



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

**EFFECTO DE LA NICOTINA SOBRE LA ESTIMULACIÓN DE RECEPTORES
NICOTÍNICOS EN EL NÚCLEO ROSTROMEDIAL TEGMENTAL (RMTg)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

MVZ DIEGO ERNESTO OLIVER CASTILLO ROLÓN

DIRECTOR DE TESIS:

DR. SALVADOR HERNÁNDEZ LÓPEZ

COMITÉ TUTOR:

DRA. LETICIA VERDUGO DÍAZ

(FACULTAD DE MEDICINA)

DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ

(INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR)

Ciudad universitaria, Ciudad de México, abril de 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

Contenido	2
Abreviaturas.....	4
Agradecimientos	5
Resumen	5
Abstract.....	8
INTRODUCCIÓN	9
ANTECEDENTES	11
Generalidades	11
El tabaquismo como problema de salud pública a nivel mundial	12
El RMTg.....	13
El núcleo RMTg	13
Las aferencias al RMTg.....	15
Las eferencias del RMTg.....	15
Funciones del RMTg.....	16
La vía LHb – RMTg – VTA y el circuito mesolímbico cortical	17
El GABA como neurotransmisor inhibitorio	19
El glutamato, principal neurotransmisor excitatorio en el cerebro.....	20
La acetilcolina y su papel en el mesencéfalo	21
Los receptores nicotínicos cerebrales	24
Regulación presináptica de la liberación de glutamato en el tallo cerebral	26
JUSTIFICACIÓN	28
HIPÓTESIS	29
OBJETIVOS	30
Objetivo general.....	30
Objetivos particulares	30
METODOLOGÍA	31
Preparación de las rebanadas.....	31
Registros electrofisiológicos	32

Registros de imagenología de calcio.....	35
Administración de fármacos	38
Administración local de acetilcolina	39
Inmunocitoquímica.....	39
Análisis estadístico	41
RESULTADOS	42
La nicotina incrementa la frecuencia y amplitud de las corrientes postsinápticas excitatorias espontáneas (sEPSCs) de las neuronas gabaérgicas del RMTg.....	42
La acetilcolina endógena mimetiza el efecto de la nicotina.....	45
El efecto de la nicotina en el RMTg es mediado a través de receptores nicotínicos $\alpha 7$	47
El incremento de la frecuencia de sEPSCs en neuronas del RMTg debido a la nicotina, es de origen presináptico	49
La potenciación sináptica inducida por la nicotina depende de las reservas de calcio intracelular	52
La nicotina sincroniza la liberación de glutamato en el RMTg	53
El incremento de la actividad poblacional, inducida por nicotina, es bloqueado por un antagonista nicotínico tipo $\alpha 7$	56
DISCUSIÓN	60
Tono colinérgico en el núcleo RMTg	61
Los efectos nicotínicos en el núcleo RMTg son presinápticos	61
La estimulación del receptor nicotínico $\alpha 7$ incrementa las sEPSCs.....	62
Los efectos de la nicotina en el RMTg dependen de las pozas intracelulares de calcio en la presinapsis	63
La nicotina promueve la liberación sincronizada de glutamato en las aferentes colinérgicas del RMTg	63
La nicotina provoca efectos excitatorios <i>a largo plazo</i>	66
Implicaciones fisiológicas	68
CONCLUSIONES	70
BIBLIOGRAFÍA	71
Apéndices	91

ABREVIATURAS

ACh – Acetilcolina

Anti-FoxP1 – Anticuerpo específico para neuronas del RMTg

Anti-GAD_{65/67} – Anticuerpo específico para las dos isoformas de la GAD

CICR – Mecanismo de liberación de calcio inducida por calcio

CPA – Ácido ciclopiazónico

DH β E – Dihidro-beta-eritroidina

GABA – Ácido gama-aminobutírico

GAD – Descarboxilasa del ácido glutámico

IPN – Núcleo interpeduncular

LDTg – Núcleo tegmental laterodorsal

LHb – Hábenula lateral

mEPSCs – Corrientes postsinápticas excitatorias miniatura

MHb – Habénula medial

MLA – Metilcaconitina

NAc – Núcleo accumbens

nAChRs – Receptores colinérgicos nicotínicos

PPTg – Núcleo tegmental pedúnculo pontino

RMTg – Núcleo tegmental rostromedial

sEPSCs – Corrientes postsinápticas excitatorias espontáneas

SERCA – Bomba (ATPasa) de calcio del retículo sarcoplásmico

SNc – Sustancia nigra, *pars compacta*

TTX – Tetrodotoxina

VTA – Área tegmental ventral

AGRADECIMIENTOS

Al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM por la formación recibida durante mis estudios de Doctorado.

Al programa DGAPA-PAPIIT de la Universidad Nacional Autónoma de México, cuyo financiamiento IN21631 hizo posible el proyecto de investigación del cual se desprende el presente trabajo.

Al programa nacional de becas de posgrado del CONACyT, por la beca N° 595267 otorgada para mis estudios de doctorado.

Al Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina UNAM, el cual apoyó para la divulgación de los resultados de este trabajo en congresos a nivel nacional e internacional.

Al MVZ Víctor Salgado Alfaro del bioterio de la Facultad de Medicina, por la asesoría técnica proporcionada sobre el manejo de animales de laboratorio.

Al Comité Tutor que siguió todo el proceso del presente trabajo: Dra. Leticia Verdugo Díaz, Dr. Arturo Hernández Cruz, Dr. Salvador Hernández López.

A los miembros del jurado para el examen de grado de Doctorado: Dra. María Elvira Galarraga Palacio, Dra. Violeta Giselle López Huerta, Dr. Miguel Ángel Morales Mendoza, Dr. Stefan Mihailescu Lucian.

A mis compañeros de laboratorio y colegas científicos, quienes me han compartido sus experiencias y conocimientos: Dra. Julieta Garduño, Mtra. Gabina Arenas, Andrea Mondragón, Enrique Ramírez, Dra. Fabiola Hernández, Dr. Omar González, Dra. Verónica Cáceres, Dr. Miguel Serrano, Dra. Esther González, Dra. Mariana Duhne, Monserrat Padilla, Dr. Jesús Ortega.

Al Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM por el apoyo recibido para la realización de mis estudios de Doctorado. Especial mención a las Dras. Maricela Ortega Villalobos y María del Carmen Frías Domínguez.

DEDICATORIA

Al conocimiento libre, a la ciencia genuina y a todos aquellos que son afortunados de maravillarse, día con día, gracias a su curiosidad insaciable.
–La verdad os hará libres–

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

A mi familia, por darme apellido y personalidad tal que me ha permitido mantener un camino más o menos constante y llevar a buen puerto la barca que me pudieron ofrecer. Gracias madre, gracias Margarita.

A mis amigos, por su apoyo incondicional e invaluable: Erick Reza, Karen Tajonar, Rodrigo Ontiveros, Guillermo Oviedo, Javier Magaña, Jesús Aguirre, Olivia Sarai, Sonia Ortega, Anastasia Lebedeva.

A quienes han sido fuente de inspiración en mi formación académica científica y han creído en la misma: Gracias Dr. Salvador Hernández López por la confianza, Dra. María Del Carmen Frías Domínguez por mostrarme el camino en la investigación en Fisiología, Dra. Maricela Ortega Villalobos por sus consejos y su invaluable ejemplo, Dra. Sara Caballero Chacón por su apoyo incondicional.

A mi asesor, Salvador Hernández López, quien al paso de los años se ha convertido en una persona cercana y de alta estima, compartiendo generosamente su tiempo y conocimiento académico. Gracias por motivarme a superarme científicamente.

A Steve Harris y Tuomas Holopainen, quienes con su legado, compromiso e inspiración musical hicieron llevaderos los días y noches de trabajo. Gracias, Iron Maiden y Nightwish.

“Always look on the brightside of life... From the simply of the beginning, endless forms most beautiful...”

*“Родина не там, где ты родился. Родина там, где тебе хорошо”
 (“La patria no está donde nacimos. La patria está donde estamos bien”)*

RESUMEN

El núcleo tegmental rostromedial (RMTg, por sus siglas en inglés) es una estructura bilateral localizada en el tallo cerebral y está constituido principalmente por neuronas gabaérgicas. Una de las funciones principales del núcleo RMTg es regular la actividad de las neuronas dopaminérgicas de la vía mesolímbica. Por ello, el RMTg ha sido propuesto como un centro modulador del sistema de recompensa y de comportamientos adaptativos asociados con el aprendizaje por reforzamiento. El RMTg recibe una importante entrada glutamatérgica proveniente de la habénula lateral (LHb). También, recibe aferencias colinérgicas desde los núcleos tegmentales laterodorsal (LTDg) y pedúnculo pontino (PPTg). Previamente ha sido reportado que la nicotina incrementa la liberación de glutamato tras la estimulación eléctrica en el núcleo RMTg. A pesar de ello, los mecanismos por los cuales la nicotina induce este efecto no habían sido explorados. En este trabajo realizamos experimentos electrofisiológicos en rebanadas de cerebro para estudiar los efectos de la nicotina sobre las corrientes postsinápticas excitatorias espontáneas (sEPSCs) registradas en neuronas gabaérgicas del RMTg identificadas por inmunocitoquímica. También, utilizamos técnicas de imagenología de calcio para explorar los efectos de la nicotina en múltiples neuronas del RMTg de manera simultánea. Encontramos que la nicotina promueve, persistentemente, la liberación de glutamato a través de la activación de receptores colinérgicos nicotínicos $\alpha 7$ presentes en las aferentes glutamatérgicas, mediante un mecanismo que involucra la liberación de calcio de las pozas intracelulares. A través de estos mecanismos, la nicotina incrementa la excitabilidad y sincroniza la actividad de las neuronas gabaérgicas del RMTg. A partir de nuestros resultados, inferimos que una mayor actividad del núcleo RMTg supondrá una mayor liberación de GABA en el área tegmental ventral (VTA), resultando en un descenso de los niveles de dopamina en esta área, provocando estados aversivos para el individuo. En conclusión, el RMTg modula los efectos nocivos de la nicotina y puede ser un objetivo terapéutico potencial contra la adicción al tabaco.

ABSTRACT

The rostromedial tegmental nucleus (RMTg) is a bilateral structure localized in the brainstem and comprised mainly by GABAergic neurons. One of the main functions of the RMTg is to regulate the activity of dopamine neurons of the mesoaccumbens pathway. Therefore, the RMTg has been proposed as a modulator of the reward system and adaptive behaviors associated to reward learning. The RMTg receives an important glutamatergic input from the lateral habenula. Also, it receives cholinergic inputs from the laterodorsal and pedunculopontine tegmental nuclei. Previously, it was reported that nicotine increases glutamate release, evoked by electric stimulation, in the RMTg nucleus. However, the mechanisms by which nicotine induces this effect were not explored. In the present work, we performed electrophysiological experiments in brainstem slices to study the effect of nicotine on spontaneous excitatory postsynaptic currents recorded from immunocytochemically identified RMTg neurons. Also, we used calcium imaging techniques to explore the effects of nicotine on multiple RMTg neurons simultaneously. We found that nicotine promotes the persistent release of glutamate through the activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors present on glutamatergic afferents and by a mechanism involving calcium release from intracellular stores. Through these mechanisms, nicotine increases the excitability and synchronizes the activity of RMTg neurons. Our results suggest that the RMTg nucleus mediates the noxious effects of nicotine, and it could be a potential therapeutic target against tobacco addiction.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el entendimiento de la función cerebral está sujeto a múltiples campos de investigación, así como a las técnicas disponibles que, como es natural en el desarrollo científico, la innovación tecnológica impacta directamente en los avances y aportes al estudio de las neurociencias.

El estudio de diversas áreas cerebrales conlleva a un mejor entendimiento de numerosos procesos fisiológicos, incluyendo el mantenimiento de un adecuado balance energético del organismo a cargo de neuronas del hipotálamo, el control de la actividad motora y los movimientos finos sujetos al funcionamiento de áreas corticales, hasta la manifestación de conductas complejas de adaptación, como la socialización y el aprendizaje, donde el hipocampo y la amígdala son imprescindibles. Pero también, conocer las bases fisiológicas de estos procesos permite entender y tratar mejor sus alteraciones. Una modificación en los circuitos cerebrales es la causa de algunos desórdenes cognitivos bien descritos, como la ansiedad, el estrés, la depresión, entre otros.

