dopaminérgica (DA) (Modificado de Miller y Piccioto, 2016).

La nomenclatura tVTA hace alusión al primer tercio de esta estructura, debido a que se encuentra inserta en la parte posterior del VTA (Geisler et al., 2008; Barrot y Thome, 2011). Otra nomenclatura asignada para la misma estructura es RMTg, debido a que la parte posterior del núcleo se extiende caudalmente en dirección al borde rostral del núcleo pedunculopontino tegmental (PPTg), compartiendo cierta homología con núcleos tegmentales. Además, este nombre es consistente con la nomenclatura de otras estructuras mesopontinas (Bourdy y Barrot, 2012). Si bien ambas nomenclaturas tienen la misma validez, en este trabajo se hará referencia a esta estructura como núcleo RMTg.

La localización del núcleo RMTg es posterior al núcleo VTA y dorsal al núcleo interpeduncular (IP; Perrotti et al., 2005), extendiéndose en sentido rostral-caudal en las zonas ventrales mesopontinas, quedando incrustada dentro de la decusación del pedúnculo cerebeloso superior (Fig. 2.3) (Bourdy y Barrot, 2012). En atlas cerebrales de rata, su localización lo define como parte del núcleo paranigral (PN; Paxinos and Watson, 2007), sin embargo, esta estructura se diferencia de otras aledañas debido a la expresión del enzima ácido glutámico decarboxilasa (GAD_{67}) sintetizadora de ácido gamma-aminobutírico (GABA) (Olson y Nestler, 2007), así como por su respuesta a diversos psicoestimulantes

como cocaína y anfetaminas (Kauffing et al., 2010; Geisler et al., 2008; Barrot et al., 2012).

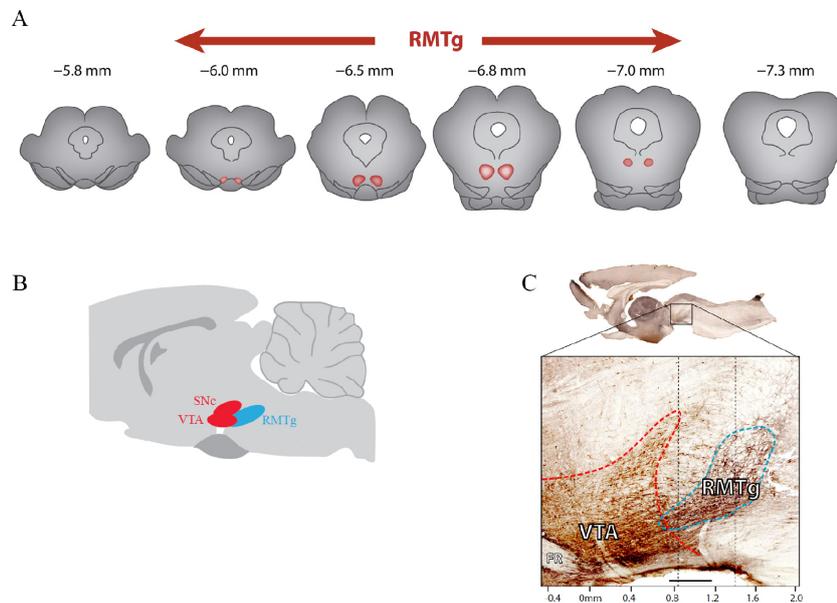


Figura 2.3: Localización del núcleo RMTg.

A) Ilustración esquemática en un plano coronal de la ubicación del RMTg (rojo). En ratas el RMTg se extiende, en sentido rostro-caudal, aproximadamente de -6 a -7 mm a partir de bregma. B) Esquema sagital, delimitando en azul al núcleo RMTg y en rojo al VTA y la SNc. C) Corte para-sagital 0.5mm lateral a la línea media. En café se muestra la inmunohistoquímica para tirosina hidroxilasa (TH; delimitado en rojo), que corresponde al VTA. En negro, se muestra la inmunohistoquímica para el receptor opiode μ , que corresponde a la región del RMTg (delimitada en azul). Sustancia negra compacta (SNc), Núcleo ventral tegmental (VTA), Nucleo rostromedial tegmental (RMTg).

Estudios electrofisiológicos demuestran que la tasa de disparo de las neuronas del RMTg registradas *in vivo* oscila entre 11 y 18 Hz, y la duración media del potencial de acción tiene un valor aproximado de 1 ms (Jhou et al., 2009; Lecca et al., 2011). En células de la misma estructura, pero en primates se observa una media similar en la tasa de disparo; en cambio, el valor promedio de la duración del potencial de acción es de 0.66 ms (Bourdy y Barrot, 2012).

2.3.1. Aferecias del núcleo rostromedial tegmental

Las aferencias más importantes al núcleo RMTg provienen principalmente de la LHb, el área preóptica lateral, las áreas laterales y dorsales del hipotálamo, el rafé dorsal (DR), los núcleos tegmentales LDTg y PPTg (Fig. 2.4; Jhou et

al., 2009; Kauffling et al., 2009; Yetnikoff et al., 2014; Bourdy y Barrot, 2012).

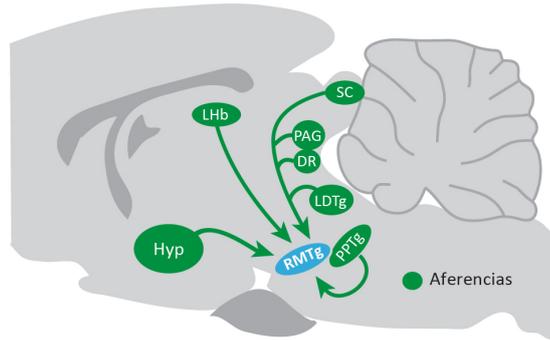


Figura 2.4: Aferencias del núcleo RMTg.

Estructuras que proyectan hacia el núcleo RMTg (en verde). Las principales aferencias se originan en la habénula lateral (LHb), el hipotálamo (Hyp), los colículos superiores (SC), la zona periacueductal gris (PAG), el rafé dorsal (DR), el núcleo laterodorsal tegmental (LDTg) y el núcleo pedunculopontino tegmental (PPTg).

La proyección LHB-RMTg está comprendida como parte del fascículo retroflexus (FR; Lavezzi y Zahm, 2011) y se encuentra organizada de manera topográfica, donde zonas mediales y laterales del núcleo RMTg reciben proyecciones de áreas mediales y laterales de la LHb, respectivamente. Aproximadamente sólo el 35 % de los axones que comprenden esta proyección están mielinizados (Balcita-Pedicino et al., 2011; Fakhoury, 2018). Esta proyección es glutamatergica, por lo tanto, se trata de una aferente excitatoria (Balcita-Pedicino et al., 2011; Brinschwitz et al., 2010; Hong et al., 2011). Se ha sugerido que las terminales presinápticas LHB-RMTg expresan receptores nicotínicos (nAChR), compuestos en su mayoría por la subunidad $\alpha 7$, además de la expresión de receptores a cannabinoides de tipo 1 (CBR₁; Lecca et al., 2011).

La caracterización de las demás entradas de información del RMTg aún es muy limitada, sin embargo, se ha reportado que las aferencias que surgen desde el núcleo DR y del locus coeruleus son de naturaleza serotoninérgica y noradrenérgica, respectivamente. Finalmente, el RMTg es densamente innervado por aferentes colinérgicas que provienen de los núcleos LDTg y PPTg (Ikemoto y Bonci, 2014; Yetnikoff et al., 2014).

2.3.2. Eferencias del RMTg

Las eferencias del RMTg son más específicas en comparación a sus aferencias, teniendo por blanco principal cuerpos celulares DA del complejo VTA-SNc, extendiéndose de menor manera al campo retrorubral (Fig. 2.5). Aproximada-

mente el 80 % de terminales axónicas del RMTg forman sinapsis simétricas (inhibitorias), con dendritas inmunoreactivas a la enzima tirosina hidroxilasa (TH) la cual es indicativa de la presencia de DA (Jhou et al., 2009; Kauffling et al., 2010; Bourdy and Barrot, 2012).

El RMTg también tiene proyecciones robustas al hipotálamo lateral, regiones de la parte medial del PPTg, la sustancia gris periacueductal, el núcleo DR, y la formación reticular y bulbar (Barrot y Thome, 2011; Bourdy y Barrot, 2012; Fakhoury, 2018).

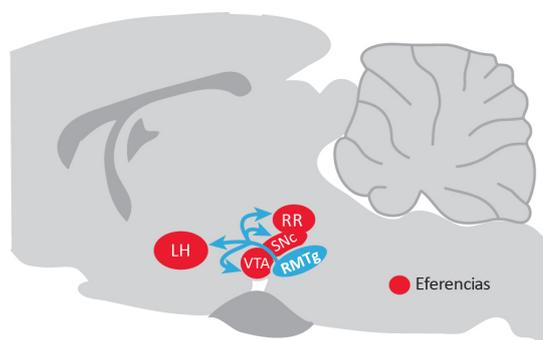


Figura 2.5: Eferencias del núcleo RMTg.

Estructuras blanco de las eferencias del núcleo RMTg (en rojo). Como puede observarse en el esquema las eferentes proyectan preferentemente a los núcleos que conforman el sistema DA mesencefálico. Estos son, el núcleo ventral tegmental (VTA), la sustancia negra compacta (SNc) y en menor medida al campo retrorubral (RR). Además de estas regiones, el núcleo RMTg origina densas proyecciones al hipotálamo lateral (LH).

Interesantemente, se ha reportado la existencia de eferentes colateralizadas del núcleo RMTg al núcleo VTA y DR (Lavezzi et al., 2012), lo cual sugiere una posible regulación coordinada de estas áreas. Esto sitúa al núcleo RMTg como un modulador de la actividad DA y un posible regulador de la actividad serotoninérgica, importante en la codificación de señales del entorno y cuya actividad celular es similar a las células DA del núcleo VTA (Barrot et al., 2012, Cohen et al., 2015).

2.3.3. RMTg y codificación de señales

El núcleo RMTg tiene un papel muy importante en la codificación del aprendizaje y respuesta a estímulos aversivos y reforzadores del entorno. Su patrón

de actividad es sinérgico con la actividad celular de la LHb y opuesto a la actividad de las neuronas DA del mesencéfalo (Fig. 2.6; Matsumoto y Hikosaka, 2007; Jhou et al., 2009, 2013; Hong et al., 2011; Barrot et al., 2017).

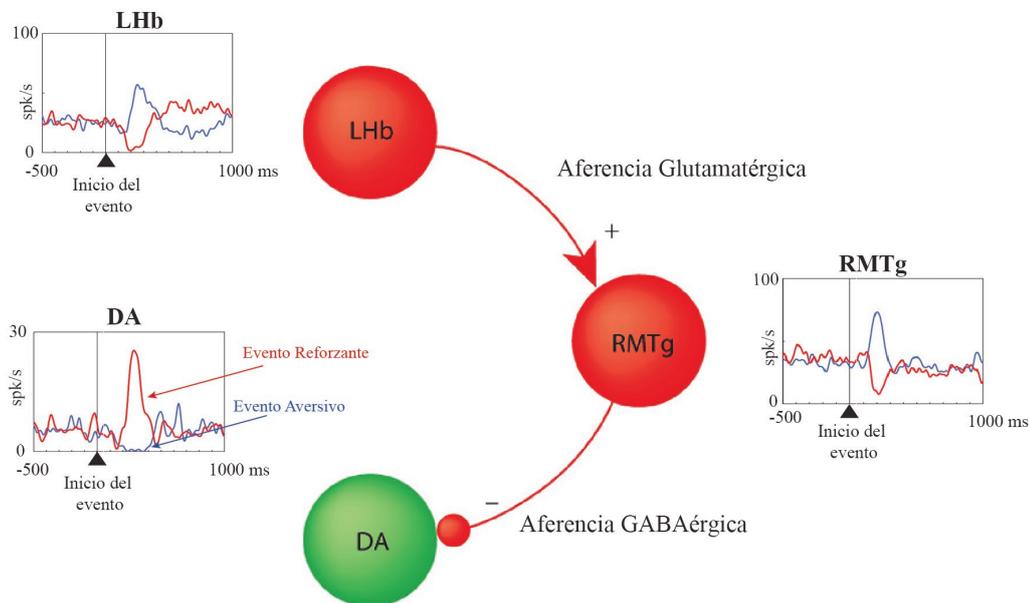


Figura 2.6: Modelo del eje LHb-RMTg-VTA/SNc.

Representación esquemática de la conectividad y actividad neuronal de un trabajo experimental realizado en monos. Las gráficas muestran la actividad de cada tipo de neurona, expresada como cantidad de espigas por segundo (spk/s) ante un estímulo visual que predice ya sea un evento reforzante o un evento aversivo. Note que ambos núcleos, (RMTg) y (LHb), aumentan su tasa de disparo ante la proximidad de un evento aversivo (trazos azules). Por el contrario, los dos núcleos decrementan su actividad cuando el estímulo visual predice un evento reforzante (trazos rojos). De manera opuesta las neuronas dopaminérgicas (DA) del mesencéfalo, aumentan su actividad ante un evento reforzante y son inhibidas ante la proximidad de un evento aversivo. La actividad neuronal de estas estructuras sugiere que el eje LHb-RMTg-VTA tiene importantes implicaciones en la codificación de las consecuencias de una conducta emitida (Modificada de Jhou et al., 2013 y Hong et al., 2011).

Las células GABAérgicas que comprenden al núcleo RMTg son sensibles a la valencia de los estímulos, en términos de reforzadores o aversivos, observando una ligera inhibición fásica durante estímulos reforzadores en comparación con una excitación fásica después de la presentación de estímulos aversivos de diferentes modalidades sensoriales (Li et al., 2019). En este sentido, se ha reportado un incremento de la actividad neuronal después de la exposición a electrochoques en las patas o pistas que los predigan (Jhou et al., 2009). También, se ha demostrado que la exposición a estímulos aversivos impredecibles incrementa la liberación glutamato de terminales nerviosas provenientes de la LHb que hacen sinapsis con células del núcleo RMTg (Stamatakis y Stuber, 2012). El efecto

postsináptico consecuente es el incremento de la actividad de células GABAérgicas del RMTg aunado a la inducción de c-Fos (Brown y Shepard, 2013; Jhou et al., 2009). Este incremento de actividad y de c-Fos mediado por el eje LHB-RMTg se ve anulado al lesionar el FR (Brown y Shepard, 2013; Balcita-Pedicino et al., 2011).

A este respecto, se ha reportado una respuesta neuronal heterogénea en el núcleo RMTg después de la estimulación eléctrica en las patas por periodos cortos de tiempo, ya que en zonas centrales del núcleo el aumento de células positivas a c-Fos es mayor en comparación a regiones laterales (Jhou et al., 2009). Experimentos con primates confirman dicha observación, ya que se ha reportado que de todas las células que conforman al núcleo RMTg, el 64 % de ellas son sensibles a la omisión de la recompensa, así como a pistas que predicen su entrega, encontrándose el 94 % de esas células en la región central (core) (Hong et al., 2011).

2.3.4. RMTg y sustancias de abuso

El abuso en el consumo de drogas es representado como un ciclo escalonado de desregularizaciones del mecanismo cerebral codificante de recompensas y castigos, teniendo por consecuencia el uso compulsivo de drogas y la pérdida de control de su consumo sin importar las consecuencias (Koob y Le Moal, 2008; Volkow y Morales, 2015).