La conducta de un individuo es el resultado del aprendizaje de recompensas y castigos que le permitirán adaptarse a su entorno durante toda su vida (Schultz *et al.*, 1997). Por lo anterior, las conductas sociales estarán determinadas por un balance entre la obtención de reforzadores y la evitación de castigos (Bromberg-Martin *et al.*, 2010). Tales conductas pueden ser alteradas por desórdenes psicológicos y por el consumo de algunas drogas de abuso, que modifican el comportamiento y generan una disrupción del individuo con su entorno. Dado que las alteraciones conductuales provocan detrimento de la salud y el bienestar del individuo, se hace clara la importancia del estudio de la fisiología del sistema de recompensa cerebral (Russo y Nestler, 2013).

En el mundo, el consumo de drogas de abuso, tales como la mariguana, el alcohol o la nicotina, es un problema de salud pública que, además de la alta prevalencia de muertes relacionadas al consumo de dichas sustancias (OMS, 2019), conlleva a otros problemas, tales como la adicción temprana y problemas mentales (Senay, 1991; Mathers *et al.*, 2006); en consecuencia, el estudio de los mecanismos cerebrales que generan adicción hacia alguna sustancia en los individuos es de importancia fisiológica y de impacto social.

El trabajo que aquí se presenta tiene como finalidad el estudio del funcionamiento del núcleo tegmental rostromedial (RMTg), la participación de los receptores nicotínicos en la modulación de la actividad gabaérgica del núcleo, a través de su activación por la nicotina y cómo esta droga puede regular la liberación de glutamato en esta área cerebral, así como los mecanismos celulares involucrados (participación de calcio intracelular, por ejemplo) y su impacto sobre la actividad dopaminérgica en el VTA. Todo ello, con el objetivo de generar un mejor entendimiento de los procesos fisiológicos que subyacen a la participación directa de esta estructura en la adicción a la nicotina.

ANTECEDENTES

Generalidades

La nicotina es el principal componente psicoestimulante del tabaco (Engstrom *et al.*, 2003). Se trata de un alcaloide que tiene un potencial adictivo muy fuerte entre las drogas de abuso (Benowitz, 2010). En el organismo de los animales, la nicotina actúa uniéndose de manera reversible a los receptores colinérgicos de tipo nicotínico, los cuales están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central (SNC) y periférico del animal (Wooltorton *et al.*, 2003).

La distribución de los distintos subtipos de receptores nicotínicos cerebrales (nAChRs) es diversa en cada porción del encéfalo y en las propias sinapsis neuronales, donde pueden hallarse en el elemento presináptico, modulando las terminales sinápticas, y en el elemento postsináptico, participando en la regulación directa de la excitabilidad neuronal. Los receptores nicotínicos presinápticos participan en la regulación de la liberación de diversos neurotransmisores a nivel cerebral (Wonnacott, 1997; Sher *et al.*, 2004; Jensen *et al.*, 2005; Albuquerque *et al.*, 2009). Los subtipos de nAChRs más abundantes en el mesencéfalo son los $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$ (Whiting *et al.*, 1987; Flores *et al.*, 1992; Seguela *et al.*, 1993).

El sistema mesolímbico-cortical es un circuito cerebral compuesto por diversas estructuras entre las que destacan el área tegmental ventral (VTA), la sustancia nigra (SN) y el núcleo accumbens (NAc). Este circuito tiene como neurotransmisor predominante a la dopamina y está relacionado con procesos que implican el movimiento motivado por estímulos gratificantes (Pierce y Kumaresan, 2006). Es decir, la vía mesolímbica modula los mecanismos cerebrales de la recompensa (Russo y Nestler, 2013). Múltiples trabajos han estudiado al VTA y sus eferentes dopaminérgicas hacia el núcleo accumbens (vía mesoaccumbens), por su amplia participación en los mecanismos que regulan la adicción a la nicotina y a otras drogas de abuso (Mansvelder *et al.*, 2002, 2006; Mansvelder y McGehee, 2002; Mao *et al.*, 2011).

Desde las primeras descripciones del núcleo RMTg, se enfatizó su relevancia fisiológica ya que, debido a su relación anatómica y su naturaleza gabaérgica, este núcleo estaría implicado en la regulación de los sistemas dopaminérgicos mesolímbicos, constituidos por el área tegmental ventral (VTA) y la sustancia nigra (SN), y por consiguiente, la modulación en la liberación de dopamina a nivel de núcleos subcorticales como el accumbens (NAc) y el estriado (NST) (Jhou, 2005; Ferreira *et al.*, 2008; Kaufling *et al.*, 2009; Balcita-Pedicino *et al.*, 2011; Gonçalves *et al.*, 2012; Bourdy *et al.*, 2014). En el RMTg, se desconoce la localización precisa de los receptores nicotínicos que están implicados en la respuesta a la nicotina.

En resumen, se infiere que la regulación de la actividad de las neuronas gabaérgicas del RMTg, a través de la modulación de la liberación de glutamato por la activación de receptores nicotínicos presinápticos, tiene consecuencias importantes en la vía mesolímbica-cortical y el aprendizaje por reforzamiento.

El tabaquismo como problema de salud pública a nivel mundial

El consumo de tabaco a nivel mundial es una importante causa de enfermedad y de mortalidad que puede ser prevenible, y que sin embargo sigue un crecimiento acelerado. Las muertes a causa del tabaquismo (o enfermedades relacionadas) alcanzan cifras alarmantes: si bien durante el año 2006, la Organización Mundial de la Salud (OMS) proyectaba que para el año 2030 habría 8 millones de muertes a nivel mundial a causa del tabaquismo, esta cifra se volvió realidad apenas en el año 2016. De esta cifra, 7 millones de defunciones se debieron al consumo directo de tabaco, mientras que alrededor de 1.2 millones fueron consecuencia de la exposición de no fumadores al humo ajeno (fumadores *pasivos*). Un dato interesante que arroja un informe de la OMS de 2019 es que más del 80% de los 1'300 millones de consumidores de tabaco que hay en el mundo, viven en países de ingresos medianos o bajos (World Health Organization, 2019). Para el año 2020 se proyectó que el 12% de las muertes a nivel mundial serían a causa del tabaco (de manera directa o indirecta). Dicho porcentaje sería mayor que el de las muertes causadas por VIH/SIDA, tuberculosis,

mortalidad materna, accidentes automovilísticos, homicidios y suicidios en conjunto.

En México, por ejemplo, se estima que existen 17 millones de fumadores y alrededor de 60'000 personas mueren cada año de enfermedades relacionadas al tabaquismo: 38% debidas a enfermedad isquémica del corazón, 29% por enfisema, bronquitis crónica y enfermedad pulmonar obstructiva crónica, 23% por enfermedad cerebrovascular y el 10% restante por cáncer en los pulmones, los bronquios o la tráquea. Las estimaciones gubernamentales sugieren un gasto de 29 billones de pesos (2.6 billones de dólares) para tratar enfermedades relacionadas al consumo de tabaco (Ebrard *et al*, 2010).

Dada la seriedad del problema del tabaquismo a nivel mundial, la propia OMS y organizaciones regionales, como la Organización Panamericana de la Salud (OPS), en coordinación con las entidades locales de cada país (la Secretaría de Salud, SSA en México, por ejemplo), implementaron, desde el año 2007, el “Convenio Marco de la OMS para el Control del Tabaco (CMCT, OMS), que ha demostrado su eficacia para reducir la demanda de tabaco (World Health Organization, 2019).

La conducta de fumar está relacionada fuertemente con algunos desórdenes psiquiátricos, entre los que se encuentran la depresión, la ansiedad y el estrés, así como la adicción a otras drogas de abuso (Miller y Picciotto, 2016). Es por ello que múltiples grupos de investigadores en todo el mundo han contribuido con sus esfuerzos para describir la patogenia de la adicción a la nicotina.

El RMTg

El núcleo RMTg

El RMTg o cola del VTA (tVTA) es un núcleo gabaérgico bilateral ubicado en la región de los núcleos tegmentales, en el tallo cerebral a nivel del puente (Jhou *et al.*, 2009b). La denominación del núcleo como tVTA hace referencia a que se localiza en la parte posterior al VTA (Geisler y Wise, 2008; Barrot y Thome, 2011; Barrot *et al.*, 2012; Bourdy y Barrot, 2012; Sanchez-Catalan *et al.*, 2014). A pesar de que ambas

nomenclaturas son válidas, en este trabajo se hará referencia al núcleo como RMTg.

Específicamente, el RMTg se localiza posterior al VTA y dorsolateralmente al núcleo interpeduncular (IP) (Perrotti *et al.*, 2005), se extiende en sentido rostrocaudal dentro de las zonas ventrales mesopontinas, por lo que el núcleo queda incrustado dentro de la decusación del pedúnculo cerebeloso superior (xpcs) (Bourdy y Barrot, 2012) (Figura 1).

El núcleo tegmental rostromedial está formado por un ≈ 72 % de neuronas gabaérgicas. Fue identificado, inicialmente, dentro de una área mesencefálica cuya expresión de c-Fos se incrementaba por la administración aguda y crónica de psicoestimulantes como la cocaína, las anfetaminas y otras drogas de abuso (Perrotti *et al.*, 2005; Kaufling *et al.*, 2010a; Zahm *et al.*, 2010; Lecca *et al.*, 2011, 2012). En el RMTg se han encontrado concentraciones altas de la enzima involucrada en la síntesis de GABA, la glutamato descarboxilasa (GAD). Además, se ha demostrado que las neuronas del núcleo contienen somatostatina (Jhou *et al.*, 2009b), un péptido expresado por algunos tipos de neuronas gabaérgicas de otras áreas cerebrales (Freund y Gulyás, 1991). También, se sabe que las neuronas del RMTg expresan gran cantidad de receptores μ -opiáceos y receptores para cannabinoides (Jhou *et al.*, 2009b, 2012; Jalabert *et al.*, 2011; Lavezzi y Zahm, 2011; Lecca *et al.*, 2011, 2012) los cuales permiten la identificación de estas neuronas mediante herramientas de inmunohistoquímica. Además, las neuronas del RMTg expresan el gen de transcripción temprano Fox-P1, el cual constituye un marcador específico para la identificación de dichas células (Lahti *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019a).

Las neuronas gabaérgicas del RMTg poseen similitud en características electrofisiológicas con otras neuronas gabaérgicas (como las de la sustancia nigra *pars reticulata* (Gulley *et al.*, 1999)): *in vivo*, tienen una tasa de disparo entre 11 – 17 Hz, un potencial de acción de breve duración (1 ms) e intervalos interespiga de rango 50 – 70 ms (Jhou *et al.*, 2009a; Jalabert *et al.*, 2011; Lecca *et al.*, 2011).

Las aferencias al RMTg

El RMTg recibe una importante entrada glutamatérgica proveniente de la habénula lateral (LHb) (Jhou *et al.*, 2009b; Kaufling *et al.*, 2009; Brinschwitz *et al.*, 2010; Balcita-Pedicino *et al.*, 2011; Lavezzi y Zahm, 2011), así como entradas colinérgicas de los núcleos tegmentales laterodorsal (LDTg) y pedúnculo pontino (PPTg) (Woolf y Butcher, 1989; Yeomans, 2012; Wasserman *et al.*, 2013; Yetnikoff *et al.*, 2014). Sin embargo, también estudios previos han demostrado que el núcleo RMTg recibe aferencias glutamatérgicas, en menor medida, desde el globo pálido ventral, el área preóptica lateral y la corteza prefrontal; gabaérgicas desde el hipotálamo lateral y dorsal, el núcleo geniculado ventrolateral, la región supramamilar, la columna dorsolateral de la sustancia gris periacueductal, de los núcleos tegmentales pedúnculo pontino y laterodorsal, el *tectum* (colículos superiores), el núcleo parabraquial y la formación reticular paramediana pontina (Jhou *et al.*, 2009b; Lavezzi y Zahm, 2011); aferentes no-orexinérgicas desde el hipotálamo (región dorsal, caudal, lateral y el área preóptica); colinérgicas desde el *septum* y el cíngulo anterior; dopaminérgicas desde la sustancia nigra, y no monoaminérgicas desde el núcleo dorsal del rafe y el *locus coeruleus* (Kaufling *et al.*, 2009; Brinschwitz *et al.*, 2010; Barrot *et al.*, 2012; Bourdy y Barrot, 2012), entre otras aferencias cuya naturaleza no ha sido determinada (**Figura 1**). Interesantemente, la mayoría de las estructuras antes mencionadas también envían terminaciones axonales al VTA (Geisler y Zahm, 2005); sin embargo, las proyecciones axónicas a ambos núcleos provienen de subpoblaciones neuronales distintas. Por ejemplo, mientras que el RMTg recibe terminales axonales de la habénula lateral, el VTA recibe proyecciones originadas en la parte medial de la habénula (MHb).