Inicialmente el núcleo RMTg fue descrito debido a su expresión de c-Fos en respuesta a la administración aguda (Kauffing et al., 2009; Lecca et al., 2011) y crónica (Perrotti et al., 2005) de psicoestimulantes, tales como la cocaína, las anfetaminas (d-anfetamina, metanfetamina, 4- metilenedioxymetanfetamina) y otras drogas de abuso (Kauffing et al., 2010; Zahm et al., 2011; Lecca et al., 2011, 2012; Matsui y Williams, 2011; Cornish et al., 2012). Se ha hipotetizado que esta respuesta podría ser mediada por el sistema DA (Fakhoury, 2018) ya que la activación de proyecciones de neuronas DA del núcleo VTA a la LHB incrementa la excitabilidad de células pertenecientes al eje LHB-RMTg por medio de receptores D₄, resultando en una retroalimentación negativa indirecta (Fig. 2.7) (Good et al., 2013). Además, tras la administración de un inhibidor de la recaptura de DA, también es observado un incremento en la expresión de

c-Fos en el núcleo RMTg (Perrotti et al., 2005; Kauffing et al., 2019).

Después de la administración de cocaína se mantiene una expresión aumentada de c-Fos y Δ FosB durante días en células del núcleo RMTg (Kauffing, 2010). Esta expresión es anulada en un 50 % después de una lesión del FR (Jhou et al., 2013), indicando que la expresión de c-Fos refleja la integración de información proveniente de la LHb. Sin embargo, la causa del resto de la expresión no ha sido esclarecida. Aunado a esto, la cocaína potencia por más de 24 horas las corrientes excitatorias presinápticas (EPSC), mediadas por receptores AMPA en neuronas de la LHb que proyectan específicamente hacia células del núcleo RMTg (Maroteaux y Mameli, 2012; Meye et al., 2015).

La cocaína promueve un efecto bifásico, teniendo importantes propiedades reforzadoras en un inicio, y posteriormente una etapa aversiva, la cual es más duradera a través del tiempo. Interesantemente, ante la administración de esta droga, el disparo de las células del RMTg muestran dicho efecto bifásico coincidiendo su actividad con estados aversivos o reforzantes en roedores, provocado por la administración de cocaína (Li et al., 2019). Esto se puede observar durante la constante administración de cocaína, la cual promueve un incremento en conductas evasivas, sin embargo, al realizar una ablación del núcleo RMTg dicha aversión deja de presentarse. Esto ocurre también, tras la inmediata inhibición de este núcleo mediante métodos optogenéticos (Jhou et al., 2013). Resultados similares han sido observados en programas de autoadministración, durante paradigmas de búsqueda de cocaína en roedores, donde la activación del núcleo RMTg fomenta la extinción de la autoadministración y la inhibición de este núcleo incrementa las respuestas operantes (Huff y LaLumiere, 2015). Por consiguiente, el núcleo RMTg puede jugar un papel crucial en la modulación de las propiedades negativas de la cocaína.

Un agonista opioide como la morfina, afecta la actividad de las células del RMTg decrementando la tasa de disparo mediante receptores a opioides de tipo μ (Fig. 2.7) (Jalabert et al., 2011), provocando la excitación de células DA debido a la inhibición presináptica de potenciales postsinápticos inhibitorios (IPSPs) de naturaleza GABAérgica (Johnson y North, 1992). Además, estudios conductuales muestran que tras la administración local dentro del RMTg de

otro agonista opioide como lo es el endorfin-1 produce una preferencia de lugar en roedores. Por lo tanto, el RMTg también juega un papel importante en los efectos reforzantes debido a la administración de opioides (Jhou et al., 2012).

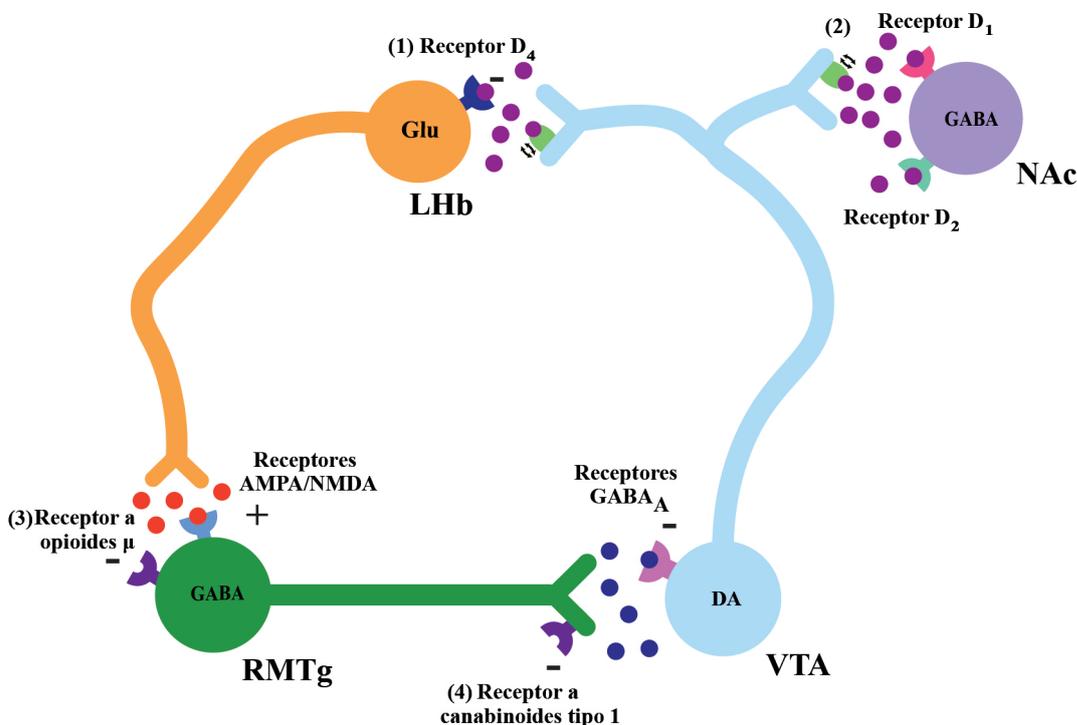


Figura 2.7: RMTg y su respuesta a diversas sustancias de abuso.

Representación esquemática de los diversos sistemas involucrados en la respuesta del eje LHB-RMTg-VTA en presencia de algunas sustancias de abuso como la cocaína, mediante el incremento de liberación de DA y activación de receptores a DA tipo D₄ provocando una inhibición de células glutamatérgicas de la LHB (1). Además de la activación de receptores tipo D₁ y D₂ en el NAc (2). Los opioides, mediante la presencia de receptores a opioides tipo μ en células GABAérgicas del RMTg generando una inhibición de la actividad de estas células y por lo tanto facilitando la liberación de DA de células del VTA (3). Finalmente los endocannabinoides mediante la sustancia activa del cannabis ($\Delta 9$ -tetrahidrocannabinol) activa los CBR₁ localizados en terminales sinápticas de células GABAérgicas del RMTg inhibiendo la liberación de GABA sobre las células DA del VTA (4).

Otra droga de abuso cuyos efectos se han estudiado en el RMTg, es el cannabis. El componente activo del cannabis es el $\Delta 9$ -tetrahidrocannabinol el cual promueve la activación de células DA del mesencéfalo. Este efecto es mediado por CBR₁s los cuales se expresan en las terminales GABAérgicas que se originan en el RMTg (Gessa et al., 1998; Herkenham et al., 1991). La activación de los CBR₁s inhiben la liberación de GABA por lo tanto se incrementa la excitabilidad de las neuronas DA por un mecanismo de desinhibición (Fig. 2.7) (Lecca et al., 2011).

2.3.5. La nicotina y el núcleo RMTg

Se ha sugerido que la nicotina también puede mediar efectos aversivos posiblemente por la conexión entre la habénula medial y el núcleo interpeduncular. Si bien, estudios farmacológicos muestran que existe una participación de esta vía, su relación con el sistema DA aún no es clara (Antolin-Flores et al., 2015; Miller y Picciotto, 2016). Por otra parte, los efectos aversivos también podrían estar mediados por el eje Lhb-RMTg. Esta idea esta reforzada por el hecho de que la inhibición del núcleo RMTg incrementa la tasa de disparo de células del VTA (Jalabert et al., 2011; Kauffling y Aston Jones, 2015) y de la SNc (Bourdy et al., 2014). Mientras que la activación del RMTg, ya sea por estímulo eléctrico u optogenético, inhibe la actividad de las neuronas DA e induce aversión y conductas de evitación de lugar (Lecca et al., 2011; Stamatakis y Stuber, 2012).

Como se mencionó anteriormente, además de las proyecciones glutamatérgicas de la Lhb, el RMTg recibe entradas colinérgicas provenientes de los núcleos del tegmento laterodorsal y pedunculopontino (Kauffling et al., 2009; Brinschwitz et al., 2010; Bourdy y Barrot, 2012; Barrot et al., 2017). En diversas estructuras cerebrales incluyendo el hipocampo, la corteza, el tálamo y el núcleo dorsal del rafé, entre otras, se ha demostrado que la acetilcolina modula la liberación de glutamato mediante la activación de nAChRs presinápticos. Este efecto involucra diversos tipos de canales de calcio (McGehee et al., 1995; Girod y Role, 2001; Maggi et al., 2004; Sharma et al., 2008; Dickinson et al., 2008; Garduño et al., 2012). Luego, una pregunta importante es si la activación de nAChRs podría regular la liberación de glutamato y por tanto la excitabilidad de las neuronas del núcleo RMTg. Previamente se ha sugerido que las terminales glutamatérgicas provenientes de la habénula contienen nAChRs tipo $\alpha 7$ que al ser activados aumentan la actividad de las neuronas del RMTg (Lecca et al., 2011, 2012). Sin embargo, las acciones de la nicotina sobre los nAChRs presinápticos en el RMTg no han sido estudiados en forma detallada. En el presente trabajo de tesis se investigó si la nicotina regula la liberación espontánea de glutamato y la excitabilidad en neuronas del núcleo RMTg, mediante técnicas electrofisiológicas y de imagenología de calcio.

2.4. Justificación

El consumo de tabaco es un problema de salud pública cuya prevalencia ha aumentado en las últimas décadas al grado de causar alrededor de 7 millones de decesos al año. La nicotina, sustancia activa del tabaco, tiene un efecto relajante ansiolítico, sin embargo, ese efecto no es constante a lo largo del tiempo, ya que fumadores reportan una mayor sensación placentera en “el primer cigarro del día” y esa sensación va decreciendo conforme se consumen más cigarrillos durante el día (Miller y Picciotto, 2016). Por otra parte, se ha reportado que individuos con alto consumo de nicotina, muestran un patrón de alteraciones tanto cognitivas como fisiológicas, así como de comportamiento. Estas alteraciones implican cambios a nivel del SNC, especialmente en circuitos neuronales implicados en el sistema de recompensa y aversión. Como se señaló anteriormente, el complejo SNc/VTA es la principal fuente de dopamina en el cerebro y existen evidencias de que la función de estos núcleos está alterada en las adicciones. Por otra parte, el núcleo RMTg ejerce un fuerte tono inhibitorio sobre ellos, por lo cual se ha propuesto este núcleo como un “freno” de los sistemas dopaminérgicos. Además, por su situación anatómica, que le permite recibir información proveniente de áreas sensoriales, límbicas y motoras y transmitirla a los sistemas dopaminérgicos y serotoninérgicos, el núcleo RMTg juega un papel estratégico en el control de funciones cognitivas y conductuales, así como del aprendizaje por reforzamiento. Un ejemplo de esto, son las abundantes aferencias glutamatérgicas de la LHB, región talámica importante en la codificación de estímulos aversivos o gratificantes, así como en la toma de decisiones. Por ello, este núcleo se ha propuesto como un futuro blanco terapéutico para el tratamiento de diversos trastornos neuropsiquiátricos como la ansiedad, la depresión y las conductas adictivas. Considerando lo anterior, resulta de gran importancia clínica y fisiológica estudiar los mecanismos por los cuales la nicotina, siendo una droga de abuso, controla la actividad del núcleo RMTg. Además, el presente trabajo de tesis propone abordar el problema mediante técnicas electrofisiológicas y de imagenología de calcio. Esta última nos permitirá visualizar el efecto de la nicotina sobre una población de decenas de neuronas, pero con resolución de célula única. Cabe señalar que esta técnica no se ha utilizado antes en el estudio del RMTg.

2.5. Hipótesis

Si existen receptores colinérgicos nicotínicos en las terminales glutamatérgicas en el núcleo RMTg, su activación por nicotina incrementará liberación de glutamato y la excitabilidad de las neuronas GABAérgicas.

2.6. Hipótesis específicas

1. Las corrientes excitatorias post sinápticas espontáneas (EPSCs) en neuronas GABAérgicas del núcleo RMTg incrementarán después de la aplicación de nicotina
2. Los efectos de la nicotina pueden ser mediados por los nAChRs conformados tanto por las subunidades $\alpha 7$ como las subunidades $\alpha 4$ y $\beta 2$.
3. Las ubicaciones de los nAChRs se encontrarán en las terminales sinápticas, regulando la liberación de neurotransmisores.
4. La actividad poblacional de las células del núcleo RMTg será incrementada tras la presencia de nicotina.
5. Los resultados electrofisiológicos patch-clamp de célula única serán congruentes con la actividad poblacional registrada, antes, en presencia y después de la nicotina, en células del núcleo RMTg.

2.7. Objetivo General

Determinar el efecto de la nicotina sobre la liberación espontánea de glutamato y la actividad de las neuronas GABAérgicas del núcleo RMTg.

2.8. Objetivos específicos

1. Determinar los efectos de la nicotina sobre las corrientes postsinápticas excitatorias (EPSCs) en neuronas GABAérgicas del RMTg, mediante técnicas electrofisiológicas.
2. Determinar farmacológicamente, el subtipo de receptor a través del cual la nicotina ejerce sus efectos en el RMTg, mediante el uso de antagonistas y agonistas selectivos de receptores colinérgicos nicotínicos.
3. Determinar la presencia de nAChRs postsinápticos mediante la aplicación local de acetilcolina en el núcleo RMTg.
4. Utilizar la técnica de imagenología de calcio para estudiar el efecto de la nicotina sobre la excitabilidad poblacional neuronal en el núcleo RMTg.
5. Esclarecer si existe una similitud entre los resultados observados en experimentos electrofisiológicos patch-clamp de célula única en comparación con la actividad poblacional del RMTg en presencia de nicotina.

Materiales y Métodos

3.1. Animales

Se emplearon ratas de la cepa Wistar de 21-25 días de edad (28-35gr) mantenidas en condiciones controladas de alimento, agua y ciclo de luz-obscuridad (12/12 horas), alojadas en el bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los experimentos se llevaron 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 en conformidad con lo estipulado por el Comité Interno para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (CICUAL) de la UNAM.

3.2. Obtención de rebanadas

Los sujetos experimentales fueron anestesiados con ketamina (85mg/kg) y xilacina (15mg/kg) vía intraperitoneal y enseguida fueron sacrificados mediante decapitación. Posteriormente, se realizó la extracción del cerebro el cual fue inmerso en una solución salina o Ringer a 4°C cuyo contenido en mM fue: 125 NaCl, 3 KCl, 25 NaHCO₃, 1.25 Na₂HPO₄, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 25 glucosa, pH=7.3, 300mOsm/L, saturada con una mezcla de 95 % O₂ y 5 % CO₂.