Las eferencias del RMTg

Las eferentes del RMTg se distribuyen por el cerebro anterior, incluidos el diencéfalo y la corteza cerebral. Sin embargo, las estructuras más densamente inervadas por el RMTg son los núcleos dopaminérgicos mesencefálicos del VTA y la SNc, y en menor grado, el campo retrorubral (RR) (Jhou, 2005; Ferreira *et al.*, 2008; Jhou *et al.*,

2009b; Kaufling *et al.*, 2010b; Matsui y Williams, 2011). Adicionalmente, el RMTg conecta con el núcleo dorsal del rafe y el núcleo tegmental laterodorsal (Jhou *et al.*, 2009b; Kaufling *et al.*, 2010b; Lavezzi *et al.*, 2012). Se ha determinado que aproximadamente el 80% de los axones que provienen del RMTg y hacen sinapsis con neuronas dopaminérgicas del VTA, contactan principalmente con dendritas proximales (Balcita-Pedicino *et al.*, 2011), aunque también se han observado contactos sinápticos con los somas (Ferreira *et al.*, 2008; Jhou *et al.*, 2009b; Kaufling *et al.*, 2010a).

Funciones del RMTg

Estudios recientes han demostrado que el RMTg está implicado en diversas funciones reguladoras del comportamiento y del movimiento (Lecca *et al.*, 2011; Barrot *et al.*, 2012; Bourdy y Barrot, 2012). Primordialmente, el núcleo desempeña un papel regulador sobre la actividad de las neuronas dopaminérgicas del VTA y otras estructuras pontinas. Dada su ubicación anatómica y sus entradas y proyecciones, se ha propuesto al RMTg como un “centro integrador” que recibe información proveniente de diversas regiones cerebrales y a su vez, la canaliza hacia el sistema dopaminérgico mesolímbico regulando diversas respuestas de tipo emocional y conductual (Lavezzi y Zahm, 2011; Bourdy y Barrot, 2012).

Algunos estudios electrofisiológicos en roedores, *in vitro* e *in vivo*, han demostrado que la inhibición de las neuronas del RMTg incrementa la actividad de las neuronas dopaminérgicas del VTA (Jalabert *et al.*, 2011; Kaufling y Aston-Jones, 2015). Este hallazgo también demuestra que el RMTg ejerce un tono inhibitorio sobre las neuronas dopaminérgicas de dicho núcleo, ya que al inhibirse el RMTg, se incrementa la actividad espontánea de éstas neuronas. En forma opuesta, la estimulación del núcleo RMTg disminuye la actividad de los sistemas dopaminérgicos (Hong *et al.*, 2011; Lecca *et al.*, 2011, 2012; Matsui y Williams, 2011).

Apoyando estas mismas observaciones, estudios de optogenética han demostrado que la fotoestimulación de las neuronas gabaérgicas del RMTg, transfectadas con el canal catiónico fotosensible channelrodopsin 2 (ChR2), incrementa las corrientes postsinápticas

inhibitorias (IPSCs) registradas en el VTA. Dicho efecto está mediado por receptores GABA_A (Matsui y Williams, 2011). Resultados análogos se han obtenido en estudios *in vivo* en primates (mono Rhesus), donde el 94% de las neuronas de la sustancia nigra *pars compacta* se inhibió al estimular al RMTg (Hong *et al.*, 2011).

Desde un enfoque farmacológico, se ha observado que la inhibición del RMTg con muscimol, un agonista de los receptores GABA_A, incrementa la actividad espontánea de las neuronas gabaérgicas del VTA (Jalabert *et al.*, 2011; Kaufling y Aston-Jones, 2015), lo que sugiere que el RMTg está inhibiendo de manera tónica a estas neuronas.

Dada la diversidad de las conexiones anatómicas del núcleo, se piensa que el RMTg integra información sensorial externa para ajustar una salida motora. Dicho control motor puede ser ejercido gracias a las proyecciones del RMTg hacia la sustancia nigra compacta, modulando el circuito nigroestriatal (Bourdy *et al.*, 2014). Por otro lado, el RMTg también tiene proyecciones ascendentes hacia estructuras como el *locus coeruleus* y la amígdala, y descendentes que conectan con núcleos motores mesopontinos (Jhou *et al.*, 2009b). Por lo anterior, se ha propuesto que el RMTg participa en la regulación de la conducta motora motivada (Holstege *et al.*, 1996; Holstege, 2009), que es parte de las respuestas adaptativas a estímulos que tienen un significado emocional para el individuo (Holstege, 2009).

La vía LHb – RMTg – VTA y el circuito mesolímbico cortical

La proyección LHb-RMTg se encuentra organizada topográficamente, donde zonas mediales y laterales del RMTg reciben proyecciones de áreas mediales y laterales de la LHb, respectivamente (Lavezzi y Zahm, 2011). Esta proyección, en su mayoría es ipsilateral, aunque también existen proyecciones contralaterales, en menor grado (Kaufling *et al.*, 2009). Aproximadamente, un 53% de las aferentes de la LHb medial, llegan a neuronas gabaérgicas del RMTg (Balcita-Pedicino *et al.*, 2011). La actividad neuronal de la LHb incrementa en respuesta a estímulos aversivos y a señales que predicen la omisión de la recompensa (Christoph *et al.*, 1986; Gao *et al.*, 1996; Ji y Shepard,

2007; Matsumoto y Hikosaka, 2007; Shumake *et al.*, 2010) y debido a que las proyecciones de la LHb al VTA son principalmente glutamatérgicas (Geisler *et al.*, 2007; Brinschwitz *et al.*, 2010), éstas pueden inhibir a las neuronas dopaminérgicas sólo a través de un componente inhibitorio intermedio: el RMTg. Acorde con lo anterior, estudios conductuales demuestran que la estimulación de las aferentes glutamatérgicas al RMTg, produce aversión y conductas de evitación antes estímulos que normalmente son inocuos (Jhou, 2005; Stamatakis y Stuber, 2012).

El VTA posee neuronas dopaminérgicas principalmente, aunque también se han descrito neuronas gabaérgicas y glutamatérgicas en el núcleo. Y se ha demostrado que aproximadamente el 75% de las neuronas que expresan GAD₆₇ en el RMTg, establecen contacto directo con neuronas dopaminérgicas del VTA (Jhou *et al.*, 2009b). El VTA ha sido descrita como una estructura que decodifica la información sobre estímulos gratificantes y aversivos. También, es necesaria su participación en las propiedades adictivas de las drogas de abuso, como la nicotina y la cocaína (Nestler, 2004; Jones y Bonci, 2005; Mazei-Robison y Nestler, 2012). La actividad dopaminérgica depende de un fino balance entre las aferencias glutamatérgicas excitatorias y las gabaérgicas inhibitorias, que actúan como un freno a la excitación y ajustan la tasa y el patrón de disparo de las neuronas dopaminérgicas del VTA.

Por otro lado, el circuito mesolímbico cortical (vía mesoaccumbens) es una ruta nerviosa funcional descrita en comportamientos adaptativos de los individuos, tales como la recompensa y el aprendizaje por reforzamiento, así como la búsqueda de comida y la evitación de peligro (Schultz *et al.*, 1997).

En la **Figura 1** se esquematizan las principales aferencias y eferencias del RMTg. Nótese la cercanía anatómica entre el RMTg y el VTA, lo cual sugiere también su estrecha relación funcional.

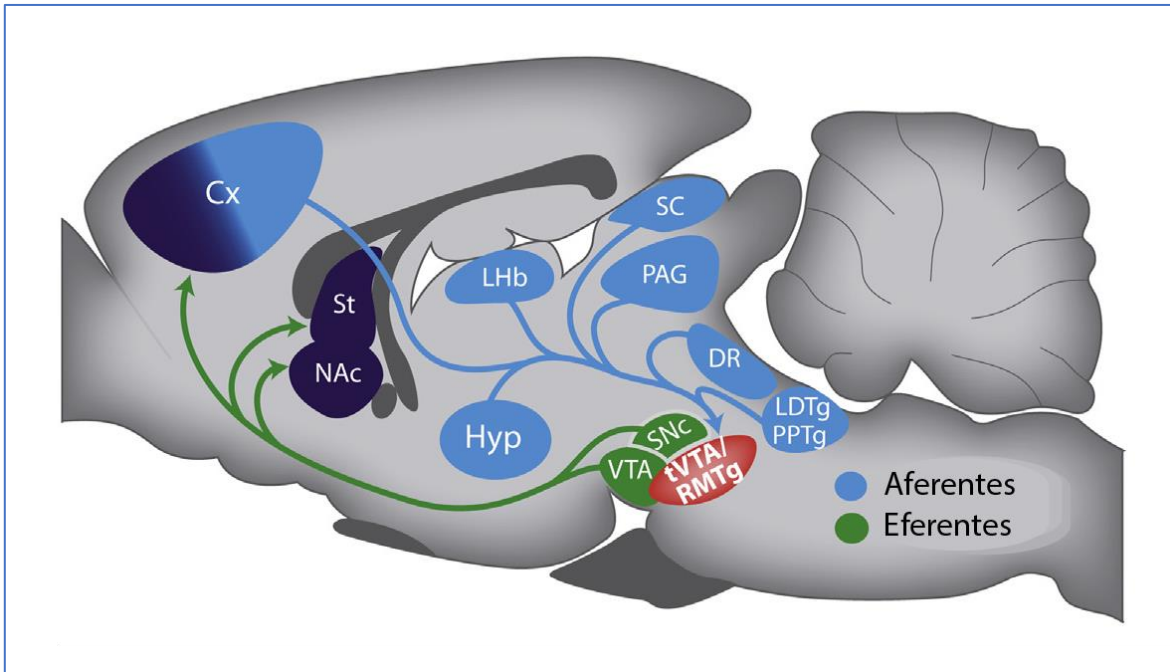


Figura 1. Esquema que muestra la ubicación del núcleo RMTg en el mesencéfalo de rata y su relación anatómica con otras estructuras. El núcleo tegmental rostromedial está ubicado en la región que conecta el tallo cerebral con el cerebro anterior. Recibe numerosas proyecciones y también envía importantes conexiones, de manera local a estructuras contiguas como el VTA y la SNc, así como a zonas subcorticales. Cx, Corteza frontal, St, núcleo estriado dorsal, NAc, núcleo accumbens, LHb, habénula lateral, Hyp, Hipotálamo, SC, colículos superiores, PAG, sustancia gris periacueductal, DR, núcleo dorsal del rafe, LDTg, núcleo tegmental laterodorsal, PPTg, núcleo pedúnculo pontino, SNc, sustancia nigra *pars compacta*, VTA, área tegmental ventral, tVTA/RMTg, núcleo tegmental rostromedial. (Tomado y modificado de: *Handbook of Basal Ganglia Structure and Function, 2nd edition, Academic Press, 2017*).

El GABA como neurotransmisor inhibitorio

El ácido gamma aminobutírico o GABA, es el principal neurotransmisor inhibitorio en el cerebro de mamíferos adultos. Su síntesis es a partir de la descarboxilación del glutamato, proceso mediado por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD), de la cual existen dos isoformas (GAD₆₅ y GAD₆₇) que difieren tanto en sus propiedades cinéticas como catalíticas (Walls *et al.*, 2010; Rowley *et al.*, 2012). Además, la expresión de estas dos isoformas también es variable en las neuronas del SNC: La GAD₆₅ se concentra más en las terminales axónicas, mientras que la GAD₆₇ se localiza principalmente en los somas y dendritas (Kleppner y Tobin, 2001, 2002; Schousboe y Waagepetersen, 2009; Zhao, Eisinger y Gammie, 2013). La identificación de la expresión de GAD_{65/67}, a través de técnicas de marcaje inmunocitoquímico, constituye una herramienta importante

para la identificación de la naturaleza gabaérgica de las neuronas, toda vez que, la GAD_{65/67} es expresada solamente en neuronas que sintetizan y almacenan GABA como principal neurotransmisor en el SNC (Olsen, 1999).

Después de ser sintetizado en la terminal presináptica, el GABA se almacena principalmente en vesículas, desde las cuales es liberado mediante exocitosis a la hendidura sináptica, cuando la neurona gabaérgica se despolariza (Nicholls, 1989; Olsen, 1999; Rowley *et al.*, 2012; Rashmi *et al.*, 2018). Adicionalmente, se sabe que existe una síntesis y liberación no vesicular de GABA (Allen *et al.*, 2004).

El GABA es degradado a succinato semialdehído (SSA) por acción de la GABA-Transaminasa (GABA-T), una enzima mitocondrial, y posteriormente, el SSA es oxidado a succinato, por la succinato semialdehído deshidrogenasa (SSADH) (Rowley *et al.*, 2012). Por otro lado, puede ser transportado hacia el interior de neuronas y células gliales mediante transportadores de GABA (GATs, por sus siglas en inglés), localizados en la membrana plasmática. Así, el GABA recapturado en las terminales presinápticas puede ser reutilizado. El GABA puede ejercer sus efectos fisiológicos en las células a través de tres principales tipos de receptores: los receptores GABA_A y GABA_C, los cuales son receptores ionotrópicos cuyo canal iónico permiten el paso de cloro; y los receptores GABA_B, que son receptores metabotrópicos que están acoplados a proteínas G (Miralles *et al.*, 1999).