Mediante un vibratomo (Pelco 102, Ted Pella, INC), se obtuvieron rebanadas coronales de 250 μ m de grosor conteniendo el núcleo RMTg (Fig. 3.1A). Las rebanadas fueron mantenidas en la solución salina anteriormente descrita

a temperatura ambiente durante al menos una hora (periodo de estabilización del tejido), antes de la realización de los registros electrofisiológicos (Garduño et al., 2012).

3.3. Electrofisiología

Las rebanadas, que contenían el núcleo RMTg, fueron transferidas, una a la vez, a una cámara de registro montada en un microscopio y perfundidas con solución de Ringer a una tasa de 4-5 ml/min. Se realizaron experimentos electrofisiológicos por medio de la técnica de patch-clamp en la configuración de célula completa (whole cell), con fijación de voltaje y fijación de corriente, en neuronas del RMTg. Para el registro electrofisiológico, se emplearon micropipetas de vidrio (4-7 M Ω) llenadas con una solución interna cuyo contenido fue, (en mM): 140 K-gluconate, 5 NaCl, 1 MgCl₂, 0.02 EGTA, 10 HEPES, 2 Mg₂-ATP, 0.5 Na₂GTP, y 0.1 % biocitina, pH=7.2-7.3, 280-300 mOsm/L. Se utilizó un amplificador Multiclamp 700B (Axon Instruments). Las señales obtenidas se filtraron a 3 KHz y digitalizaron mediante una interfase análogo-digital (Digi-data 1422A; Molecular Devices) a una velocidad de muestreo de 5 KHz. Los datos fueron guardados en una computadora personal equipada con el software pClamp 10 (Molecular Devices). Las neuronas fueron visualizadas mediante un microscopio vertical (BX51WI; Olympus Instruments), equipado con un objetivo de inmersión en agua 80X. Como se trata de una estructura bilateral, se eligieron de manera indistinta las células ubicadas dentro del RMTg tanto del hemisferio izquierdo como del derecho. Las neuronas fueron primeramente registradas mediante la técnica de fijación de corriente para examinar sus características electrofisiológicas y calidad del sello formado. Se seleccionaron aquellas células que exhibieron potenciales de acción de breve duración (\approx 1ms) y disparo regular ante la aplicación de un pulso despolarizante, ya que éstas son características que se han descrito en las neuronas GABAérgicas de esta región. Además, sólo se seleccionaron neuronas que mostraron un sobretiro (overshoot) de 10-20 mV, para asegurar la viabilidad del sello. Una vez cumplidas estas condiciones, se cambió a la modalidad de fijación de voltaje para realizar el registro de las corrientes postsinápticas excitatorias espontáneas (sEPSCs). 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 pre-

sencia de gabazina ó picrotoxina ($10 \mu\text{M}$) para bloquear los receptores GABA_A y aislar las corrientes excitatorias mediadas por glutamato.

3.4. Administración de fármacos

Todos los fármacos fueron preparados el día del experimento y se aplicaron disueltos en la solución de Ringer, mediante un sistema de perfusión por gravedad. Después de tomar un registro control de 15 minutos la nicotina, sus agonistas y antagonistas se aplicaron durante 8-10 minutos (según el experimento), para asegurar que hubiera un equilibrio de la concentración de los fármacos en la cámara de registro. Después de esto, los fármacos se retiraron del baño de perfusión (lavado) y se continuó el registro por un periodo de al menos 30 minutos que fue tomado en cuenta para su análisis.

3.5. Aplicación local de acetilcolina

En algunos experimentos se aplicó acetilcolina (ACh) en el núcleo RMTg ($n=8$) y en la sustancia negra (SN, $n=5$) para explorar la presencia de nAChRs postsinápticos. La aplicación local se realizó utilizando una pipeta de vidrio de $2 \text{ M}\Omega$ de resistencia (pipeta de aplicación), llena con una solución de Ringer conteniendo ACh (1 mM). La pipeta de aplicación estaba conectada a un microinector de presión (Mod. IM300, Narishige, Japón). La pipeta de aplicación se colocó aproximadamente a $50 \mu\text{m}$ de distancia de la neurona registrada utilizando un micromanipulador y se aplicó un “puff” de ACh de 0.5 psi de presión (500 ms de duración). Las corrientes evocadas por la aplicación local de ACh se registraron manteniendo la neurona a un potencial de mantenimiento de -70 mV . Estos experimentos se realizaron en presencia de atropina ($5 \mu\text{M}$) y tetrodotoxina (TTX, 500 nM). Para bloquear la posible participación de receptores muscarínicos y eliminar efectos indirectos de la acetilcolina dependientes de potenciales de acción.

3.6. Inmunohistoquímica

Durante el registro electrofisiológico, las células fueron marcadas con biocitina (0.5% disuelta en la solución interna de la micropipeta) mientras su actividad fue registrada. Una vez terminado el experimento electrofisiológico, las rebanadas se fijaron en paraformaldehído al 4% y ácido pícrico al 1% en un amortiguador de fosfatos (PBS 0.1 M) con pH=7.4, durante 24 hrs. Posteriormente la rebanada se lavó con PBS y se mantuvo en sacarosa al 30% durante 30 minutos. Después, el tejido se incluyó en un bloque de agar para obtener rebanadas de 40 μm de grosor mediante un vibratomo (Serie 1000). Las rebanadas obtenidas se incubaron 4 a 6 horas en una mezcla de PBS con Triton X-100 (0.2%) y streptavidina conjugada a Cy3 (1 mg/ml; Zymed) diluida 1:100, para el marcaje de 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} (anti-rabbit; ImmunoStar) diluido 1:1000, durante 2 días. Transcurrido este periodo, las rebanadas se enjuagaron con PBS y fueron reincubadas por 2 horas con un anticuerpo secundario (anti-rabbit) conjugado a fluorescencia (Alexa) diluido 1:100 (Vector Laboratories). Luego, las rebanadas se colocaron en portaobjetos utilizando un medio de montaje (Vectashield; Vector Laboratories) y fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia, para la identificación de la neurona marcada con el anticuerpo secundario. Finalmente, la célula marcada se examinó por medio de un microscopio confocal y las imágenes se digitalizaron y almacenaron en una computadora personal.

3.7. Imagenología de calcio

Una vez transcurrido el periodo de estabilización del tejido las rebanadas fueron incubadas en la obscuridad durante 20-30 minutos a una temperatura de $\approx 30^\circ\text{C}$ en una solución conteniendo fluo 4-AM (1-10 μM) (Invitrogen, Life technologies), disuelto en 0.1% de dimetilsulfóxido (DMSO) y solución Ringer. Posteriormente, cada rebanada se colocó sobre una cámara de registro (plexiglas) y se perfundió con solución de Ringer a una tasa de 4-5 ml/min a temperatura ambiente, mediante un sistema de perfusión por gravedad. Para la visualización de células y la obtención de los videos de fluorescencia se utilizó un microscopio vertical (Nikon FN1 Eclipse), provisto con un objetivo 16X de inmersión

en agua. El campo que podrá ser observado será de $280 \times 260 \mu\text{m}$. Para obtener los cambios de fluorescencia, el tejido fue estimulado con pulsos de luz de 488 nm de longitud de onda (15-30 ms de exposición) mediante una lámpara LED (Lambda HpX L5, Sutter Instruments) conectada mediante fibra óptica al microscopio. Los videos se realizaron mediante una cámara digital CCD (Cold SNAP MYO, Photometrics), controlada mediante un software personalizado y programado en el ambiente LabView (National Instruments). La frecuencia de adquisición de imágenes fue de 4 frames por segundo y los videos tuvieron una duración de 6 minutos (1440 frames). Al finalizar el experimento se colocó una solución de alto potasio (5 mM), para el cálculo total de neuronas que captaron el indicador de calcio dentro del campo de registro. La actividad fue estimada mediante los transitorios de calcio generados por las neuronas. Las señales de fluorescencia dependientes a calcio se calcularon como $(F_i - F_o)/F_o$, donde F_i es la fluorescencia en cualquier cuadro de video y F_o es dado por la fluorescencia basal.

3.8. Análisis de imágenes

En cada video, las células activas se seleccionaron usando un templete circular de tamaño variable ($4\text{-}30 \mu\text{m}$). Un mapa de coordenadas de neuronas activas fue generado automáticamente a partir de las imágenes utilizando el software Im-Patch (Fig. 3.1C; Perez-Ortega et al., 2016). Las señales de calcio intracelular (transitorios de calcio) de cada región de interés fueron colectadas en el tiempo (Fig. 3.1D). Los transitorios de calcio y su primera derivada son tomados como indicadores del disparo neuronal (Carrillo-Reid et al., 2008). Solo aquellos transitorios con amplitudes mayores a 2.5 veces la desviación estándar del ruido basal, se consideraron para el análisis. El fotoblanqueo (bleaching), el fenómeno de los discos de Airy y el ruido fueron corregidos al restar el fondo local de la neurona de interés a la señal cruda de la misma. A partir de las derivadas de los transitorios de calcio, para cada experimento se construyó una matriz binaria de ceros (0) y unos (1) en la cual cada fila representa una neurona activa y cada columna una ventana de tiempo (frame) y donde 1 representa un frame activo y 0 un frame inactivo para cada neurona. El eje “y” en la matriz representa el número de neuronas activas mientras que el eje “x” representa el número de frames del video. Las matrices se utilizaron para generar gráficas tipo raster

(rasterplots) que ilustran la actividad de las células a lo largo del experimento.

3.9. Análisis estadístico

En los experimentos electrofisiológicos, la captura de los datos se llevó 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 fueron: Origin version 8 (OriginLab Corporation, Wellesley Hills MA), Igor Pro 6 (WaveMetrics Inc, Lake Oswego, OR) y GraphPad Prism 6 (San Jose CA, USA). Los datos obtenidos de los experimentos de imagenología de calcio fueron analizados utilizando rutinas personalizadas elaboradas en MatLab (Math Works) para analizar estadísticamente la actividad de células individuales, así como la actividad de la población total de células en todos los experimentos realizados (Aparicio-Juarez et al., 2017). Los datos fueron expresados como media \pm error estándar. Las comparaciones estadísticas entre muestras electrofisiológicas fueron hechas utilizando la prueba t de student, en el caso del análisis de imagen de calcio se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para comprobar la distribución normal de las muestras experimentales, y la comparación entre condiciones se realizó mediante la prueba Kruskal-Wallis. Finalmente para la comparación entre los gráficos de caja se realizó mediante la prueba de Friedman. Un valor de $p < 0.05$ fue tomado como estadísticamente significativo. Finalmente, para cada grupo experimental de imagenología de calcio, se realizó un histograma de coactividad de todas las células por frame. Mediante el algoritmo de Monte Carlo (1000 simulaciones) se determinó un umbral de significancia para el número de células coactivas (picos de sincronía). El umbral corresponde a un nivel de significancia de $p < 0.05$, que representa la probabilidad de que los picos de coactividad hayan ocurrido al azar.

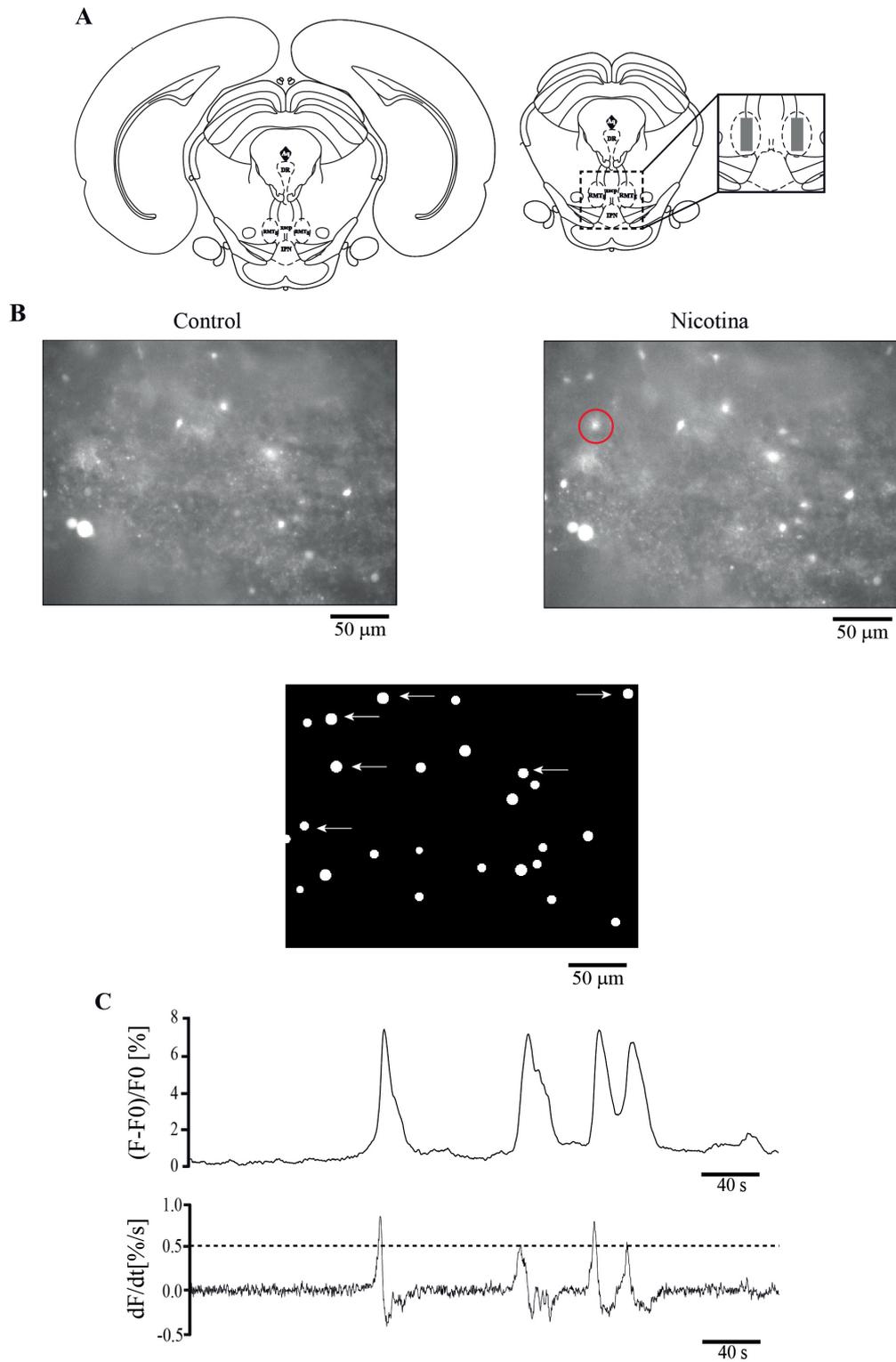


Figura 3.1: Técnica de imagenología de calcio.

A) Diagrama de las regiones del cerebro de ratona donde fueron realizados el análisis de imágenes de los transitorios de calcio. B) Fragmento de video de células del núcleo RMTg durante dos condiciones control (lado izquierdo) y en presencia de nicotina (lado derecho). C) Mapa de coordenadas de neuronas activas, las células que incrementaron su actividad durante nicotina son señaladas con flechas blancas. D) Transitorios de calcio a través del tiempo de una célula representativa (círculo rojo), la variación porcentual de la fluorescencia (superior), cambio de nivel de fluorescencia con respecto al tiempo o derivada (inferior).