El glutamato, principal neurotransmisor excitatorio en el cerebro

El glutamato o ácido glutámico es un aminoácido que se encuentra en el cerebro en altas concentraciones y tiene efectos excitatorios sobre la actividad neuronal; se le considera el principal neurotransmisor excitatorio del organismo. También, el glutamato es precursor en la síntesis del neurotransmisor inhibitorio GABA (Cooper *et al.*, 2002).

Existen dos fuentes principales de glutamato a nivel cerebral: 1) su síntesis a partir de la glucosa a través del ciclo de Krebs y la transaminación del α -cetoglutarato, y 2) obtenido a partir de la

glutamina, que es sintetizada en las células gliales y transportada a la terminal nerviosa donde es convertida en glutamato por la glutaminasa (Rowley *et al.*, 2012). Después de ser sintetizado, el glutamato es almacenado en vesículas sinápticas desde donde es liberado mediante exocitosis (proceso dependiente de calcio) una vez que se despolariza la membrana celular (Nicholls, 1989; Cooper *et al.*, 2002; Rowley *et al.*, 2012). Sin embargo, al igual que ocurre con el GABA, se ha descrito una liberación de glutamato no vesicular (Allen *et al.*, 2004).

Se han descrito tres subtipos de receptores ionotrópicos para el glutamato: los receptores N-metil-D-aspartato (receptores NMDA), los receptores de ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (receptores AMPA) y los receptores de kainato. Los tres son canales iónicos que, al abrirse, permiten el flujo de iones de calcio, sodio y potasio (Hassel y Dingledine, 2012). Por otra parte, se han descrito ocho tipos de receptores metabotrópicos para el glutamato (mGLUR1 – mGLUR8), los cuales no son canales iónicos, sino que actúan mediante la activación de enzimas intracelulares a través de una proteína G que está acoplada al receptor (Ozawa *et al.*, 1998).

La acción del glutamato sobre su receptor es finalizada por la recaptura del neurotransmisor por transportadores con alta afinidad, ubicados en la membrana presináptica y en las células gliales (Cooper *et al.*, 2002; Rowley *et al.*, 2012).

La acetilcolina y su papel en el mesencéfalo

La acetilcolina (ACh) es un neurotransmisor ampliamente distribuido en el organismo: en el sistema nervioso periférico, media la transmisión sináptica en la unión neuromuscular, además permite la comunicación sináptica de los ganglios autonómicos y en diversos sitios dentro del sistema nervioso central, regula múltiples procesos fisiológicos (Purves *et al.*, 2001). Asimismo, la acetilcolina es uno de los neurotransmisores involucrados en la modulación de la actividad de las neuronas del RMTg. En este núcleo, la acetilcolina es liberada por terminales colinérgicas cuyo soma neuronal se localizan en los núcleos tegmentales laterodorsal y pedúnculo pontino (Woolf y Butcher, 1989;

Omelchenko y Sesack, 2005; Kaufling *et al.*, 2009; Wasserman *et al.*, 2013).

La acetilcolina fue el primer neurotransmisor identificado (Fisher y Wonnacott, 2012). Es un éster que deriva de la unión de una molécula de acetil coenzima A (acetil-CoA) y una de colina, reacción catalizada por la colina acetiltransferasa (ChAT, por su nombre en inglés) (Purves *et al.*, 2001). Una vez sintetizada en el citoplasma de la terminal sináptica, la acetilcolina es almacenada en vesículas desde donde es liberada al espacio sináptico mediante exocitosis (proceso mediado por el calcio). Su degradación en la hendidura sináptica es llevada a cabo por la enzima acetilcolinesterasa, presente en la membrana postsináptica principalmente (aunque también se ha visto presencia de la enzima en la presinapsis) (Fisher y Wonnacott, 2012). Esta enzima degrada la molécula de acetilcolina produciendo acetato y colina, ésta última es recapturada por la terminal presináptica y utilizada posteriormente para la formación de nuevas moléculas del neurotransmisor.

La carga de las vesículas sinápticas se da por transporte activo secundario, mediante el transportador vesicular de acetilcolina (VAChT, por su nombre en inglés) el cual es un intercambiador de protones-acetilcolina. Cuando es liberada, la ACh alcanza rápidamente concentraciones cercanas a 1 mM en el espacio sináptico, en los mamíferos, y hasta 1 M en la raya *Torpedo* (Fisher y Wonnacott, 2012). Paralelamente, la concentración de ACh en el espacio sináptico decremente también rápidamente debido a su difusión y a su hidrólisis por acción de la acetilcolinesterasa (Pidoplichko *et al.*, 1997; Dani *et al.*, 2000). Por las razones anteriores, al estudiar los efectos de la acetilcolina, se pueden utilizar inhibidores de la acetilcolinesterasa (como la eserina), lo que permite que la ACh permanezca por más tiempo en el espacio sináptico y, por lo tanto, alcanzarse concentraciones de ACh mayores, lo que favorecería la identificación de sus efectos.

La acetilcolina puede ejercer sus efectos al unirse a receptores colinérgicos de tipo muscarínico (mAChR) y nicotínico (nAChR). Los receptores colinérgicos se han dividido en muscarínicos y nicotínicos, basados en el efecto agonista de los alcaloides naturales muscarina y

nicotina, respectivamente (Watson *et al.*, 1987). A su vez, los receptores nicotínicos pertenecen a la familia de canales iónicos dependientes de ligando, como es el caso de los receptores GABA_A, 5-HT₃ y glicinérgicos.

Los receptores nicotínicos son canales ionotrópicos pentaméricos, formados por la combinación de las subunidades α y β , mientras que los receptores muscarínicos son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G. Se han identificado 5 subtipos de mAChR (M1 – M5). Los receptores M1, M3 y M5 están acoplados preferentemente a proteínas G de la familia Gq/G₁₁, proteínas que a su vez activan a la enzima fosfolipasa C, produciendo efectos excitatorios en la célula. Los receptores M2 y M4, por el contrario, están acoplados a proteínas G de la familia Gi/Go e inhiben a la enzima adenilato ciclasa y decrementan las concentraciones de AMPc, provocando efectos inhibitorios en la célula (Cooper *et al.*, 1975; Albuquerque *et al.*, 2009; Barik y Wonnacott, 2009; Fisher y Wonnacott, 2012; Yeomans, 2012).

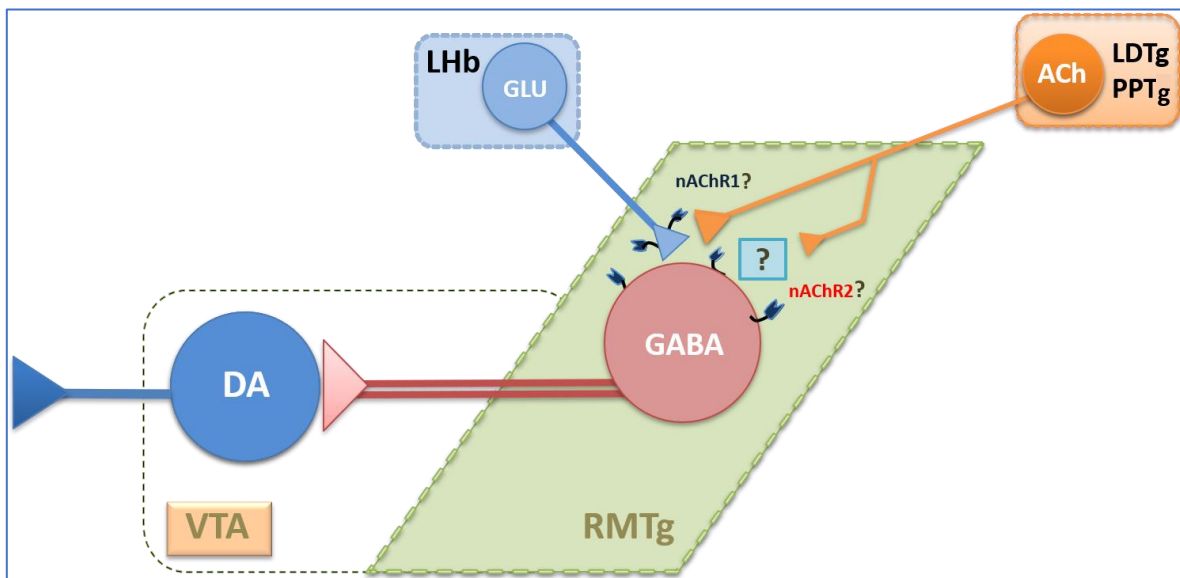


Figura 2. El RMTg: el principal freno gabaérgico del sistema dopaminérgico mesolímbico. El diagrama ilustra: el núcleo RMTg (romboide verde) y su principal entrada excitatoria dada por aferentes glutamatérgicas (GLU) provenientes de la habénula lateral (LHb) (rectángulo azul), las aferentes colinérgicas (ACh) provenientes de los núcleos tegmentales laterodorsal (LTDg) y pedúnculo pontino (PPTg) (rectángulo anaranjado) y la principal eferencia del RMTg hacia los sistemas dopaminérgicos (DA) cercanos, como el VTA. Una mayor actividad de las neuronas gabaérgicas del RMTg deprime la actividad de las neuronas dopaminérgicas. El esquema también enfatiza la importancia de estudiar la regulación de la liberación de glutamato en el RMTg, a través de receptores nicotínicos presinápticos. Finalmente, se desconoce si existen receptores postsinápticos en el soma de las neuronas gabaérgicas del RMTg. **VTA**, área tegmental ventral; **nAChRs1**, receptores nicotínicos presinápticos; **nAChRs2**, receptores nicotínicos postsinápticos.

Los receptores nicotínicos cerebrales

La señalización colinérgica mediada por receptores nicotínicos está ampliamente distribuida tanto en el sistema nervioso central como en el sistema nervioso periférico e involucra un gran número de procesos fisiológicos como el aprendizaje, la memoria, la atención, la vigilia, la actividad motora y la ansiedad, entre otros (Gotti *et al.*, 1997; Hogg *et al.*, 2003; Picciotto, 2003; Zoli *et al.*, 2015).

Los receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs) son pentámeros formados por cinco subunidades que pueden ser de tipo α o β . Si el receptor nicotínico es conformado por cinco subunidades idénticas de tipo α (p. Ej. $\alpha 7$ o $\alpha 9$), se le denomina homo-oligómero. Por el contrario, cuando los receptores nicotínicos están formados por la combinación de subunidades α y β , se les llama hetero-oligómeros (Changeux *et al.*, 1992, 1998). A la fecha, se han identificado 10 subunidades α ($\alpha 1$ – $\alpha 10$), de las cuales sólo la subunidad $\alpha 1$ se localiza exclusivamente en el músculo; además, la subunidad $\alpha 8$ está presente en aves, pero no en mamíferos (Lindstrom *et al.*, 1996; Millar y Gotti, 2009). De la subunidad β se han identificado sólo tres tipos ($\beta 2$ – $\beta 4$) (Hogg *et al.*, 2003; Gotti y Clementi, 2004; Dani y Bertrand, 2007) (**Figura 3**).

La combinación de distintas subunidades (α y β) da lugar a múltiples subtipos de nAChRs nombrados con base en la combinación de dichas subunidades que los conforman. 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. (Gotti *et al.*, 2006; Wu y Lukas, 2011). Sin embargo, aproximadamente el 90% de los nAChRs expresados en el sistema nervioso central son los subtipos $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ (Whiting y Lindstrom, 1986; Gotti *et al.*, 2006) (**Figura 3**).

Las subunidades que forman cada subtipo de nAChR les confieren sus propiedades electrofisiológicas y farmacológicas, determinando su afinidad a los diversos fármacos agonistas y antagonistas. Además, son las subunidades de los nAChRs responsables de la potencia y eficacia de estos fármacos (Luetje y Patrick, 1991; Decker *et al.*, 1995; Harvey *et al.*, 1997; Stauderman *et al.*, 1998).

El receptor $\alpha 4\beta 2$ está formado por dos subunidades $\alpha 4$ y tres subunidades $\beta 2$ (sin embargo, existe evidencia de que este subtipo

puede tener otra estequiometría). Este nAChR es el de mayor distribución en el sistema nervioso central, expresado principalmente en la corteza cerebral, el núcleo estriado, el núcleo supraquiasmático, el núcleo geniculado lateral y el mesencéfalo, entre otras estructuras (Whiting *et al.*, 1991; Flores *et al.*, 1992). Los receptores $\alpha 4\beta 2$ poseen mucho mayor afinidad por la nicotina (en el orden nanomolar) que el receptor $\alpha 7$ (en el orden micromolar), pero se desensibilizan más rápidamente (Decker *et al.*, 1995; Picciotto *et al.*, 1998; Zoli *et al.*, 1998; Lambe *et al.*, 2003; Wooltorton *et al.*, 2003).