Resultados

4.1. Electrofisiología

Para la obtención del registro individual de las corrientes postsinápticas excitatorias espontáneas (sEPSCs) se registraron 72 células en la región correspondiente al núcleo RMTg. La identificación de estas células registradas fue realizada de acuerdo a sus características electrofisiológicas: tasa de disparo (≈ 18 Hz en promedio) y duración de potencial de acción (1 ms).

4.1.1. La nicotina afecta la frecuencia de las sEPSCs en las células GABAérgicas del núcleo RMTg

Para observar el efecto de la nicotina sobre las células GABAérgicas del núcleo RMTg, se agregó nicotina ($1\mu\text{M}$) en la solución de perfusión. La figura 4.1A muestra trazos de corriente de una sola célula en condiciones control, en presencia de nicotina y posteriormente el lavado. Puede observarse un incremento en la frecuencia de las sEPSCs producido por nicotina (trazo medio) y un lavado del efecto 20 minutos después de retirar la droga del baño. Una fracción del trazo correspondiente al efecto de la nicotina se muestra a un barrido más lento (recuadro rojo). Aquí se aprecia la cinética característica de las corrientes sinápticas, las cuales exhiben una fase ascendente rápida de $\approx 1\text{ms}$ de duración, seguida de una fase de decaimiento de aproximadamente 12 ms. La nicotina produjo un incremento en la frecuencia de las sEPSCs del $174 \pm 26\%$

con respecto al control (Fig.4.1B; $n=17$, $p<0.05$, t de student). El efecto persistió de 20 a 40 minutos después del lavado y posteriormente decrementó a valores basales. La gráfica de la distribución acumulada de los intervalos inter-evento (Fig.4.1C) muestra que la nicotina produjo un desplazamiento de la curva hacia la izquierda trazo (línea roja) con respecto al control (línea negra) mientras que la distribución acumulada de la amplitud no se modificó (Fig.4.1D). Esto demuestra que la nicotina incrementa la frecuencia de las sEPSCs pero no la amplitud de las mismas lo cual sugiere un efecto presináptico (Garduño et al., 2012).

Posteriormente, diecisiete de las células utilizadas fueron procesadas mediante un marcaje inmunohistoquímico para determinar su naturaleza GABAérgica, obteniendo un resultado de 15 células (88 %) con un marcaje positivo (Fig.4.1E).

Para corroborar la naturaleza de las corrientes excitatorias, en algunos experimentos se agregó CNQX ($10\mu\text{M}$) después del lavado, un antagonista competitivo de los receptores AMPA/kainato. La adición de CNQX suprimió por completo las sEPSCs (Fig.4.1F), comprobando que éstas son de naturaleza glutamatérgica y mediadas por receptores AMPA/kainato.

Para descartar la presencia de nAChRs postsinápticos en las neuronas del RMTg, se realizaron experimentos de aplicación local de acetilcolina (ACh, 1 mM) directamente sobre el soma de células GABAérgicas (Fig. 4.1G, ver Material y Métodos). Como puede observarse, la aplicación local de ACh no provocó corrientes nicotínicas en el RMTg lo cual demuestra que no hay presencia de nAChRs postsinápticos en este núcleo. Como control, también se realizó la aplicación local de ACh en el área ventral tegmental (VTA), núcleo cuyas células expresan en el soma nAChRs tanto del subtipo $\alpha 7$ como $\alpha 4\beta 2$ (Matsubayashi et al., 2003; Wooltorton et al., 2003; Dani A., 2006). La aplicación local de ACh en el VTA produjo una corriente rápida seguida de una lenta y de baja amplitud que corresponden a las corrientes nicotínicas mediadas por receptores $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$, respectivamente (Wooltorton et al., 2003).

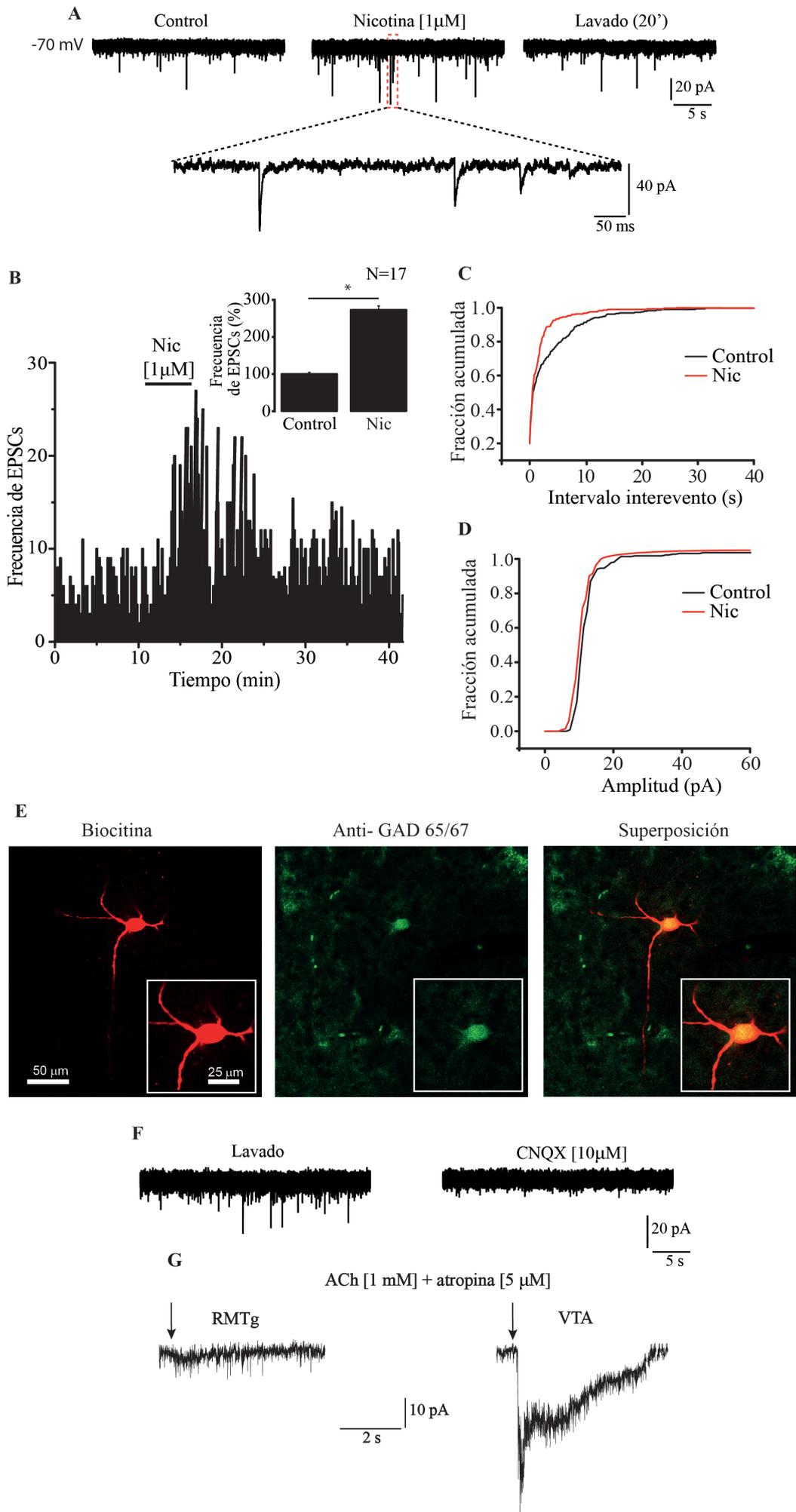


Figura 4.1: Efecto de la nicotina sobre la actividad eléctrica de células del núcleo RMTg

A) Trazos de corriente obtenidos en fijación de voltaje de las sEPSCs de la una neurona representativa en condiciones control (izquierda), adición de nicotina (medio) y lavado (derecha). El inserto muestra una ampliación de un fragmento del registro de las sEPSCs, delimitado por la caja en rojo y en presencia de nicotina. B) Histograma de frecuencia de la misma célula durante la adición de nicotina ($1\mu\text{M}$). La nicotina incrementa la frecuencia de las sEPSCs. El inserto se muestra la gráfica de barras ilustrando el efecto de la nicotina sobre las sEPSCs en comparación con la fase control. Todos los experimentos fueron hechos en presencia de gabazina ó picrotoxina ($10\mu\text{M}$). C-D) Gráficas de fracción acumulada del intervalo interevento y la amplitud de las sEPSCs durante la fase control (negro) y después de la adición de nicotina (rojo). E) Célula representativa del marcaje inmunohistoquímico para biocitina (panel izquierdo), marcaje con anticuerpo anti-GAD_{65/67} (panel medio) y la sobreposición de ambas marcas (panel derecho). F) Trazos de corriente en fijación de voltaje mostrando el bloqueo de las sEPSCs por CNQX ($10\mu\text{M}$) administrado después de la fase de lavado. H) Trazo de corriente representativo durante la aplicación local de ACh (1mM) y atropina ($5\mu\text{M}$) en una célula del núcleo RMTg (izquierda) y VTA (derecha) como control positivo de la presencia de nAChRs en el soma de las células.

4.1.2. El antagonismo de los nAChRs tipo $\alpha 7$, previene los efectos de la nicotina sobre las células del núcleo RMTg.

Para determinar el subtipo de receptor involucrado en los efectos de la nicotina sobre las células del núcleo RMTg, se administró en la solución de perfusión, metilcaconitina (MLA, 100 nM), un antagonista selectivo los nAChRs del subtipo $\alpha 7$.

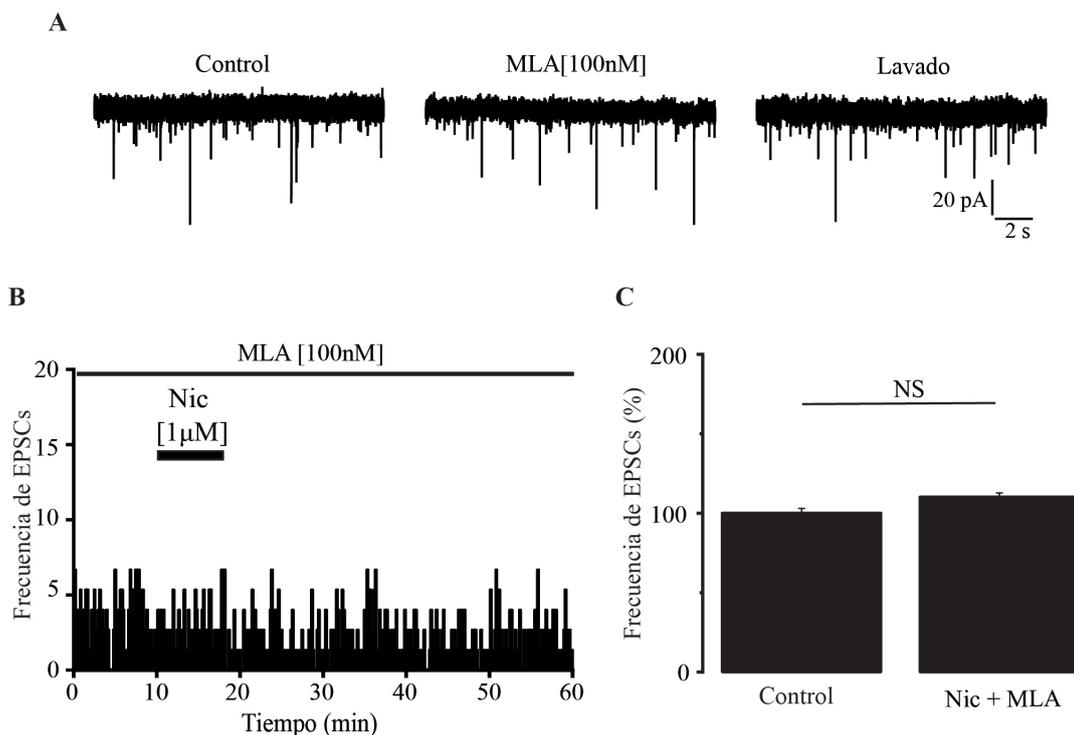


Figura 4.2: Los efectos de la nicotina sobre las sEPSCs son bloqueados por un antagonista selectivo a nAChRs del subtipo $\alpha 7$.

A) Trazos de corriente obtenidos en fijación de voltaje que muestran las sEPSCs de una célula en condiciones control (izquierda), adición de nicotina en presencia de MLA (medio) y lavado (derecha). B) Histograma de frecuencia de una célula representativa durante la adición de nicotina ($1\mu\text{M}$) en presencia de MLA (100nM). La MLA suprime los efectos de la nicotina sobre la frecuencia de las sEPSCs. C) Grafica de barras mostrando que la nicotina, en presencia de la MLA, no tuvo un efecto significativo sobre la frecuencia de las sEPSCs. Todos los experimentos fueron hechos en presencia de gabazina ó picrotoxina ($10\mu\text{M}$).

Después de 10 minutos, se agregó nicotina ($1\mu\text{M}$). Al agregar nicotina en presencia de MLA no hubo variación significativa en la frecuencia de sEPSCs en -comparación con el control (Fig. 4.2A-C), es decir, antes de agregar nicotina (control vs nicotina, $n=6$, $p>0.05$, t de student). Por lo tanto, la MLA bloqueó el incremento en la frecuencia de las sEPSCs en neuronas del núcleo RMTg producido por la nicotina (Fig. 4.1B). Esto sugiere que el efecto excitador de la nicotina está mediado por nAChRs del subtipo $\alpha 7$.

4.1.3. La adición de un agonista selectivo a receptores $\alpha 7$, tiene efectos similares a los de la nicotina sobre las células del núcleo RMTg.

Para confirmar que el efecto observado de la nicotina sobre las sEPSCs es mediado por los nAChRs tipo $\alpha 7$, en otro grupo experimental se administró el fármaco PNU-282987 (PNU, 100 nM), un agonista altamente selectivo para los receptores tipo $\alpha 7$.

El PNU, por sí solo, mimetizó el efecto de la nicotina causando un incremento del $69\% \pm 6$ en las sEPSCs (Fig. 4.3A-C). Si bien el incremento es menor comparado con el efecto provocado por la nicotina, éste sigue siendo estadísticamente significativo (control vs PNU, $n=5$, $p<0.05$, t de student). De manera similar a la nicotina, la adición de PNU provocó el desplazamiento hacia la izquierda de la curva en el gráfico de fracción acumulada del intervalo inter-evento (4.3D), pero no modificó la amplitud (4.3E).