Los receptores $\alpha 7$ son homo-oligómeros constituidos por cinco subunidades $\alpha 7$ idénticas entre sí. Se distribuyen ampliamente en el cerebro; particularmente se expresan en la corteza, el hipocampo y regiones subcorticales límbicas, y en menor grado, en regiones talámicas y los ganglios basales (Broide *et al.*, 1995; Breese *et al.*, 1997; Wooltorton *et al.*, 2003; Machaalani *et al.*, 2010). Los nAChRs $\alpha 7$ presentan 10 veces más permeabilidad al calcio que los $\alpha 4\beta 2$ (Role y Berg, 1996) y se desensibilizan con cantidades saturantes de acetilcolina o nicotina (Seguela *et al.*, 1993; Wooltorton *et al.*, 2003).

Es bien sabido que en el encéfalo, los nAChRs se localizan principalmente en las terminales sinápticas, donde participan modulando la liberación de diversos neurotransmisores (McGehee *et al.*, 1995; Wonnacott, 1997; MacDermott *et al.*, 1999; McKay *et al.*, 2007; Dickinson *et al.*, 2008; Exley y Cragg, 2008; Surmeier y Graybiel, 2012).

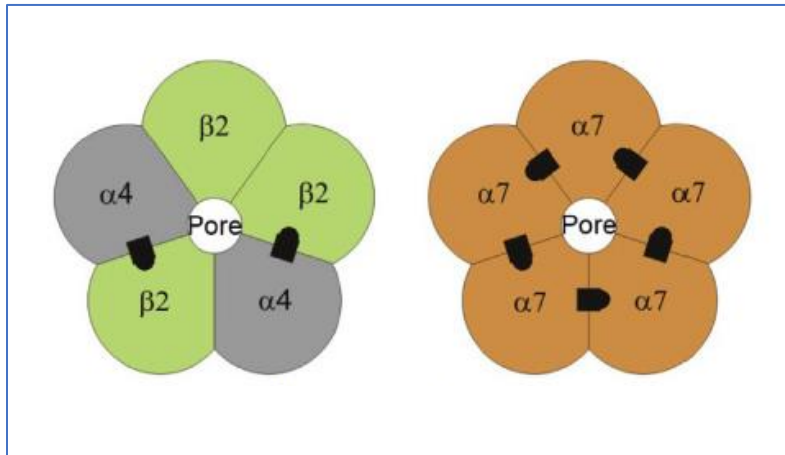


Figura 3. Los nAChRs neuronales están formados por la combinación de dos distintas subunidades: α y β . Figura ilustrativa mostrando las subunidades de los nAChRs organizadas como pentámeros alrededor de un poro hidrosoluble permeable a cationes. Los nAChRs más comunes en el cerebro son el subtipo $\alpha 4\beta 2$ (heterooligomérico) y el subtipo $\alpha 7$ (homooligomérico). Los sitios de unión para la acetilcolina (ACh) están indicados por las siluetas en negro, localizadas entre las subunidades adyacentes. (Tomado de: Dani J, 2015. Chapter I: Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor en International Review of Neurobiology, Vol. 124).

Regulación presináptica de la liberación de glutamato en el tallo cerebral

Las aferentes glutamatérgicas provenientes de la habénula lateral constituyen la principal entrada excitatoria al núcleo RMTg (Jhou *et al.*, 2009a, 2009b; Kaufling *et al.*, 2009, 2010a; Gonçalves *et al.*, 2012). Al mismo tiempo, el RMTg recibe una importante entrada colinérgica constituida por las aferentes que llegan desde los núcleos tegmentales laterodorsal y pedúnculo pontino (Kaufling *et al.*, 2009; Brinschwitz *et al.*, 2010; Barrot *et al.*, 2012; Bourdy y Barrot, 2012). Adicionalmente, en diversas estructuras cerebrales como el hipocampo, la corteza y el tálamo, entre otras, se ha demostrado que la liberación de glutamato es regulada por la acetilcolina, gracias a la activación de receptores nicotínicos presinápticos (McGehee *et al.*, 1995; Girod y Role, 2001; Chen *et al.*, 2003; Lambe *et al.*, 2003; Maggi *et al.*, 2004; Dickinson *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2008). En la mayoría de los casos mencionados, el efecto es mediado por receptores nicotínicos subtipo $\alpha 7$, aunque también se ha observado que la liberación de glutamato involucra la activación de los receptores $\alpha 4\beta 2$ (Gioanni, 1999; Lambe *et al.*, 2003; Garduño *et al.*, 2012; Grunnet *et al.*, 2012).

Trabajos previos han sugerido la presencia de nAChRs en el RMTg. Por ejemplo, se ha reportado que la aplicación sistémica de nicotina aumenta la tasa de disparo de las neuronas de este núcleo (Lecca *et al.*, 2011, 2012). Sin embargo, los efectos de la activación de receptores nicotínicos en el núcleo RMTg y su interacción con la transmisión glutamatérgica no han sido estudiados de forma detallada (**Figura 2**).

Por lo anterior, en el presente trabajo de tesis nos propusimos estudiar si también en el RMTg la acetilcolina ejerce efectos moduladores sobre la liberación de glutamato, a través de receptores nicotínicos presinápticos y de ser así, identificar el subtipo o los subtipos de nAChRs involucrados en esta regulación. Así, la pregunta central del presente trabajo es si la acetilcolina, a través de la activación de nAChRs, puede modular la liberación espontánea de glutamato en el núcleo RMTg, como ocurre en otras estructuras cerebrales.

JUSTIFICACIÓN

La nicotina es el principal componente psicoestimulante del tabaco y tiene efectos nocivos para la salud de las personas que la consumen. El efecto de la nicotina en fumadores es principalmente ansiolítico, sin embargo, este efecto es variable a lo largo del tiempo, ya que los propios fumadores refieren una mayor sensación placentera con el primer cigarro del día, y la misma sensación va decreciendo mientras más cigarros se consumen en el día (Miller y Picciotto, 2016). Se ha visto en individuos que consumen nicotina de forma crónica, una variedad de alteraciones en el comportamiento que tienen su origen en disfunciones cognitivas y fisiológicas (Mansvelder *et al.*, 2006). Dichas alteraciones pueden deberse a cambios a nivel de los receptores nicotínicos que están presentes en las neuronas de los circuitos cerebrales que participan en el sistema de recompensa y aversión (Mansvelder *et al.*, 2006; Albuquerque *et al.*, 2009; Dani, 2015).

Estudiar la participación de los receptores nicotínicos en la modulación de la actividad de las neuronas gabaérgicas del RMTg, las cuales participan en los sistemas de recompensa y aversión de los individuos, es crucial para comprender cómo la nicotina produce sus efectos adictivos. No es de extrañar que los estudios más recientes sobre este núcleo hayan perfilado al RMTg como un posible blanco terapéutico en el tratamiento de algunos trastornos psiquiátricos como la ansiedad, la depresión, y por supuesto, las conductas adictivas.

Por lo anterior, el presente trabajo de tesis tiene el propósito de contribuir al conocimiento de la fisiología del RMTg, particularmente del efecto de la nicotina en la modulación de la actividad de dicho núcleo, conociendo los mecanismos por los cuales los receptores nicotínicos incrementan la excitabilidad de las neuronas gabaérgicas del RMTg, Lo anterior, a través de técnicas de electrofisiología y de imagenología de calcio, las cuales permiten un conocimiento del núcleo desde un enfoque celular y poblacional, respectivamente.

HIPÓTESIS

Las terminales glutamatérgicas que inervan a las neuronas gabaérgicas del RMTg tienen receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs) funcionales. La estimulación de estos receptores promoverá una mayor liberación de glutamato, lo cual provocará un aumento en la actividad sincrónica de las neuronas gabaérgicas de este núcleo.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar los efectos de la nicotina en las corrientes postsinápticas excitatorias espontáneas (sEPSCs) de las neuronas gabaérgicas del RMTg, mediante técnicas de registro electrofisiológico.

Objetivos particulares

1. Determinar la naturaleza gabaérgica de las neuronas registradas, mediante técnicas de inmunocitoquímica.
2. Identificar el efecto de la nicotina sobre la frecuencia de las sEPSCs mediadas por glutamato, registradas en las neuronas gabaérgicas del RMTg.
3. Caracterizar farmacológicamente el subtipo de receptor nicotínico involucrado en el efecto de la nicotina, utilizando agonistas y antagonistas selectivos de los nAChRs $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$.
4. Determinar la localización sináptica del receptor nicotínico: a nivel pre o postsináptico.
5. Investigar los mecanismos celulares del efecto de la nicotina.
6. Emplear técnicas de imagenología de calcio para establecer si existe un efecto excitatorio poblacional de la nicotina en neuronas del RMTg.

METODOLOGÍA

Preparación de las rebanadas

Todos los experimentos fueron realizados siguiendo los protocolos técnicos establecidos en la norma oficial mexicana (NOM-062-ZOO-1999) para la producción, cuidado y uso correcto de los animales de laboratorio. Dichos protocolos fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar de 21 – 25 días de edad, provenientes del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM, las cuales estuvieron bajo condiciones controladas de alimento, agua, ventilación y ciclos 12/12 horas de luz-oscuridad. El rango de edad mencionado se eligió con base a lo reportado en estudios previos, donde se afirma que a partir de los 20 días de edad la diferenciación celular se ha completado y la expresión de receptores nicotínicos en la rata no cambia (Van de Kamp y Collins, 1994; Miao *et al.*, 1998; Slotkin *et al.*, 2004).

Las ratas fueron primeramente anestesiadas con una combinación de xilacina – ketamina (dosis: 15 mg/Kg – 85 mg/Kg, respectivamente, vía intraperitoneal) y posteriormente sacrificadas por decapitación empleando una guillotina fabricada en la propia Facultad de Medicina, cuidando los aspectos bioéticos necesarios para evitar el sufrimiento de los animales. Después, sus cerebros fueron rápidamente removidos y colocados en una solución de Ringer mantenida a 4°C, preparada con las siguientes sustancias (concentración expresada en mM/L): 125 NaCl, 3 KCl, 25 NaHCO₃, 1.25 Na₂HPO₄, 1 MgCl₂, 1.2 CaCl₂ y 25 glucosa. La osmolaridad fue de 300 mOsm/L y el pH se ajustó a 7.3. Esta solución se mantuvo oxigenada con una mezcla de 95% O₂ – 5% CO₂. Se obtuvo un bloque de tejido de la región del mesencéfalo el cual fue colocado y pegado a una caja de Petri y se agregó solución de Ringer fría (4°C) hasta cubrir el bloque de tejido. Utilizando un vibratomo (Pelco 102, Ted Pella, Inc) se obtuvieron de 4 – 5 rebanadas coronales de 250 µm de grosor, conteniendo el núcleo RMTg. Las rebanadas obtenidas fueron mantenidas en solución de Ringer a temperatura

ambiente (~20 – 22°C) por al menos una hora, previo al inicio de los registros.

Registros electrofisiológicos

Una rebanada a la vez fue transferida a una cámara de registro hecha de Plexiglas y fue perfundida constantemente con solución de Ringer a una tasa de 4 – 5 ml/min y a una temperatura de 33°C (con un termostato TC-324B, Warner Instruments). Las neuronas del RMTg se visualizaron empleando un sistema de videomicroscopía por luz infrarroja (BX51WI, Olympus Instruments, Japan) y un objetivo de inmersión de agua de 80X. La imagen de la célula registrada fue obtenida con una cámara CCD y visualizada en un monitor. Para obtener los registros de las células, se empleó la técnica de *patch clamp* en su modalidad célula completa (“whole-cell”), en las configuraciones de fijación de voltaje y fijación de corriente y utilizando un amplificador MultiClamp 700B (Molecular Devices, LLC). Las señales de registro fueron obtenidas y digitalizadas con un convertidor analógico-digital (Digidata 1440A, Molecular Devices, LLC), a una tasa de muestreo de 5 kHz y subsecuentemente almacenadas en una computadora personal con la ayuda del software Clampex 10 (Molecular Devices, LCC) para su análisis posterior. Sólo se registró una célula por rebanada.