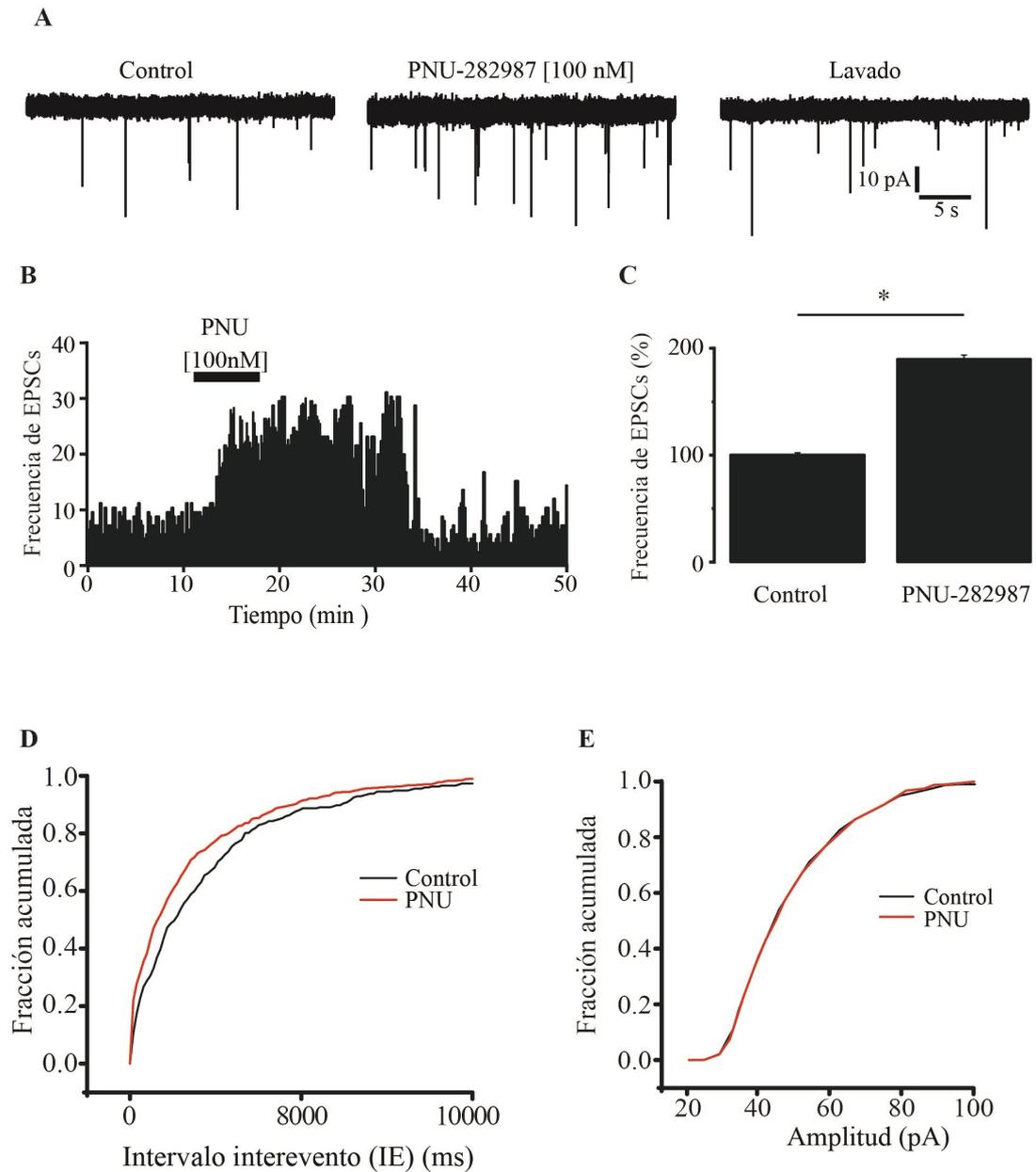


Figura 4.3: Un agonista selectivo de los nAChRs tipo $\alpha 7$ mimetiza los efectos de la nicotina en las sEPSCs de las células del núcleo RMTg.

A) Trazos de corriente en la modalidad de fijación de voltaje de las sEPSCs en condiciones control (izquierda), adición de PNU (medio) y posteriormente lavado (derecha). B) Histograma de frecuencia de la misma célula durante la adición de PNU-282987 (100 nM). La presencia de PNU incrementa la frecuencia de las sEPSCs. C) Gráfica de barras mostrando el efecto del PNU sobre las sEPSCs en comparación con la fase control. Todos los experimentos fueron hechos en presencia de gabazina ó picrotoxina (10 μ M). D-E) Graficas de fracción acumulada del intervalo interevento y amplitud de las corrientes sEPSCs durante la fase control (negro) y después de la adición de PNU (rojo).

4.1.4. El antagonismo específico a receptores tipo $\alpha 4\beta 2$, no previene los efectos de la nicotina sobre las células GABAérgicas del núcleo RMTg.

Otro de los principales nAChRs localizados en el SNC son los conformados por las subunidades $\alpha 4\beta 2$ (Miller y Piccioto, 2016).

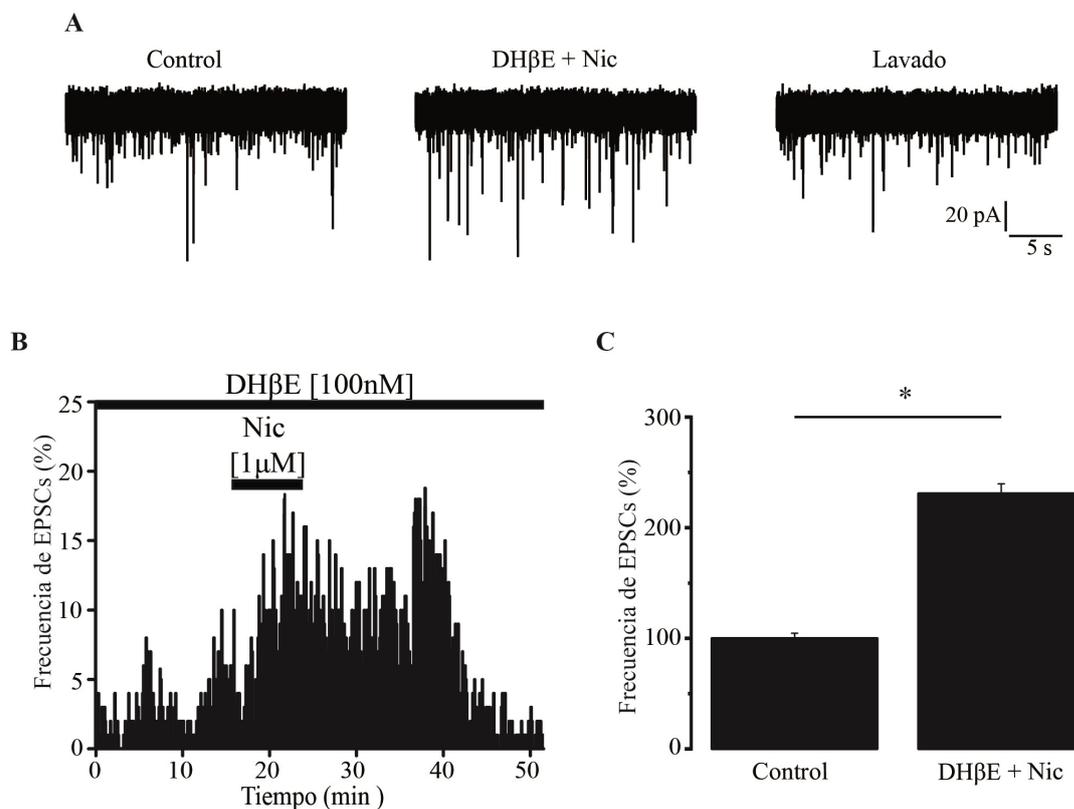


Figura 4.4: La presencia de un antagonista selectivo a nAChRs tipo $\alpha 4\beta 2$ no previene los efectos de la nicotina sobre las sEPSCs.

A) Trazos de corriente en la modalidad de fijación de voltaje de las sEPSCs de una célula en condiciones control (izquierda), adición de nicotina en presencia de DH β E (medio) y lavado (derecha). B) Histograma de frecuencia de una célula representativa durante la adición de nicotina (1 μ M) en presencia de DH β E (100 nM). La DH β E no suprime los efectos de la nicotina sobre la frecuencia de las sEPSCs. C) Grafica de barras mostrando el efecto de la nicotina aún en presencia del DH β E sobre las sEPSCs. Todos los experimentos fueron hechos en presencia de gabazina ó picrotoxina (10 μ M).

Para esclarecer si estos receptores tienen participación en los efectos provocados por la nicotina se aplicó, en el medio de perfusión, dihidro- β -eritroidina (DH β E, 100nM), un antagonista selectivo de receptores tipo $\alpha 4\beta 2$ y posteriormente se agregó nicotina. Aún en presencia de este antagonista, la nicotina incrementó las sEPSCs en un porcentaje de $149 \pm 12\%$; Fig. 4.4A-C) lo cual sugiere que el efecto de la nicotina sobre la excitabilidad del núcleo RMTg, no es mediado a través de nAChRs $\alpha 4\beta 2$ (control vs nicotina + DH β E, n=5, p<0.05, t de student).

4.1.5. Un agonista selectivo a receptores $\alpha 4\beta 2$, no tiene efecto sobre las sEPSCs en células del núcleo RMTg.

Para corroborar que los nAChRs conformados por las subunidades $\alpha 4\beta 2$ no tiene participación en el incremento de sEPSCs en células del núcleo RMTg, se agregó a la solución de perfusión RJR-2403 (RJR, 100nM), un agonista selectivo a receptores $\alpha 4\beta 2$.

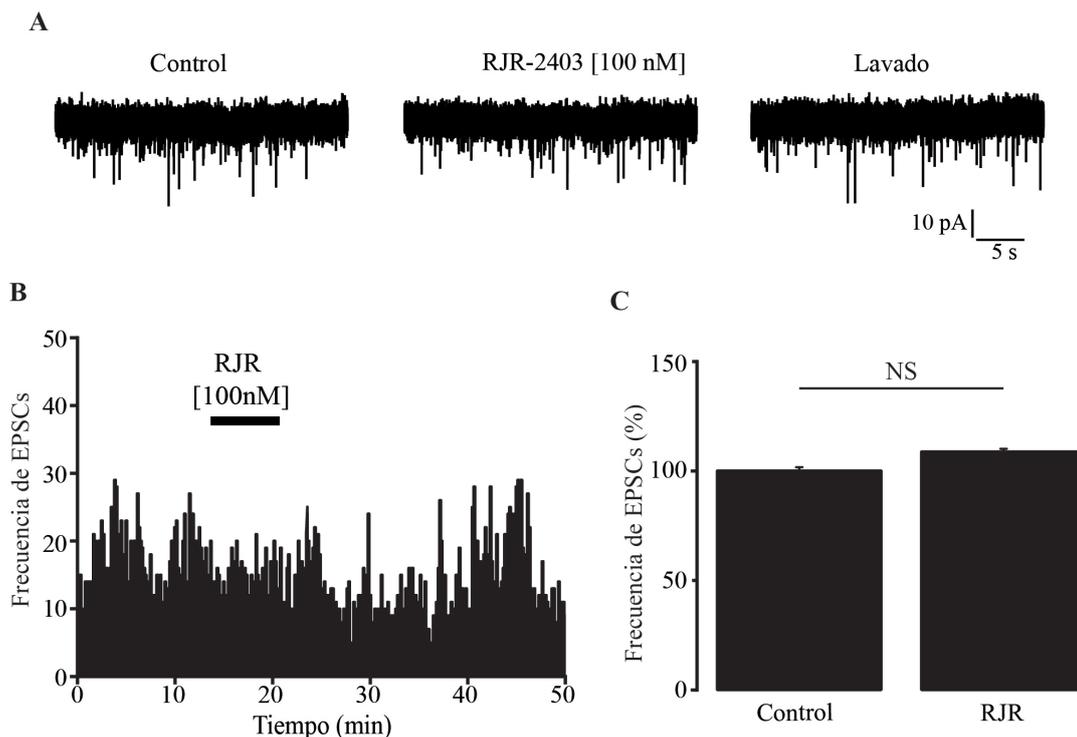


Figura 4.5: Un agonista con alta afinidad por los nAChRS tipo $\alpha 4\beta 2$ no imitiza los efectos de la nicotina.

A) Trazos de corriente obtenidos en fijación de voltaje de las sEPSCs de una célula en condiciones control (izquierda), adición de RJR (medio) y lavado (derecha). B) Histograma de frecuencia de la misma célula durante la adición de RJR-2403 (100 nM). C) Gráfica de barras mostrando el efecto del RJR sobre las sEPSCs en comparación con la fase control. Todos los experimentos fueron hechos en presencia de gabazina ó picrotoxina (10 μ M).

La aplicación de RJR no provocó ningún cambio en la frecuencia ni en el porcentaje de las sEPSCs en células del núcleo RMTg (Fig.4.5 B y C, control vs RJR (n=5, $p > 0.05$, t de student). Esto confirma la idea de que los nAChRs $\alpha 4\beta 2$ no participan en los efectos de la nicotina sobre las sEPSCs en las células del núcleo RMTg.

4.2. Imagenología de Calcio

4.2.1. La nicotina incrementa el disparo neuronal poblacional en el núcleo RMTg

Para estudiar los efectos de la nicotina sobre la actividad poblacional en el núcleo RMTg, se realizaron experimentos de imagenología de calcio.

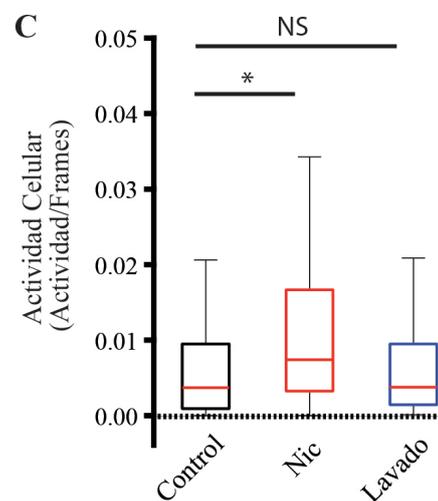
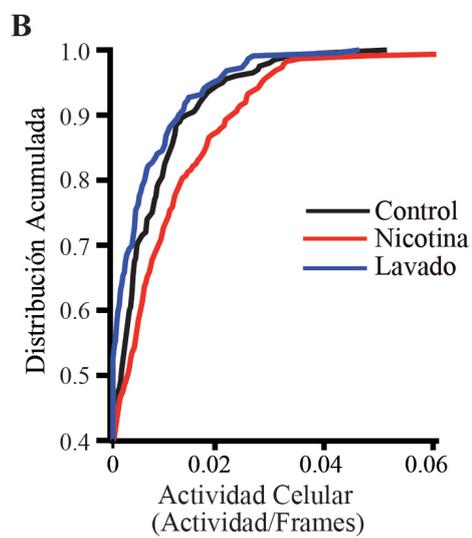
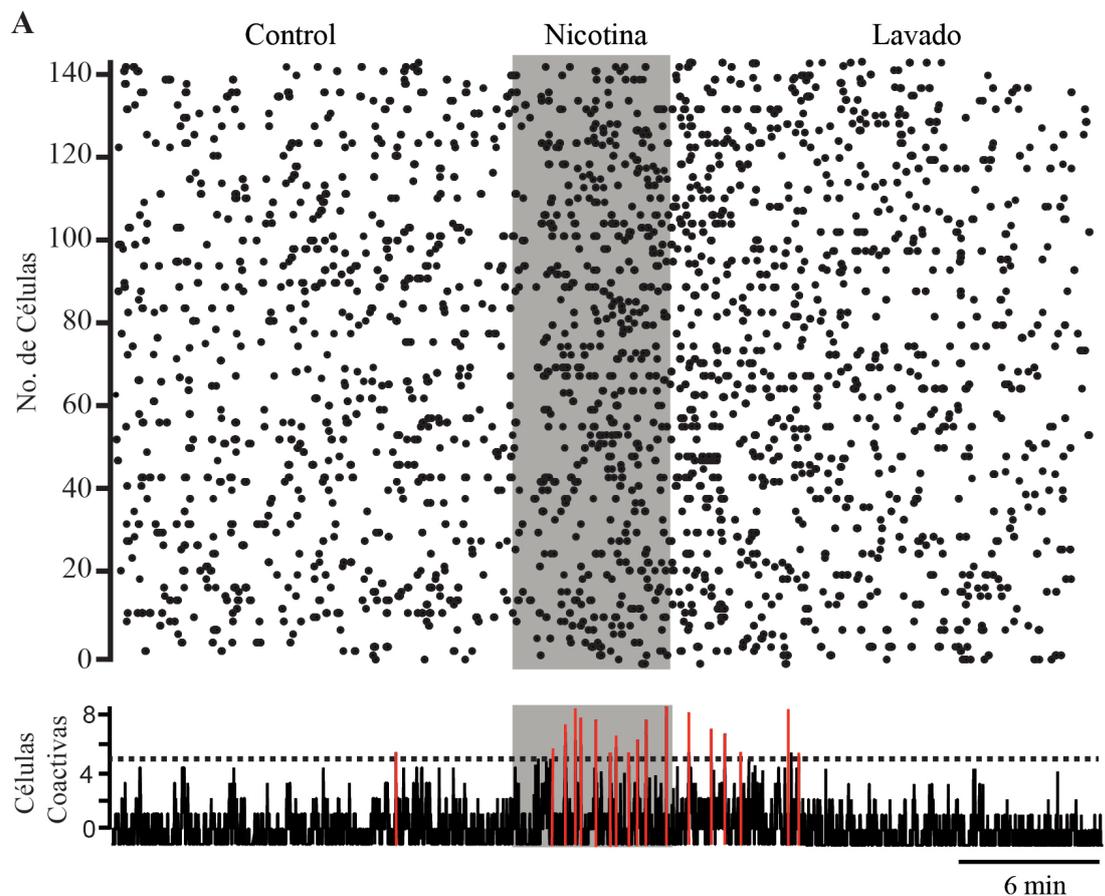


Figura 4.6: Registro poblacional de la actividad neuronal producida por nicotina en el núcleo RMTg.