Las micropipetas o microelectrodos de registro fueron fabricados mediante un estirador (Sutter Instruments, Novato, CA) utilizando tubos de borosilicato (WPI). Los microelectrodos fueron llenados con una solución interna conteniendo (en mM): 140 K-gluconato, 5 NaCl, 1 MgCl₂, 0.02 EGTA, 10 HEPES, 2 Mg₂-ATP, 0.5 Na₂-GTP, y 0.3% de biocitina. La osmolaridad de la solución fue de 280 – 300 mOsm/L y el pH se ajustó a 7.2 – 7.3 con Trizma base. En un grupo experimental, se añadió BAPTA (10 mM) en la misma solución interna, con 130 mM de K-gluconato. La resistencia de los microelectrodos fue de 4 – 7 MΩ.

Todas las neuronas registradas se localizaron dentro del RMTg, en la parte ventral del mesencéfalo, dorsolateralmente al núcleo interpeduncular (IPN) y dentro de la decusación del pedúnculo cerebeloso superior (xscp, por sus siglas en inglés) (Barrot *et al.*, 2012).

Al tratarse de una estructura bilateral, se eligieron de manera indistinta células localizadas dentro de los límites que corresponden al núcleo RMTg, tanto del lado izquierdo como del derecho, considerando la línea media como referencia. Cada célula fue primeramente identificada con base a sus características electrofisiológicas, generadas a partir de una relación estímulo–respuesta en la configuración de fijación de corriente. Se seleccionaron aquellas células que mostraron potenciales de acción de breve duración (< 1 ms) y un disparo regular ante la aplicación de un pulso despolarizante, ya que estas son características que han sido descritas en las neuronas gabaérgicas de esta región (Jhou *et al.*, 2009b; Lecca *et al.*, 2011, 2012). Junto a lo anterior, se seleccionaron sólo las neuronas que exhibieron un sobretiro (*overshoot*) de 10 – 20 mV para asegurar la viabilidad del sello. Corroboradas las condiciones antes mencionadas, se procedió al registro de las corrientes postsinápticas excitatorias espontáneas (sEPSCs) en la configuración de fijación de voltaje. El registro de estas corrientes fue hecho de manera continua a un potencial de mantenimiento de -70 mV (Garduño *et al.*, 2012). Todos los experimentos en esta configuración fueron hechos en presencia de gabazina o bicuculina ($10 \mu\text{M}$) para bloquear selectivamente los receptores GABA_A y aislar las corrientes excitatorias mediadas por glutamato. La resistencia de acceso fue monitoreada durante todo el experimento utilizando pulsos despolarizantes de 5 mV y 50 ms de duración. Si la resistencia de acceso variaba $>15\%$, el experimento era descartado.

En la **Tabla 1** se resumen los grupos experimentales del total de registros electrofisiológicos realizados.

Grupo experimental	Fármacos empleados	Células registradas
Nic	Nicotina	19
Eserina	Eserina en presencia de atropina	10
TTX + Nic	Nicotina en presencia de tetrodotoxina (TTX)	6
MLA + Nic	Nicotina en presencia de metilcaconitina (MLA)	6
DHβE + Nic	Nicotina en presencia de dihidro-beta-eritroidina (DH β E)	6
PNU-282987	PNU-282987, agonista de receptores nicotínicos α 7	6
RJR	RJR, agonista de receptores nicotínicos α 4 β 2	6
BAPTA	Nicotina en presencia de BAPTA (en la pipeta de registro)	5
BAPTA-AM	Nicotina en presencia de BAPTA-AM	6
Aplicación local de ACh	Acetilcolina en presencia de atropina y de TTX	20
Tapsigargina	Nicotina en presencia de Tapsigargina	6
CPA	Nicotina en presencia de CPA	6
Cadmio	Nicotina en presencia de CdCl ₂	7
Estroncio	Sustitución con estroncio en la solución de perfusión	6
Bario	Sustitución con bario en la solución de perfusión	6

Tabla 1. Grupos experimentales de registros electrofisiológicos. En la tabla se muestran todos los grupos experimentales que se utilizaron en el estudio. También se muestra el total de neuronas registradas para cada grupo.

Registros de imagenología de calcio

Para los registros poblacionales de imagenología de calcio, se siguió la metodología descrita por Carrillo-Reid *et al.*, 2008. Las rebanadas empleadas en este protocolo experimental fueron incubadas en presencia de 10 μM de fluo 4-AM (Invitrogen, Life technologies, Ciudad de México) disuelto en 0.1 % de dimetilsulfóxido (DMSO) y solución salina, durante 25 – 30 min, a temperatura ambiente ($\sim 27^\circ\text{C}$) y bajo oscuridad para evitar la inactivación del fluoróforo. Se utilizó un microscopio Eclipse FN-1 (Nikon) equipado con un objetivo de inmersión en agua de 16X para visualizar las células. El campo de visualización de la imagen fue de $280 \times 260 \mu\text{m}$, dentro del núcleo RMTg. Para observar los cambios espontáneos en la fluorescencia, se estimuló el fluoróforo con pulsos de luz de una longitud de onda de 488 nm y un tiempo de exposición de 15 – 25 ms, con una fuente de iluminación Lambda HPX-L5 (Sutter Instruments, Petaluma, CA) conectada al microscopio mediante fibra óptica. Se adquirieron secuencias de imágenes (videos breves) a una frecuencia de 4 fotogramas/segundo (250 ms/fotograma) utilizando una cámara digital con enfriamiento (Cool SNAP MYO, Photometrics) y un software personalizado diseñado en el entorno de LabView (Im-Patch) (Pérez-Ortega *et al.*, 2016). La duración de los vídeos fue de 6 min (1440 fotogramas). Al final de cada experimento se utilizó una solución de alta concentración de potasio (3 M) para contabilizar el número de neuronas dentro del campo de registro.

La actividad celular se determinó en función de las variaciones en la señal de fluorescencia, las cuales fueron producidas por los transitorios de calcio generados de manera espontánea por las neuronas (células activas). Las células activas fueron seleccionadas en cada vídeo utilizando una plantilla circular de tamaño variable (4 – 30 μm) y posteriormente, de manera automática y con la recolección de todas las imágenes del vídeo utilizando el software Im-Patch, se creó un mapa de coordenadas de las neuronas activas (Pérez-Ortega *et al.*, 2016) (ver **Figura 4A**). Las señales intracelulares de calcio (transitorios de calcio) de cada región de interés (plantillas circulares) fueron recolectados a lo largo del tiempo. Las señales de fluorescencia dependientes de calcio fueron computadas como $\Delta F/F$, donde ΔF es la intensidad de la

fluorescencia en cualquier fotograma y F es la fluorescencia basal (ver **Figura 4B**). Los transitorios de calcio y su primera derivada fueron tomados como indicadores del disparo neuronal (Carrillo-Reid *et al.*, 2008). Sólo los transitorios con una amplitud 2.5 veces por encima de la desviación estándar del ruido de fondo, fueron considerados para el análisis. A partir de los transitorios de calcio de cada experimento se construyó una matriz binaria de ceros (0) y unos (1), en donde cada fila corresponde a cada una de las células que se activaron durante el experimento y cada columna a cada uno de los fotogramas del experimento completo. En esta matriz, “1” representa actividad y “0” inactividad de la neurona correspondiente en un fotograma de interés. Por lo anterior, el eje de las ordenadas (Y) corresponde al total de neuronas activas a lo largo del experimento y el eje de las abscisas (X) representa el número del fotograma correspondiente en el vídeo (ventana de tiempo). Las matrices fueron utilizadas para generar gráficas tipo raster (rasterplot) para ilustrar la actividad de todas las neuronas activas a lo largo del experimento. La actividad de todas las células por ventana de tiempo fue graficada debajo del *rasterplot* en forma de un histograma (histograma de coactividad) (Carrillo-Reid *et al.*, 2008). Todos los registros se examinaron minuciosamente y de forma manual para remover artefactos y transitorios de calcio lentos, los cuales podrían corresponder a la actividad de células gliales (Ikegaya *et al.*, 2005). Para determinar la sincronía del disparo neuronal entre células con actividad simultánea, se utilizaron simulaciones de Montecarlo (1'000 simulaciones) (Carrillo-Reid *et al.*, 2008, 2011; Pérez-Ortega *et al.*, 2016). El software Matlab (Mathworks, Inc) fue utilizado para analizar la actividad de cada célula a lo largo de las distintas condiciones experimentales (control, aplicación del fármaco y lavado), como se describe en Aparicio-Juárez *et al.*, 2019.

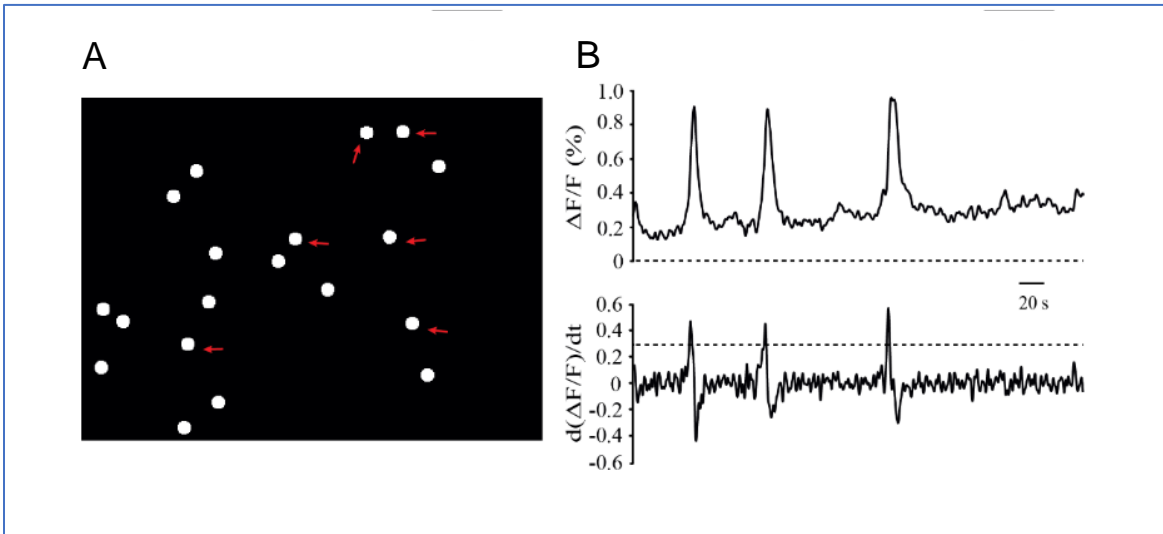


Figura 4. Análisis de los registros de imagenología de calcio. (A) Esquema que muestra el mapa de las coordenadas que resulta del análisis de los vídeos-registro de los experimentos de imagenología de calcio, donde cada círculo blanco representa una célula activa. (B) Transitorios de calcio (arriba) y la primera derivada (abajo), la cual permite filtrar el ruido de fondo (fluorescencia basal) de la fluorescencia emitida por el disparo neuronal.

Fármacos utilizados

Los fármacos: TTX, atropina, CNQX, gabazina, bicuculina, MLA, DH β E, BAPTA, BAPTA-AM, CdCl₂ y biocitina, fueron comprados de Sigma–Aldrich/RBI (St Louis, MO). Los fármacos: tapsigargina, rianodina, ácido ciclopiazónico (CPA), RJR y PNU-282987, fueron adquiridos de Tocris Bioscience (Ellisville, MO).

Todos los fármacos se prepararon el día del experimento y se aplicaron disueltos en la solución de Ringer, a través de un sistema de perfusión por gravedad (4/5 ml/min). En los registros de fijación de voltaje se esperó al menos 10 minutos para permitir la estabilización del sello, una vez que se tuvo acceso a la célula (comunicación entre el interior de la pipeta de registro y el interior de la célula registrada). Primeramente, se tomó un registro control de 15 minutos para permitir la estabilidad en la frecuencia de las sEPSCs en presencia de fármacos bloqueadores de receptores GABA_A (gabazina o bicuculina). Posteriormente, la nicotina o sus agonistas se aplicaron durante 8 – 10 minutos para asegurar una concentración constante de los fármacos en la cámara de registro. Para finalizar la aplicación de los fármacos, se inició su retiro (lavado del fármaco) del baño de perfusión con un recambio de 60 ml de solución de Ringer y se continuó con el registro por al menos 30 minutos, para su posterior análisis.

Para los experimentos con los antagonistas específicos de los receptores nicotínicos, con tetrodotoxina (TTX) o los bloqueadores de los canales de calcio, los fármacos fueron administrados por al menos 10 minutos y su efecto sobre las sEPSCs fue registrado. Enseguida, la nicotina fue añadida al baño durante 8 – 10 minutos y retirada al finalizar dicho período. Por último, un registro del lavado de la nicotina fue tomado durante 30 – 40 minutos.

Administración local de acetilcolina

La aplicación local de acetilcolina (ACh) dentro del RMTg o el VTA, para investigar la presencia de receptores nicotínicos postsinápticos, se hizo utilizando una micropipeta de vidrio (pipeta de aplicación) con una punta fina de 2 M Ω de resistencia, la cual contenía 1 mM de ACh disuelta en solución Ringer. Esta pipeta de aplicación estuvo acoplada a un microinyector de presión por gas (IM 300. Narishige Comp., Japan). Una vez identificada el área cerebral deseada dentro de la rebanada, se colocó la pipeta cerca de la neurona a registrar (aproximadamente 50 μ m de distancia) con la ayuda de un micromanipulador y se aplicaron “puffs” cortos de ACh de 2 – 5 psi y de 500 ms de duración, con intervalos de 3 – 5 minutos para evitar la desensibilización de los receptores nicotínicos (Wooltorton *et al.*, 2003), al mismo tiempo que se registraron las corrientes producidas por la aplicación local de ACh y manteniendo el potencial de membrana de la célula a -70 mV. Estos registros se realizaron en presencia de atropina (5 μ M) y tetrodotoxina (500 nM), para bloquear la posible participación de receptores muscarínicos y descartar efectos indirectos de la acetilcolina dependientes de potenciales de acción (Galindo-Charles *et al.*, 2008).

Inmunocitoquímica

Una combinación de marcadores intracelulares y los anticuerpos GAD_{65/67} y FoxP1 (un marcador específico para las neuronas del RMTg, de acuerdo con Smith *et al.*, 2018), fueron utilizados para identificar y confirmar la naturaleza gabaérgica de las neuronas registradas. La pipeta empleada para el registro electrofisiológico contenía biocitina (0.5 %) disuelta en la solución interna y, durante el registro, las neuronas fueron llenadas y marcadas con esta biomolécula. Al término del experimento, las rebanadas fueron fijadas durante toda la noche en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS, 0.1 M) con paraformaldehído al 4% y ácido pícrico al 1%, con un pH de 7.4.

Posteriormente, la rebanada se lavó con PBS y se mantuvo en sacarosa al 30% por media hora. Enseguida, el tejido se incluyó en un bloque de agar para obtener rebanadas de 40 μm de grosor con un vibratomo (Serie 1000). Estas rebanadas fueron incubadas de 4 – 6 horas en PBS conteniendo 0.2% de Tritón X-100 y streptavidina conjugada a Cy3 (1 mg/ml; diluida 1:200; Zymed) para marcar la neurona registrada. A continuación, la rebanada con la célula marcada se incubó en BSA (1%) por media hora e inmediatamente después, se incubó con alguno de los dos anticuerpos primarios: o anti-GAD_{65/67} producido en conejo (diluido 1:1000; ImmunoStar) o bien, anti-FoxP1 producido en conejo (diluido 1:1000; Sigma – Aldrich), en solución de bloqueo durante 18 – 24 horas. Transcurrido este tiempo, las rebanadas se lavaron tres veces con PBS y fueron reincubadas con el anticuerpo secundario conjugado a fluoresceína (dilución 1:2000; Vector Laboratories, Burlingame, CA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Enseguida, las rebanadas fueron examinadas con un microscopio de epifluorescencia para detectar la marca de fluorescencia y, las rebanadas que mostraron dicha marca fueron lavadas nuevamente con PBS (3 veces durante 10 minutos) y colocadas en un cubreobjetos y se aplicó medio de montaje (Vectashield, Vector Laboratories) para finalmente ser observadas en un microscopio confocal (MRC 1024, Bio-Rad, Natford, United Kingdom) equipado con un láser de kriptón/argón. Un láser con dos líneas de emisión, de 500 y 550 nm de longitud de onda, fue utilizado para excitar al Cy3 y la fluoresceína, respectivamente. Las imágenes digitalizadas fueron transferidas a una computadora con un software de captura de imagen (Confocal Assistant, T. C. Brelje, Minneapolis, MN). En experimentos control, la omisión del anticuerpo primario anuló la detección de la señal (datos no mostrados).

Análisis estadístico

El análisis de los datos se hizo utilizando los softwares: Clampfit 10.2 (Molecular devices), MiniAnalysis (Synaptosoft, Decatur, GA) y los paquetes de análisis estadístico y graficador Origin 8 (OriginLab, Northampton, MA) y Prism 6 (GraphPad, San Jose, CA). El software MiniAnalysis fue utilizado para detectar, marcar y analizar las sEPSCs. Inicialmente se realizó un análisis de ruido para cada célula registrada y posteriormente, se establecieron los umbrales de detección de eventos para exceder los valores del ruido. Para cada célula registrada, se construyeron histogramas de frecuencia de las sEPSCs con un tamaño de 10 bin/s y después, para cada grupo experimental, todas las células fueron promediadas y graficadas en un solo histograma de frecuencias. Para cada grupo experimental, un mínimo de cinco células fue registrado. Los cambios en la frecuencia o amplitud de las sEPSCs producidos por la administración de los fármacos, fueron expresados como valores normalizados con respecto a la línea base (control) para cada grupo experimental. Para realizar las comparaciones estadísticas de los cambios en la frecuencia de las sEPSCs, se tomó una ventana de tiempo de 5 minutos del efecto máximo del fármaco. Se utilizaron las pruebas estadísticas para muestras pequeñas y datos no pareados U de Mann-Whitney y Friedman, según el experimento (ver resultados) y la prueba *post-hoc* de rangos de signo de Wilcoxon fue usada si se encontraban diferencias significativas en las comparaciones para determinar cuáles grupos fueron diferentes. Para comparar las distribuciones de los datos, se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los datos fueron expresados como la media \pm error estándar. Un valor de $P < 0.05$ fue tomado como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Determinación de la naturaleza gabaérgica de neuronas del RMTg

Se registraron 121 neuronas dentro del RMTg (registros de célula única), las cuales mostraron características electrofisiológicas que sugirieron su naturaleza gabaérgica: alta frecuencia de disparo espontáneo (~17 Hz), potencial de acción corto y bifásico (duración < 1.5 ms) y una corta duración del pospotencial (posthiperpolarización) (Jhou *et al.*, 2009b; Jalabert *et al.*, 2011; Lecca *et al.*, 2011). Durante los experimentos en célula única, las neuronas del RMTg fueron marcadas con biocitina disuelta en la solución interna del electrodo de registro y, al finalizar cada experimento, las células registradas fueron identificadas mediante la técnica de inmunocitoquímica, con el empleo de los anticuerpos anti-GAD_{65/67} o anti-FoxP1, dos de los principales marcadores para neuronas del RMTg reportados (Jhou, Geisler, *et al.*, 2009; Lahti *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2018). Del total de células registradas, 80 células fueron identificadas por inmunocitoquímica: 33 fueron Fox-P1 positivas y 47 fueron GAD positivas.

Los datos reportados a continuación fueron obtenidos a partir de todas las células responsivas durante los registros, independientemente de si fue posible su identificación a través de la técnica de inmunocitoquímica. Una célula fue considerada responsiva cuando presentó un cambio en su actividad estadísticamente significativo, con respecto a la línea base (o control), dentro de los 10 minutos posteriores a la administración de fármacos.

La nicotina incrementa la frecuencia y amplitud de las sEPSCs de las neuronas gabaérgicas del RMTg

Los incrementos en la frecuencia y la amplitud de las sEPSCs, provocados por la nicotina, se observaron en 15 de las 19 neuronas de naturaleza gabaérgica confirmada, que fueron registradas. Primeramente, en la configuración de fijación de corriente, las neuronas del RMTg fueron identificadas con base a las características de su disparo (**Figura 5A**); posteriormente, las sEPSCs fueron registradas en

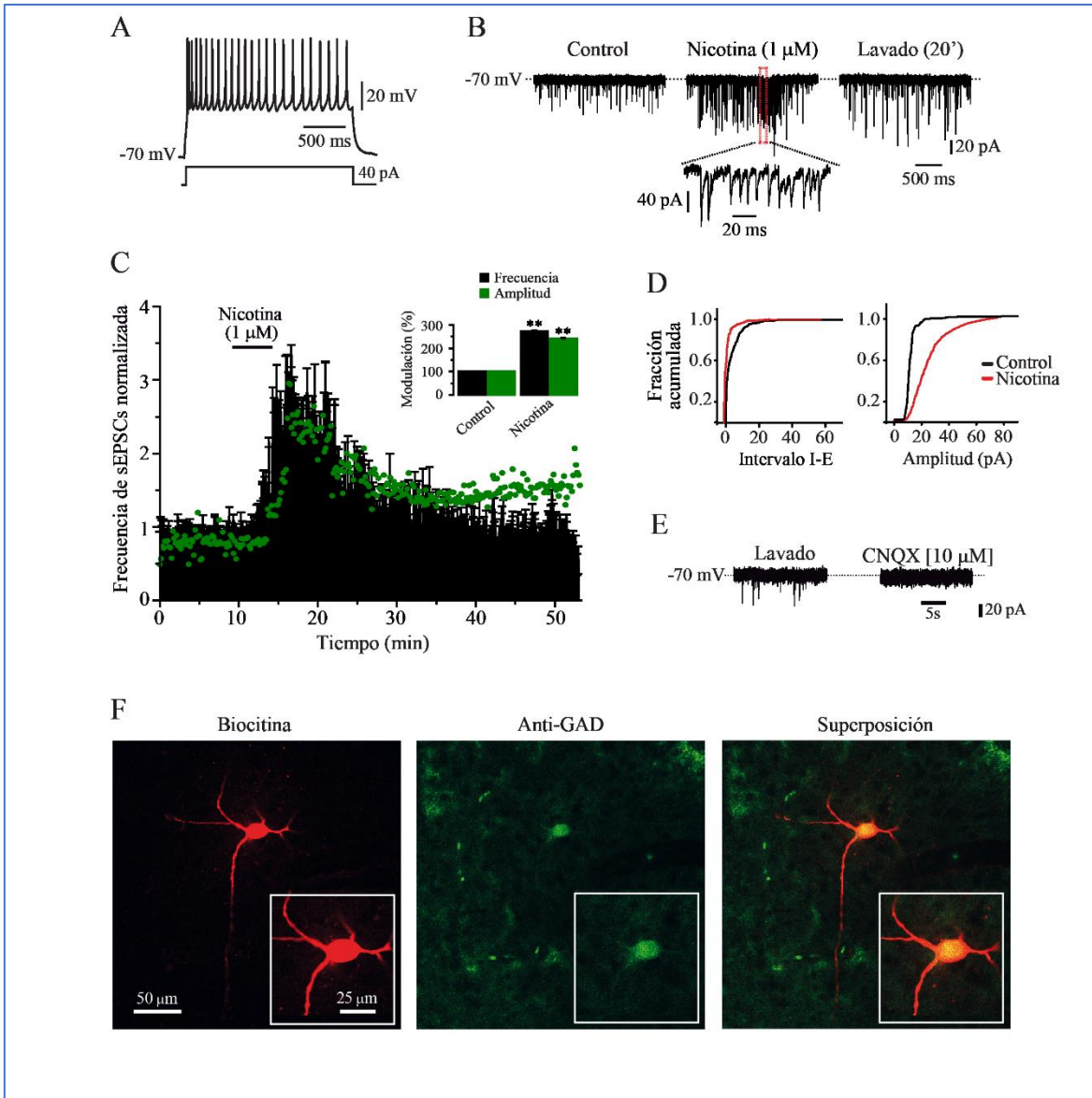


Figura 5. La nicotina incrementa la frecuencia y produce ráfagas de las sEPSCs en neuronas gabaérgicas del RMTg. (A) Respuesta de voltaje a un pulso de corriente de 40 pA de una neurona gabaérgica típica del RMTg. (B) Trazos de corriente mostrando las sEPSCs registradas en la modalidad de fijación de voltaje, en la misma célula mostrada en A. Condición control (izquierda), 10 minutos después de la aplicación de nicotina (centro) y 20 minutos después del lavado de la nicotina (derecha). Una región del trazo de en medio fue amplificada (recuadro rojo) y muestra claramente, a un barrido más lento, la “actividad en ráfaga” de las sEPSCs provocada por la nicotina. (C) Histograma de frecuencia-tiempo ($n = 15$) que muestra el curso temporal del efecto de la nicotina. El gráfico en verde muestra el curso temporal de las amplitudes de las sEPSCs. Para mayor claridad, los errores fueron removidos de este gráfico. El resumen de 15 células se muestra en el gráfico de barras (imagen insertada) (Prueba de U de Mann-Whitney). (D) Gráficas de fracción acumulada (de la misma célula en A y B) de el intervalo inter-evento (I-E, arriba) y de la amplitud (abajo), mostrando que la nicotina incrementó tanto la frecuencia como la amplitud de las sEPSCs. (E) En algunos experimentos, después de lavado, se aplicó CNQX, para demostrar la naturaleza glutamatérgica de las sEPSCs en el RMTg. (F) La misma célula en A y B marcada con biocitina (izquierda), con anticuerpo anti-GAD_{65/67} (centro) y la superposición (derecha). Todos los experimentos fueron realizados en presencia de bicuculina (10 μ M). ** $p < 0.01$.

la configuración de fijación de voltaje, a un potencial de mantenimiento de -70 mV (**Figura 5B**). Todos los experimentos fueron hechos en presencia de bicuculina (10 μ M) para bloquear el componente gabaérgico de las corrientes postsinápticas.