A) Diagrama tipo ráster que representa la actividad celular espontánea a través del tiempo, el eje de las ordenadas representa el número de célula y eje de las abscisas el tiempo. Cada punto representa como la activación de la célula en un frame (ventana de tiempo de 250 ms). El histograma debajo muestra el número de células que dispararon juntas en cada ventana de tiempo (frame). En rojo se observan los picos de sincronía significativos. B) Gráfica de distribución acumulada para cada condición, el desplazamiento a la derecha significa un incremento de la actividad neuronal. La actividad es determinada dividiendo el número de frames en las cuales se observó actividad sobre el número total de frames (obtenidos de todo el video) para cada célula. C) Gráfica de cajas donde se representa la actividad celular en 3 diferentes condiciones, se muestra un incremento de actividad durante la presencia de nicotina en comparación con el control (*p = 0.0001, prueba de Friedman, 142 células).

Primeramente, se probó solo el efecto de la nicotina (1 μ M). La figura 4.6A es una gráfica tipo raster que muestra la actividad espontánea de 142 células registradas de un total de 6 experimentos, en tres diferentes condiciones: control, nicotina y lavado (remoción de la nicotina). Tras agregar nicotina, se produjo un incremento significativo de la actividad neuronal poblacional del 71 % (control vs nicotina n=142, p<0.001, Kruskal-wallis). El histograma debajo del raster muestra los picos de coactividad, los cuales representan el número de células que dispararon juntas en el mismo frame, estos picos solamente son significativos si pasan el umbral de significancia (Prueba de Montecarlo, ver Material y Métodos). Durante la presencia de nicotina los picos de sincronía se ven incrementados. El efecto de la nicotina se prolongó 12-20 minutos y finalmente se revirtió después del lavado (Fig. 4.6A). La gráfica de la distribución acumulada de la actividad celular muestra que la nicotina desplazó la curva hacia la derecha (Fig. 4.6B, trazo rojo) indicando un incremento en la probabilidad de la actividad neuronal que se revierte después del lavado (trazo azul). El efecto de la nicotina también puede observarse en la gráfica de cajas (Fig. 4.6C). El incremento en la probabilidad de la actividad producido por la nicotina fue significativamente diferente del control y del lavado (p <0.001, prueba de Friedman).

4.2.2. Los efectos de la nicotina sobre las poblaciones celulares del núcleo RMTg son prevenidos por un antagonista selectivo a los nAChRs α 7.

Para corroborar los resultados electrofisiológicos, en una serie de experimentos de imagenología de calcio se administró nicotina en presencia del antagonista de los nAChRs α 7 MLA [100 nM].

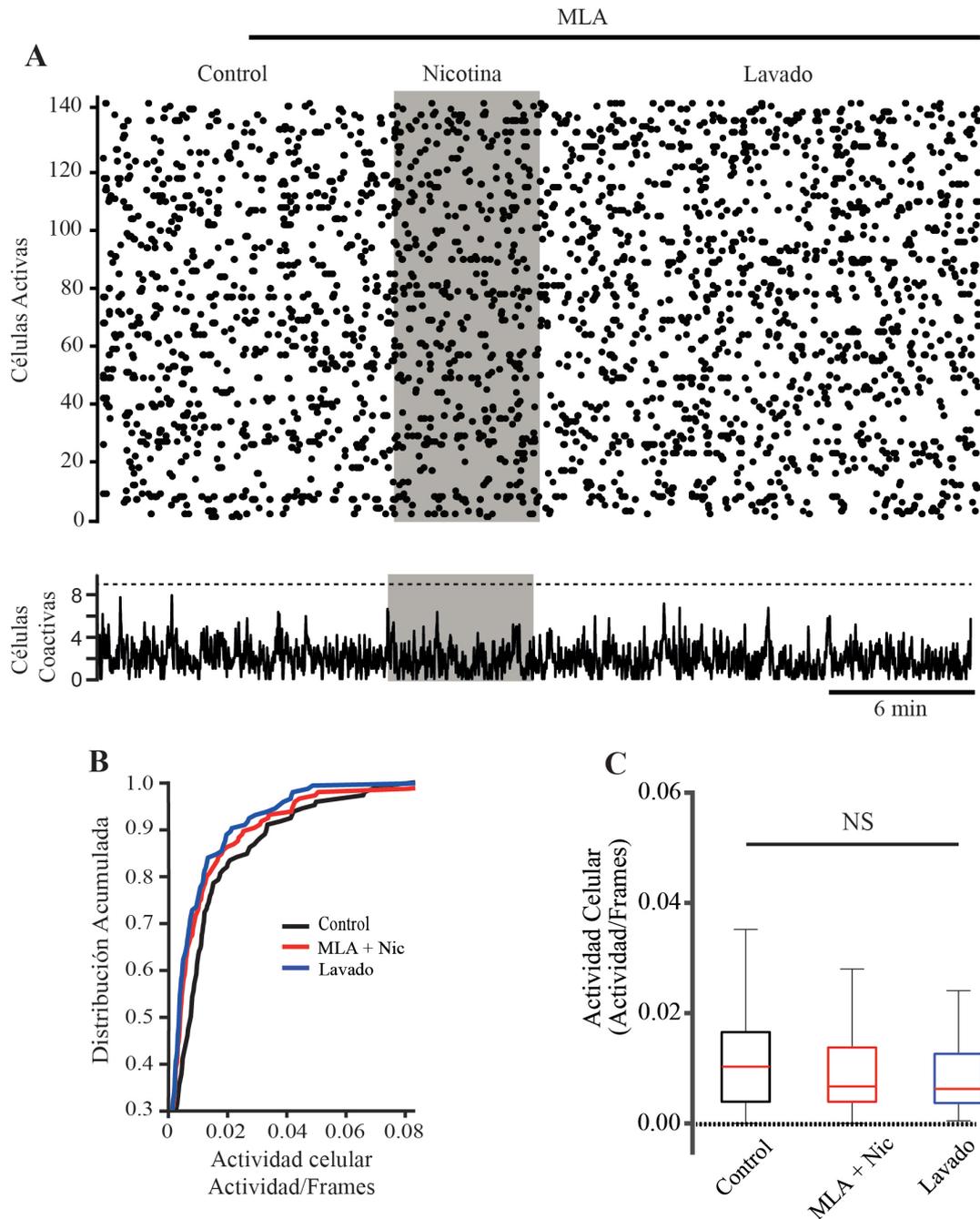


Figura 4.7: Registro poblacional de la actividad neuronal producida por nicotina en presencia de MLA en el núcleo RMTg.

A) Diagrama tipo ráster que representa la actividad celular a través del tiempo, el eje de las ordenadas representa el número de célula y eje de las abscisas el tiempo. Cada punto es considerado como la activación de la célula. El histograma debajo representa muestra el número de células activas en el mismo periodo de tiempo. El MLA previno los picos de sincronía provocados por la nicotina. B) Gráfica de distribución acumulada para cada condición. C) Gráfica de cajas donde se representa la actividad celular en 3 diferentes condiciones. No se muestra un cambio significativo en la actividad celular durante la presencia de nicotina o el lavado con respecto al control ($p = 0.06$, prueba de Friedman, 145 células).

Los resultados se muestran en la gráfica tipo raster que ilustra la actividad espontánea de 145 células obtenidas de 5 experimentos (Fig. 4.7A). En presencia de MLA, la nicotina no fue capaz de incrementar la actividad neuronal ($p > 0.05$, Kruskal-wallis). De manera interesante, también la presencia de

MLA previno los picos de sincronía causados por la nicotina. La gráfica de la distribución acumulada de la actividad celular no muestra un desplazamiento de la curva por nicotina (Fig. 4.7B), como tampoco se obtuvieron diferencias significativas en la gráfica de cajas (Fig. 4.7C; $p > 0.05$, prueba de Friedman). Los resultados obtenidos mostraron que en presencia de MLA, la nicotina no produce cambios en la probabilidad de la actividad neuronal ya que no hubo diferencias estadísticamente significativas de la nicotina con respecto al control y el lavado.

Discusión

El principal hallazgo de este trabajo de tesis es que la nicotina produce un aumento en la liberación de glutamato y en consecuencia un incremento en la actividad poblacional del núcleo RMTg. La nicotina incrementó las corrientes postsinápticas excitatorias (sEPSCs) registradas en las células GABAérgicas del núcleo RMTg. La concentración de nicotina ($1 \mu\text{M}$) utilizada en nuestros experimentos, se encuentra dentro del rango fisiológico ya que es la máxima concentración que se alcanza en el plasma de un fumador inmediatamente después del consumo de un cigarrillo (Dani y Heinemann, 1996). Nuestros datos demostraron que las sEPSCs son mediadas por glutamato ya que tras la administración de CNQX, un antagonista de los receptores glutamatérgicos AMPA/kainato, desaparece toda actividad espontánea (Fig.4.1F). La nicotina provocó un cambio en la frecuencia, pero no en la amplitud de las sEPSCs lo cual demuestra que el efecto nicotínico es presináptico (ver Garduño et al., 2012). Esto fue confirmado por la demostración de que la aplicación local de acetilcolina directamente sobre el soma de las neuronas GABAérgicas del RMTg no produjo corrientes mediadas por nAChRs lo cual si pudo observarse en neuronas del VTA (ver Fig. 4.1G). Además, nuestros datos demostraron que el incremento de actividad inducido por la nicotina es bloqueado por el antagonista selectivo a los nAChRs $\alpha 7$ (MLA) pero no por el antagonista de los receptores $\alpha 4\beta 2$ (DHBE; Fig.4.2 y 4.4). De manera consistente, la aplicación de PNU-282987, un agonista selectivo de los receptores nicotínicos $\alpha 7$ mimetizó el efecto de la nicotina mientras que la administración de RJR-2403, agonista de receptores $\alpha 4\beta 2$, no produjo ningún efecto. Estos datos son congruentes con un estudio previo en el cual se reportó que la nicotina aumenta la respuesta sináptica evo-

cada mediante estimulación y que este efecto es antagonizado por MLA (Lecca et al., 2012). Como se mencionó anteriormente, los receptores nicotínicos tipo $\alpha 7$ poseen 10 veces más permeabilidad al calcio que los receptores $\alpha 4\beta 2$. La cantidad de calcio que entra a través de los receptores $\alpha 7$ es capaz de producir liberación de calcio de las pozas intracelulares mediante un proceso que se llama liberación de calcio inducida por calcio (CICR), lo cual facilita la liberación del neurotransmisor sin la participación de los canales de calcio dependientes de voltaje como ocurre en los receptores $\alpha 4\beta 2$ (Gray et al., 1996; Sharma y Vijayaraghavan, 2003; Sharma et al., 2008; Garduño et al., 2012). Por lo tanto, este es el mecanismo que proponemos, mediante el cual la nicotina incrementa la eficiencia sináptica de las terminales glutamatérgicas en el núcleo RMTg.

Estos hallazgos son congruentes con reportes previos que indican que los nAChRs se localizan preferentemente en terminales axónicas donde regulan la liberación de neurotransmisores (Wonnacot et al., 2008). Por ejemplo, se ha reportado que los nAChRs, se encuentran en terminales presinápticas, donde inducen la liberación de glutamato en células del VTA, el NAc, la amígdala, el hipocampo y la corteza prefrontal (Mansvelder y McGehee, 2002). Los datos aquí presentados demuestran que en el núcleo RMTg ocurre de manera similar. Las terminales glutamatérgicas de la LHb son moduladas por la activación de nAChRs tipo $\alpha 7$. Estas terminales glutamatérgicas tienen como blanco principal a las células GABAérgicas del núcleo RMTg sobre las cuales ejercen un efecto excitatorio a través de receptores AMPA/kainato (Balcita-Pedicino et al., 2011; Lecca et al., 2011). Acorde con esto, la estimulación optogénica de terminales provenientes de LHb evoca corrientes excitatorias postsinápticas (EPSC) en las células GABAérgicas del núcleo RMTg (Lammel et al., 2012).

En los experimentos electrofisiológicos, el monitoreo de la actividad celular solamente se puede hacer registrando una neurona a la vez. En el presente estudio se utilizó, además, la técnica de imagenología de calcio la cual permite registrar la actividad de docenas de neuronas simultáneamente. De manera que es posible examinar cómo se comporta una determinada población neuronal. Se sabe que los transitorios de calcio y su derivada se correlacionan con el disparo repetitivo de potenciales de acción de las células (Carrillo-Reid et al., 2008, Perez- Ortega et al., 2016). Los resultados de los experimentos de imageno-

logía de calcio fueron congruentes con lo reportado en nuestros experimentos electrofisiológicos. La nicotina produjo una activación global poblacional en las neuronas del núcleo RMTg. Además, aumentó los picos de sincronía lo cual es muy importante, pues significa que un aumento en la eficiencia en la liberación sináptica de glutamato, producido por la nicotina, provoca que decenas de neuronas del núcleo RMTg disparen de manera sincronizada. El efecto fue bloqueado por (MLA) un antagonista selectivo de los receptores nicotínicos tipo $\alpha 7$. El efecto de la nicotina fue persistente, es decir, la duración del incremento de la actividad fue de 20-30 minutos después del lavado de la droga, lo cual es consistente con los resultados electrofisiológicos.

Como se mencionó previamente, los estímulos aversivos, así como señales que los predicen, promueven la activación fásica en el núcleo RMTg y por consiguiente una inhibición de la actividad DA del mesencéfalo tanto en murinos (Barrot et al., 2015; Brown y Shepard, 2013; Jhou et al., 2009) y primates (Hong et al., 2011).

En experimentos conductuales, se ha observado que el incremento de la actividad celular del núcleo RMTg produce aversión de lugar y decrementa las propiedades reforzadoras de la sacarosa (Stamatakis y Stuber, 2012). También, se ha demostrado que induce conductas tipo depresivas como el incremento de la inmovilidad en la prueba de suspensión de cola, amplifica el rechazo social inducido por el paradigma de derrota social (Cui et al., 2014; Jhou et al., 2013). Por lo tanto, un incremento en la actividad neuronal del núcleo RMTg promueve conductas tipo depresivas y ansiosas. El presente trabajo demostró que la nicotina incrementa la liberación de glutamato mediante la activación de receptores presinápticos tipo $\alpha 7$ en núcleo RMTg.

El resultado es un incremento en la excitabilidad y la tasa de disparo de las neuronas GABAérgicas. Más aun, la nicotina promueve el disparo sincronizado y persistente de decenas de neuronas del núcleo RMTg, lo cual aumentaría en gran medida la liberación de GABA sobre las neuronas dopaminérgicas del VTA y la SNc. Esto, en consecuencia, tendría un efecto inhibitorio sobre los sistemas dopaminérgicos que controlan los mecanismos de reforzamiento asociados a diversas conductas adaptativas (Fig.5.1).

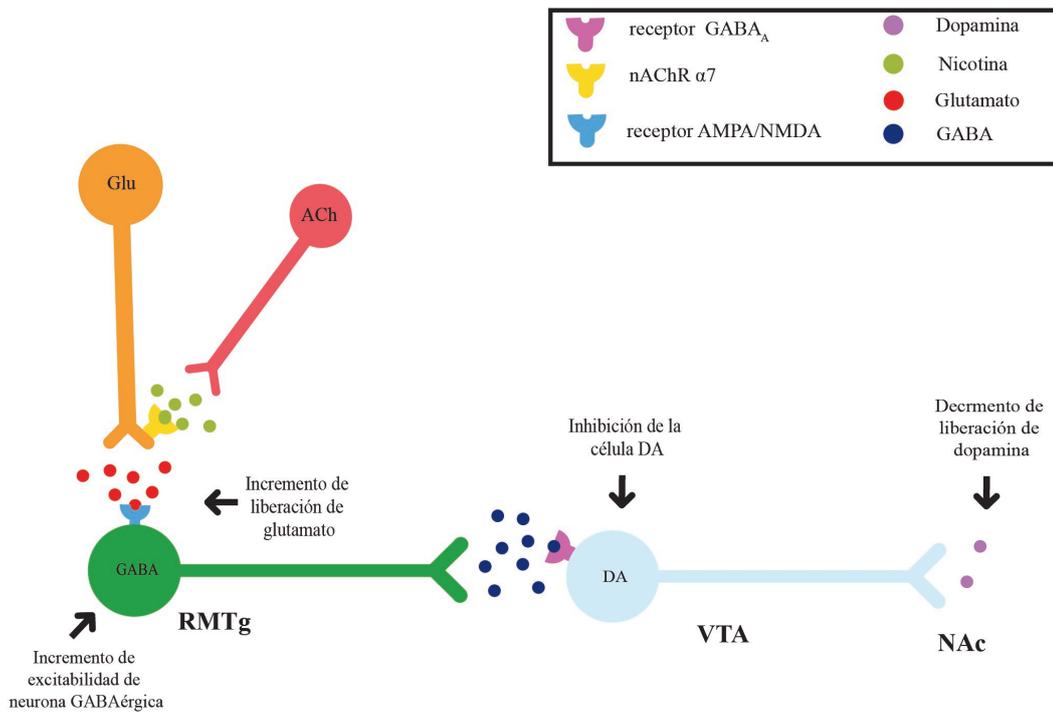


Figura 5.1: Nicotina y el control de la actividad DA mediante nAChRs $\alpha 7$. Representación esquemática del mecanismo celular y molecular subyacente al decremento dopaminérgico (DA) inducido por nicotina y mediado por el incremento de la actividad de las neuronas del núcleo RMTg. Área ventral tegmental (VTA), núcleo accumbens (NAc), núcleo rostromedial tegmental (RMTg), neurona GABAérgica (GABA), neurona acetilcolinérgica (ACh), neurona glutamatérgica (Glu), neurona dopaminérgica (DA).

Los resultados mostrados en este trabajo sugieren que las acciones de la nicotina en el núcleo RMTg tendría efectos ansiogénicos, pues existen trabajos que reportan que la activación de aferentes glutamatérgicas al RMTg provoca conductas de aversión y de evitación ante estímulos que usualmente son inocuos (Stamatakis y Stuber, 2012). De manera opuesta se sabe, por estudios en fumadores, que la nicotina es capaz de aliviar el estrés y producir efectos ansiolíticos (Pomerleau, 1986; Gilbert et al., 1989). Estas discrepancias pueden explicarse porque los efectos descritos en este trabajo son resultado de la acción aguda de la nicotina sobre las neuronas del RMTg mientras que los efectos que se reportan en fumadores resultan de la acción crónica de la nicotina. Se sabe que la nicotina crónica es capaz de producir diversos cambios en la expresión de receptores, así como desensibilización de los mismos. Por ejemplo, se ha reportado que la nicotina crónica produce incremento en la expresión (“upregulation”) de algunos subtipos de nAChRs, particularmente aquellos que poseen las subunidades $\alpha 2$ y

$\alpha 3$ (Peng et al., 1994; Kuryatov et al., 2005; Dani, 2015). Cabe señalar también, que la nicotina tiene acciones directas en varias estructuras involucradas en el control de los estados afectivo tales como la amígdala, el NAc y el núcleo del rafe dorsal. Los efectos ansiogénicos o ansiolíticos de la nicotina también dependen de la vía de administración, el estado emocional previo a su administración (relajación o estrés) o condiciones de abstinencia a la propia nicotina (Picciotto et al., 2008). Como perspectiva, sería interesante analizar, en un trabajo posterior, si ocurren cambios en los efectos nicotínicos dentro del núcleo RMTg como resultado de la exposición crónica a la nicotina.

Asimismo, una propuesta interesante para continuar con esta línea de investigación sería estudiar cómo se modifican los ensamblajes neuronales (grupos de células coactivas) en el núcleo del RMTg, en un modelo de aplicación crónica de nicotina durante la abstinencia a esta droga.

Capítulo 6

Conclusiones

La nicotina incrementa la frecuencia de las sEPSCs en neuronas GABAérgicas del núcleo RMTg, este incremento es mediado por los nAChRs conformados por la subunidad $\alpha 7$ y no $\alpha 4\beta 2$.

El efecto de la nicotina es mediado por mecanismos presinápticos debido a que su administración sólo modifica la frecuencia de las sEPSCs y no su amplitud.

Las neuronas GABAérgicas del núcleo RMTg no poseen nAChRs, ya que la aplicación local de acetilcolina no provocó corrientes mediadas por este tipo de receptores.

El efecto presináptico es de naturaleza glutamatérgica debido a que tras la administración de un antagonista a receptores AMPA/kainato se bloquean las sEPSCs.

La nicotina promueve la actividad neuronal poblacional del núcleo RMTg, estimada mediante el conteo de los transitorios de calcio. Este efecto fue bloqueado al administrar un antagonista selectivo a nAChRs $\alpha 7$.

La nicotina promueve el disparo sincronizado de las neuronas GABAérgicas del núcleo RMTg.

Referencias

1. American Psychiatric Association. (2013). Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 5th ed. Washington, DC, U.S.A.
2. Antolin-Fontes B., Ables J., Gorlich A., Ibanez-Tallon I. (2015). The habenulo-interpeduncular pathway in nicotine aversion and withdrawal. *Neuropharmacology*. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2014.11.019.
3. Aparicio-Juárez A, Duhne M, Lara-González E, Ávila-Cascajares F, Calderón V, Galarraga E, Bargas J. (2017). Cortical stimulation relieves parkinsonian pathological activity in vitro. *Eur J Neurosci*. DOI: 10.1111/ejn.13806.
4. Balcita-Pedicino J., Omelchenko N., Bell R., Sesack S. (2011). The inhibitory influence of the lateral habenula on midbrain dopamine cells: ultrastructural evidence for indirect mediation via the rostromedial mesopontine tegmental nucleus. *Journal of comparative neurology*. DOI: 10.1002/cne.22561.
5. Barrot M., y Thome J. (2011). Discovering a new anatomical structure in the brain: implications for neuropsychiatry and therapy. *The World Journal of Biological Psychiatry*. DOI: 10.3109/15622975.2011.598386.
6. Barrot M., Sesack S., Georges F., Pistis M., Hong., Jhou T. (2012). Bra-king dopamine systems: a new GABA master structure for mesolimbic and nigrostriatal functions. *Journal of Neuroscience*. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3370-12.2012.
7. Barrot M., Sanchez-Catalan M., Muller M., Majchrzak M., Yalcin I. (2015).

- Response of the tail of the ventral tegmental area to aversive stimuli. Neuroscience Meeting Planner. Society for Neuroscience, Chicago, IL (Online).
8. Barrot M., Georges F., Veinante P. (2017). The Tail of the Ventral Tegmental Area/ Rostromedial Tegmental Nucleus: A Modulator of Midbrain Dopamine Systems. 2da. Edición. St. Louis, MO, United States. Elsevier
 9. Berridge M., Bootman M., y Roderick L. (2003). Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. DOI: 10.1038/nrm1155.
 10. Björklund, A., y Dunnett S. (2007). Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends in Neurosciences*. DOI: 10.1016/j.tins.2007.03.006.
Bourdy R., y Barrot M. (2012). A new control center for dopaminergic systems: Pulling the VTA by the tail. *Trends in Neurosciences*. DOI: 10.1016/j.tins.2012.06.007.
 11. Bourdy R., Sanchez-Catalan M., Kauffing J., Balcita-Pedicino J., Freund-Mercier M., Veinante P., Sesack S., Georges F., Barrot M. (2014). Control of the nigrostriatal dopamine neuron activity and motor function by the tail of the ventral tegmental area. *Neuropsychopharmacology*. DOI: 10.1038/npp.2014.129.
Breese C., Marks M., Logel J., Adams C., Sullivan B., Collins A., Leonard S. (1997) Effect of smoking history on [3H]nicotine binding in human postmortem brain. *J. Pharmac. Exp. Ther.* DOI: 9223534
 12. 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*. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2010.03.050.
 13. Broide R., O'Connor L., Smith M., Smith J., Leslie F. (1995) Developmental expression of alpha 7 neuronal nicotinic receptor messenger RNA in rat sensory cortex and thalamus. *Neuroscience*. DOI: 10.1016/0306-4522(94)00623-d.
 14. Bromberg-Martin E., Matsumoto M., y Hikosaka O. (2010). Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron*. DOI: 10.1016/j.neuron.2010.11.022.

15. Brown P., y Shepard P. (2013). Lesions of the fasciculus retroflexus alter footshockinduced cFos expression in the mesopontine rostromedial tegmental area of rats. *PLoS One*. DOI: 10.1371/journal.pone.0060678.
16. Brown P., Palacorolla H., Brady D., Riegger K., Elmer G., y Shepard P. (2017). Habenula-Induced Inhibition of Midbrain Dopamine Neurons Is Diminished by Lesions of the Rostromedial Tegmental Nucleus. *The Journal of Neuroscience*. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1353-16.2016.
17. Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Tapia, D., Hernandez-Cruz A., Galarra-ga E., Drucker-Colin R., Bargas J. (2008). Encoding network states by striatal cell assemblies. *J. K.* DOI:10.1152/jn.01131.2007.
18. Changeux J., Galzi J., 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.* DOI: 10.1017/S0033583500004352.
19. Changeux J., Bertrand D., Corringier P., 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. Brain Res. Rev.* DOI: 10.1016/S0165-0173(97)00040-4.
20. Cohen J., Amoroso M., Uchida N. (2015). Serotonergic neurons signal reward and punishment on multiple timescales. *eLife*. DOI: 10.7554/eLife.06346.
21. Cornish J., Hunt G., Robins L., McGregor I. (2012). Regional c-Fos and FosB/ DeltaFosB expression associated with chronic methamphetamine self-administration and methamphetamine-seeking behavior in rats. *Neuroscience*. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.01.004.
22. Cui W., Mizukami H., Yanagisawa M., Aida T., Nomura M., Isomura Y., Takayanagi R., Ozawa K., Tanaka K., Aizawa, H. (2014). Glial dysfunction in the mouse lateral habenula causes depressive-like behaviors and sleep disturbance. *J. Neuroscience*. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1465-14.2014.
23. Dani J. (2015). Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Structure and Function and Response to Nicotine. *Int Rev Neurobiol*. DOI: 10.1016/bs.irn.2015.07.001.

24. Dani J., y Bertrand D. (2007). Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105214
25. Dani J., Heinemann S. (1996). Molecular and cellular aspects of nicotine abuse. *Neuron.*
DOI: 10.1016/s0896-6273(00)80112-9.
26. Dickinson J., Kew J., 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.* DOI: 10.1124/ mol.108.046623.
27. Fakhoury M. (2018). The tail of the ventral tegmental area in behavioral processes and in the effect of psychostimulants and drugs of abuse. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry.* DOI: 10.1016/j.pnpbp.2018.02.002.
28. Flores C., Rogers S., Pabreza L., Wolfe B., Kellar K. (1992). A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of alpha 4 and beta 2 subunits and is up-regulated by chronic nicotine treatment. *Mol.Pharmacol.* DOI: 1732720
29. Gao M., Jin Y., Yang K., Zhang D., Lukas J., y Wu J. (2010). Mechanisms Involved in Systemic Nicotine-Induced Glutamatergic Synaptic Plasticity on Dopamine Neurons in the Ventral Tegmental Area. *Journal of Neuroscience.* DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1943-10.2010.
30. 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.*
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0941-12.2012.
31. Geisler S., Marinelli M., Degarmo B., Becker M., Freiman A., Beales M., Meredith G., Zahm, D. (2008). Prominent activation of brainstem and pallidal afferents of the ventral tegmental area by cocaine. *Neuropsychopharmacology.* DOI: 10.1038/sj.npp.1301650.

32. Gessa G., Casu M., Carta G., Mascia M. (1998). Cannabinoids decrease acetylcholine release in the medial-prefrontal cortex and hippocampus, reversal by SR 141716A. *Eur. J. Pharmacol.* DOI: 10.1016/s0014-2999(98)00486-5.
33. Gilbert D., Robinson J., Chamberlin C., Spielberger C. (1989). Effects of smoking/nicotine on anxiety, heart rate, and lateralization of EEG during a stressful movie. *Psychophysiology*.
DOI: 10.1111/j.1469-8986.1989.tb01924.x.
34. Girod R., Role L. (2001). Long-lasting enhancement of glutamatergic synaptic transmission by acetylcholine contrasts with response adaptation after exposure to low-level nicotine. *J Neurosci*. DOI:10.1523/JNEUROSCI.21-14-05182.2001.
35. Good C., Wang H., Chen Y., Mejias-Aponte C., Hoffman A., Lupica C. (2013). Dopamine D-4 receptor excitation of lateralhabenula neurons via multiple cellular mechanisms. *Journal of Neuroscience*.
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1844-13.2013.
36. Gotti C., y Clementi F. (2004). Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Progress in Neurobiology*.
DOI: 10.1016/j.pneurobio.2004.09.006.
37. Goldstein R., y Volkow N. (2002). Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. *The American Journal of Psychiatry*. DOI: 10.1176/appi.ajp.159.10.1642
38. Gray R., Rajan A., Radcliffe K., Yakehiro M., Dani J. (1996). Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature*. DOI: 10.1038/383713a0.
39. Grienberger C., y Konnerth A. (2012). Imaging Calcium in Neurons. *Neuron*. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.02.011.
40. Harvey S., Maddox F., Luetje C. (1996). Multiple determinants of dihydro-beta-erythroidine sensitivity on rat neuronal nicotinic receptor alpha subunits. *J. Neurochem*. DOI: 10.1124/mol.51.2.336.

41. Herkenham M., Lynn A., De Costa B., Richfield E. (1991). Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat. *Brain Res.* DOI: 10.1016/0006-8993(91)90970-7.
42. Higley J., y Sabatini B. (2008). Calcium Signaling in Dendrites and Spines: Practical and Functional Considerations. *Neuron.* DOI: 10.1016/j.neuron.2008.08.020.
43. Hogg R., Raggenbass M., Bertrand D. (2003). Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* DOI: 10.1007/s10254-003-0005-1.
44. Hong S., Jhou T., Smith M., Saleem K., y Hikosaka O. (2011). Negative Reward Signals from the Lateral Habenula to Dopamine Neurons Are Mediated by Rostromedial Tegmental Nucleus in Primates. *Journal of Neuroscience.* DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1384-11.2011.
45. Huff M., y LaLumiere R. (2015). The rostromedial tegmental nucleus modulates behavioral inhibition following cocaine selfadministration in rats. *Neuropsychopharmacology.* DOI: 10.1038/npp.2014.260.
46. Ikemoto S., y Bonci A. (2014). Neurocircuitry of drug reward. *Neuropharmacology.* DOI: 10.1016/j.neuropharm.2013.04.031
47. Jalabert M., Bourdy R., Courtin J., Veinante P., Manzoni O., Barrot, M., Georges, F. (2011). Neuronal circuits underlying acute morphine action on dopamine neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* DOI: 10.1073/pnas.1105418108
48. Jhou T. (2005). Neural mechanisms of freezing and passive aversive behaviors. *Journal of Comparative Neurology.* DOI: 10.1002/cne.20734.
49. Jhou T., Fields H., Baxter M., Saper C., y Holland P. (2009). The Rostromedial Tegmental Nucleus (RMTg), a GABAergic Afferent to Midbrain Dopamine Neurons, Encodes Aversive Stimuli and Inhibits Motor Responses. *Neuron.* DOI: 10.1016/j.neuron. 2009.02.001.
50. Jhou T., Geisler S., Marinelli M., Degarmo B., y Zahm D. (2009). 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. *Journal of Comparative Neurology*.

DOI: 10.1002/cne.21891.

51. Jhou T., Xu S., Lee M., Gallen C., Ikemoto S. (2012). Mapping of reinforcing and analgesic effects of the mu opioid agonist endomorphin-1 in the ventral midbrain of the rat. *Psychopharmacology*. DOI: 10.1007/s00213-012-2753-6.
52. Jhou T., Good C., Rowley C., Xu S., Wang H., Burnham N. (2013). Cocaine drives aversive conditioning via delayed activation of dopamine-responsive habenular and midbrain pathways. *Journal of Neuroscience*. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3634-12.2013.
53. Ji H., y Shepard P. (2007) Lateral habenula stimulation inhibits rat midbrain dopamine neurons through a GABA(A) receptor-mediated mechanism. *Journal of Neuroscience*. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0958-07.2007.
54. Johnson S., y North R. (1992). Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *Journal of Neuroscience*. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.12-02-00483.1992.
55. Kauffling J., Veinante P., Pawlowski S., Freund-Mercier M., y Barrot M. (2009). Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat. *Journal of Comparative Neurology*. DOI: 10.1002/cne.21983.
56. Kauffling J., Waltisperger E., Bourdy R., Valera A., Veinante P., Freund-Mercier M., Barrot, M. (2010). Pharmacological recruitment of the GABAergic tail of the ventral tegmental area by acute drug exposure. *British Journal of Pharmacology*. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.00984.x.
57. Kauffling J., y Aston-Jones G., (2015). Persistent adaptations in afferents to ventral tegmental dopamine neurons after opiate withdrawal. *J. Neuroscience*. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0715-15.2015.
58. Kauffling J. (2019). Alterations and adaptation of ventral tegmental area dopaminergic neurons in animal models of depression. *Cell and Tissue Research*. DOI: 10.1007/s00441-019-03007-9.
59. Koob G., Le Moal M. (2008). Addiction and the brain antireward system. *Addiction and the Brain Antireward System*. DOI: 10.1146/annurev.psych.59.103006.093548.

60. Kuryatov A., Luo J., Cooper J., Lindstrom J. (2005). Nicotine acts as a pharmacological chaperone to up-regulate human alpha4beta2 acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol*. DOI: 10.1124/mol.105.012419.
61. Lambe E., Picciotto M., Aghajanian G. (2003). Nicotine induces glutamate release from thalamocortical terminals in prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*. DOI: 10.1038/sj.npp.1300032.
62. Lammel S., Lim B., Ran C., Huang K., Betley M., Tye K., Deisseroth K., Malenka R. (2012). Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature*. DOI: 10.1038/nature11527.
63. Lavezzi H., y Zahm D. (2011). The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: An integrative modulator of the reward system. *Basal Ganglia*. DOI: 10.1016/j.baga.2011.08.003.
64. Lavezzi H., Parsley K., Zahm D. (2012). Mesopontine rostromedial tegmental nucleus neurons projecting to the dorsal raphe and pedunculopontine tegmental nucleus: psychostimulant-elicited Fos expression and collateralization. *Brain Structure and Function*. DOI: 10.1007/s00429-011-0368-z.
65. Lecca S., Melis M., Luchicchi A., Ennas M., Castelli M., Muntoni A., y Pistis M. (2011). Effects of drugs of abuse on putative rostromedial tegmental neurons, inhibitory afferents to midbrain dopamine cells. *Neuropsychopharmacology*. DOI: 10.1038/npp.2010.190
66. Lecca S., Melis M., Luchicchi A., Muntoni A., y Pistis M. (2012). Inhibitory inputs from rostromedial tegmental neurons regulate spontaneous activity of midbrain dopamine cells and their responses to drugs of abuse. *Neuropsychopharmacology*. DOI: 10.1038/npp.2011.302.
67. Li H., Pullmann D., Cho J., Eid M., Zhou T. (2019). Generality and opponency of rostromedial tegmental (RMTg) roles in valence processing. *eLife*. DOI: 10.7554/eLife.41542.
68. Lindstrom J. (1996). Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. En: Narahashi T. (eds) *Ion Channels*. *Ion Channels*, vol 4. Springer, Boston, M.A. DOI: 10.1007/978-1-4899-1775-1_10.

69. Luetje C., Patrick J. (1991). Both alpha- and beta-subunits contribute to the agonist sensitivity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neuroscience*. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.11-03-00837.1991.
70. Machaalani R., Kashi P., Waters K. (2010). Distribution of nicotinic acetylcholine receptor subunits alpha7 and beta2 in the human brainstem and hippocampal formation. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. DOI: 10.1016/j.jchemneu.2010.05.009.
71. Maggi L., Sola E., Minneci F., Le Magueresse C., Changeux J., Cherubini E. (2004). Persistent decrease in synaptic efficacy induced by nicotine at Schaffer collateral-CA1 synapses in the immature rat hippocampus. *J Physiol*. DOI: 10.1113/jphysiol.2004.067041.
72. Mansvelder H., y McGehee D. (2002). Cellular and synaptic mechanisms of nicotine addiction. *Journal of Neurobiology*. DOI: 10.1002/neu.10148.
73. Mansvelder H., Russel K., y McGehee D. (2002). Synaptic mechanisms underlie nicotine-induced excitability of brain reward areas. *Neuron*. DOI: 10.1016/S0896-6273(02)00625-6.
74. Mao D., Gallagher K., y McGehee D. (2011). Nicotine Potentiation of Excitatory Inputs to Ventral Tegmental Area Dopamine Neurons. *Journal of Neuroscience*. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5671-10.2011.
75. Maroteaux M., y Mameli M. (2012). Cocaine evokes projection-specific synaptic plasticity of lateral habenula neurons. *Journal of Neuroscience*. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2405-12.2012.
76. Matsumoto M., y Hikosaka O. (2007) Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature*. DOI: 10.1038/nature05860.
77. Matsui A., y Williams J. (2011). Opioid-Sensitive GABA Inputs from Rostromedial Tegmental Nucleus Synapse onto Midbrain Dopamine Neurons. *Journal of Neuroscience*. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4570-11.2011.
78. McGehee D., Heath M., Gelber S., Devay P., Role L. (1995). Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors. *Science*. DOI: 10.1126/science.7569895.

79. Miller M., y Picciotto M. (2016) *Nicotine Pharmacology, Abuse, and Addiction*. 2da. Edición. Springer. New York, U.S.A.
80. Olson V., y Nestler E. (2007). Topographical organization of GABAergic neurons within the ventral tegmental area of the rat. *Synapse*. DOI: 10.1002/syn.20345.
81. Organización Mundial de la Salud.(2018). *Tabaco*. World Health Organization.
Recuperado de: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tobacco>
82. Paxinos G. y Watson C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (6th edition). Academic Press. ISBN: 9780125476126.
83. 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*. DOI: 7935334
84. Pérez-Ortega J., Duhne M., Lara-González E., Plata V., Gasca D., Galarraga E., Hernández-Cruz A., Bargas J. (2016) Pathophysiological signatures of functional connectomics in parkinsonian and dyskinetic striatal microcircuits. *Neurobiol Dis*. DOI: 10.1016/j.nbd.2016.02.023.
85. Perrotti L., Bolaños C., Choi K., Russo S., Edwards S., Ulery P., Barrot M. (2005). Δ FosB accumulates in a GABAergic cell population in the posterior tail of the ventral tegmental area after psychostimulant treatment. *European Journal of Neuroscience*. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2005.04110.x. *Nature* 374: 65–67.
86. Picciotto M., Zoli M., Rimondini R., Lena C., Marubio L., Merlo Pich E., Fuxe K., Changeux J. (1998). Acetylcholine receptors containing the b-2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature*. DOI; 10.1038/34413.
87. Picciotto M., Addy N., Mineur Y., Brunzell D. (2008). It is not "either/or": activation and desensitization of nicotinic acetylcholine receptors both contribute to behaviors related to nicotine addiction and mood. *Prog Neurobiol*. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2007.12.005
88. Pomerleau O. (1986). Nicotine as a psychoactive drug: anxiety and pain reduction. *Psychopharmacol Bull*. DOI: 3797589

89. Role L., y Berg D. (1996). Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron*. DOI: 10.1016/s0896-6273(00)80134-8.
90. Sánchez-Catalan M., Faivre F., Yalcin I., Muller M., Massote D., Monique M., Barrot M. (2017). Response of the Tail of the Ventral Tegmental Area to Aversive Stimuli. *Neuropsychopharmacology*. DOI: 10.1038/npp.2016.139.
91. Scammell T., Estabrooke I., McCarthy M., Chemelli R., Yanagisawa M., Miller M., Saper C. (2000). Hypothalamic Arousal Regions Are Activated during Modafinil-Induced Wakefulness. *The Journal of Neuroscience*. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.20-22-08620.2000.
92. Schultz W. (1998). Predictive Reward Signal of Dopamine Neurons. *Journal of Neurophysiology*. DOI: 10.1152/jn.1998.80.1.1.
93. Schultz W., Dayan P., y Montague P. (1997). A neural substrate of prediction and reward. *Science*. DOI: 10.1126/science.275.5306.1593.
94. Seguela P., Wadiche J., Dineley-Miller K., Dabi J., Patrick J. (1993). Molecular cloning functional properties and distribution of rat brain $\alpha 7$: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *The Journal of Neuroscience*. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.13-02-00596.1993.
95. 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*. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5407-07.2008.
96. Sharma G., y Vijayaraghavan S. (2003). Modulation of presynaptic store calcium induces release of glutamate and postsynaptic firing. *Neuron*. DOI: 10.1016/s0896-6273(03)00322-2.
97. Stamatakis A., y Stuber G. (2012). Activation of lateral habenula inputs to the ventral midbrain promotes behavioral avoidance. *Nature Neuroscience*. DOI: 10.1038/nn.3145.
98. Stauderman K., Mahaffy L., Akong M., Velicelebi G., Chavez-Noriega L., Crona J., Johnson E., Elliott K., Gillespie A., Reid R., Adams P., Harpold

- M., Corey-Naeve J. (1998). Characterization of human recombinant neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit combinations alpha2beta4, alpha3beta4 and alpha4beta4 stably expressed in HEK293 cells. *J Pharmacol Exp Ther*. DOI: 9454827
99. Volkow N., y Morales M. (2015). The brain on drugs: from reward to addiction. *Cell*. DOI: 10.1016/j.cell.2015.07.046.
100. Whiting P., y Lindstrom J. (1986). Pharmacological properties of immunisolated neuronal nicotinic receptors. *J Neuroscience*. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.06-10-03061.1986.
101. 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*. DOI: 1717818
102. Wonnacott S. (1997). Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends in Neurosciences*. DOI: 10.1016/S0166-2236(96)10073-4.
103. Woolf N., y Butcher L. (1989). Cholinergic systems in the rat brain: IV.descending projections of the pontomesencephalic tegmentum. *Brain Res Bull*. DOI: 10.1016/0361-9230(89)90197-4.
104. Wooldorton J., Pidoplichko V., Broide R., Dani J. (2003). Differential desensitization and distribution of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in midbrain dopamine areas. *J.Neuroscience*. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.23-08-03176.2003.
105. Wu J., y Lukas R. (2011). Naturally-expressed nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Biochem. Pharmacol*. DOI: 10.1016/j.bcp.2011.07.067.
106. Yetnikoff L., Reichard R., Schwartz Z., Parsely K., y Zahm D. (2014). Protracted maturation of forebrain afferent connections of the ventral tegmental area in the rat. *Journal of Comparative Neurology*. DOI: 10.1002/cne.23459.
107. Zahm D., Becker M., Freiman A., Strauch S., Degarmo B., Geisler S., Meredith G., Marinelli M. (2010). Fos after single and repeated self-administration of cocaine and saline in the rat: emphasis on the Basal forebrain and recalibration of expression. *Neuropsychopharmacology*. DOI: 10.1038/npp.2009.149.

108. Zahm D. (2017). *The Rostromedial Tegmental Nucleus: Connections With the Basal Ganglia*. 2da. Edición. St. Louis, MO, United States. Elsevier.
109. Zoli M., Lena C., Picciotto M., Changeux J. (1998). Identification of four classes of brain nicotinic receptors using fJ2-mutant mice. *J. Neurosci.* DOI: 10.1523/JNEUROSCI.18-12-04461.1998.
110. Zoli M., Moretti M., Zanardi A., McIntosh J., Clementi F., Gotti C. (2002). Identification of the nicotinic receptor subtypes expressed on dopaminergic terminals in the rat striatum. *J Neurosci.* DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-20-08785.2002.
111. Zoli M., Pistillo F., y Gotti C. (2015). Diversity of native nicotinic receptor subtypes in mammalian brain. *Neuropharmacology*. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2014.11.003.