La aplicación de nicotina (1 μ M) en el baño de perfusión, incrementó la frecuencia de las sEPSCs en un $172\% \pm 3.9\%$ con respecto al control (prueba de U de Mann-Whitney, $p = 0.0014$, $n = 15$) y dicho efecto persistió alrededor de 25 – 30 minutos después del lavado de la nicotina (**Figura 5B – D**). Además de la frecuencia, la nicotina produjo un aumento en la amplitud de las sEPSCs. Este cambio fue de un $140\% \pm 3.8\%$ comparado al control. El curso temporal del cambio promedio en la amplitud se observa en la **Figura 5C** (puntos verdes). El gráfico mostrado en la imagen insertada muestra el resumen de los 15 experimentos donde se observó el incremento en la frecuencia y la amplitud provocados por la nicotina. El incremento de la amplitud sugiere un posible efecto postsináptico (Zucker y Regehr, 2002; Garduño *et al.*, 2012).

Previamente se ha reportado que la nicotina puede producir *ráfagas* de sEPSCs. Esta actividad “en ráfagas” es importante porque sugiere una liberación sincronizada de glutamato desde las terminales sinápticas (Sharma y Vijayaraghavan, 2003; Sharma *et al.*, 2008). En este trabajo, una *ráfaga* se definió como un periodo corto de tiempo (50–150 ms) donde la frecuencia de las corrientes postsinápticas rebasó el 50% de la frecuencia observada en el control. Se encontró que la nicotina provocó *ráfagas* de sEPSCs en el 93% de las células registradas (**Figura 5B**, inserto).

En seis experimentos, tras el lavado de la nicotina, se aplicó CNQX (10 μ M), un antagonista de los receptores AMPA/kainato para el glutamato. En todas las neuronas registradas, el CNQX eliminó completamente las sEPSCs, demostrando la naturaleza glutamatérgica de las corrientes registradas (**Figura 5E**).

Los registros mostrados en la **Figura 5A y B** pertenecen a la misma neurona GAD_{65/67} positiva ilustrada en la **Figura 5F**.

La acetilcolina endógena mimetiza el efecto de la nicotina

Para determinar si el efecto de la nicotina en las neuronas del RMTg dependía del desarrollo de potenciales de acción de las terminales que llegan al núcleo, se registraron seis células en presencia de un bloqueador de canales de sodio, la tetrodotoxina (TTX). Después de la adición de TTX (500 nM) en el baño de perfusión, la nicotina (1 μ M) aumentó la frecuencia y la amplitud de las corrientes miniatura (mEPSCs) (**Figura 6A y B**). La frecuencia de las mEPSCs incrementó un $89.7\% \pm 5.6\%$ en comparación con el control (prueba de U de Mann-Whitney, $p = 0.0021$, $n = 6$), mientras que la amplitud también aumentó en un $56.5\% \pm 1.2\%$ (**Figura 6F**), indicando que los efectos de la nicotina son independientes de potenciales de acción (y no así la totalidad de la excitabilidad de las neuronas del RMTg).

Una vez que se comprobó el efecto de la nicotina en las sEPSCs, aún en presencia de TTX, el siguiente paso fue comprobar si el efecto de la nicotina era mimetizado por la acetilcolina endógena (ACh). Para explorar esto, se aplicó eserina (10 μ M), un inhibidor de la acetilcolinesterasa (enzima que degrada a la ACh), en presencia de atropina (10 μ M) para bloquear el componente muscarínico. La eserina incrementó la frecuencia y amplitud de las sEPSCs en ocho células registradas en el RMTg (**Figura 6C – F**) los efectos también fueron persistentes como se observó con la aplicación de la nicotina.

El incremento en la frecuencia de las sEPSCs fue de un $107.4\% \pm 17.8\%$, con respecto al control (prueba de U de Mann-Whitney, $P = 0.0016$, $n = 8$). El incremento en la amplitud fue de $37\% \pm 1.5\%$ (**Figura 6D, puntos verdes, y F**). Estos resultados sugieren que la acetilcolina endógena está regulando la liberación tónica de glutamato en el núcleo RMTg.

En la **Figura 6E** se muestran las gráficas de fracción acumulada correspondientes al cambio en el intervalo interevento (IE) y la amplitud de la misma célula mostrada en el panel C (prueba de Kolmogorov-Smirnov para dos muestras, $p = 0.001$). El registro mostrado en la **Figura 6C** pertenece a una célula que fue positiva a FoxP1, otro marcador de las neuronas del RMTg (Lahti *et al.*, 2016) (**Figura 6G**).

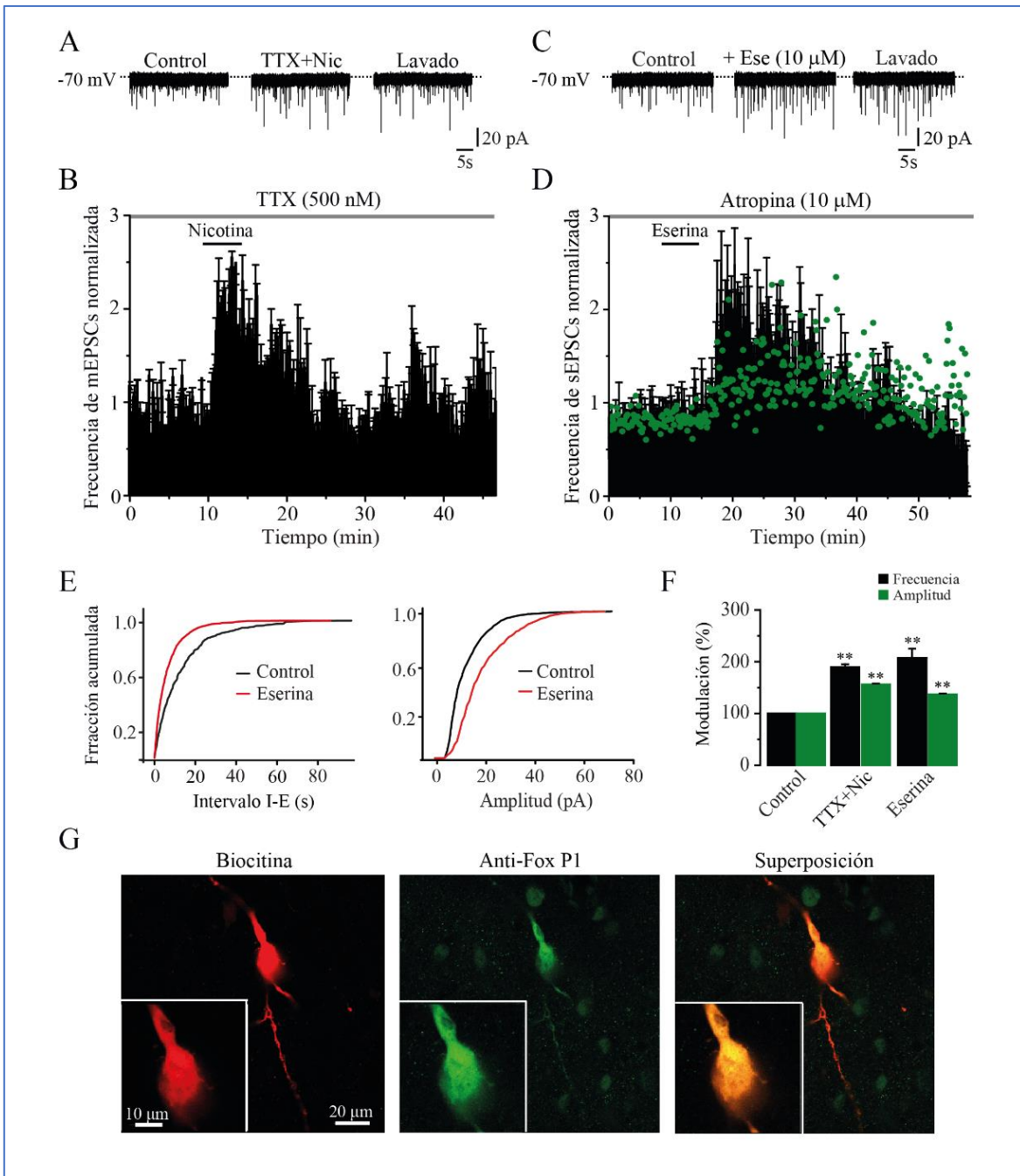


Figura 6. Los efectos de la nicotina no dependen de potenciales de acción. (A) Trazos de corriente mostrando las sEPSCs en condiciones control (izquierda), 10 minutos después de la aplicación de nicotina en presencia de TTX (500 nM, centro) y 20 minutos después del lavado de la nicotina (derecha). (B) Histograma de frecuencia-tiempo que muestra el curso temporal del efecto de la nicotina en presencia de TTX ($n = 6$). (C) Trazos de corriente mostrando las sEPSCs en condiciones control (izquierda), 10 minutos después de la aplicación de eserina (10 μ M, centro), un inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa; y 20 minutos después del lavado de la eserina ($n = 8$). El gráfico en verde muestra el curso temporal de las amplitudes. Para mayor claridad, los errores se han removido de este gráfico. (E) Gráficos de fracción acumulada (de la célula en C) del intervalo inter-evento (I-E, izquierda) y de la amplitud (derecha), mostrando que la eserina incrementó la frecuencia y amplitud de las sEPSCs. (F) Resumen de los resultados (Prueba de U de Mann-Whitney). (G) La misma célula en A, marcada con biocitina (izquierda), el anticuerpo anti-FoxP1 (centro) y la superposición (derecha). Los experimentos con eserina fueron realizados en presencia de atropina (10 μ M). ** $p < 0.01$.

El efecto de la nicotina en el RMTg es mediado a través de receptores nicotínicos $\alpha 7$

En la amplia literatura existente acerca de los receptores nicotínicos neuronales (nAChRs), está bien documentado que el subtipo heteromérico $\alpha 4\beta 2$ y el homomérico $\alpha 7$, son los dos subtipos de nAChRs más comúnmente expresados en el sistema nervioso central (Whiting y Lindstrom, 1986).

Para identificar cuál de estos subtipos de receptores nicotínicos está mediando los efectos de la nicotina en el RMTg, se probaron dos antagonistas selectivos para los nAChRs: metilcaconitina (MLA) y dihidro-beta-eritroidina (DH β E). Al bloquear los receptores nicotínicos $\alpha 7$ con MLA (100 nM), se suprimió completamente el efecto de la nicotina (seis células), tanto sobre la frecuencia como la amplitud de las sEPSCs (**Figura 7A, B y E**). Es importante mencionar que, a esta concentración, la MLA no produjo ningún efecto significativo por sí misma pero sí bloqueó los efectos nicotínicos ($91\% \pm 6.9\%$ con respecto a la línea base, prueba de U de Mann-Whitney, $p = 0.1752$, $n = 6$) (**Figura 7E**).

En contraste, en presencia de DH β E (100 nM), un antagonista de los nAChRs $\alpha 4\beta 2$, la nicotina incrementó tanto la frecuencia como la amplitud de las sEPSCs en seis células registradas. El incremento de la frecuencia de las sEPSCs fue de $172 \pm 11.2\%$ con respecto al control (prueba de U de Mann-Whitney, $p = 0.001$, $n = 6$) y el efecto fue persistente por más de 30 minutos, después del lavado de la nicotina (**Figura 7C – E**). La amplitud incrementó en un $86\% \pm 4.8\%$ (**Figura 7E**).

Para confirmar la identidad del subtipo de nAChR involucrado en la liberación de glutamato inducida por la nicotina, en el RMTg, se utilizaron agonistas selectivos para los subtipos $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ de receptores nicotínicos. El agonista selectivo de nAChRs $\alpha 7$, PNU-282987 (100 nM), mimetizó el efecto de la nicotina, ya que produjo un incremento en la frecuencia de sEPSCs en seis células registradas (**Figura 8A, B y E**). Este incremento fue de $130\% \pm 23.9\%$, con respecto al control y fue estadísticamente significativo (prueba de U de Mann-Whitney, $p = 0.0013$, $n = 6$). La amplitud de las corrientes aumentó en $110.4\% \pm 5.6\%$ (**Figura 8E**).

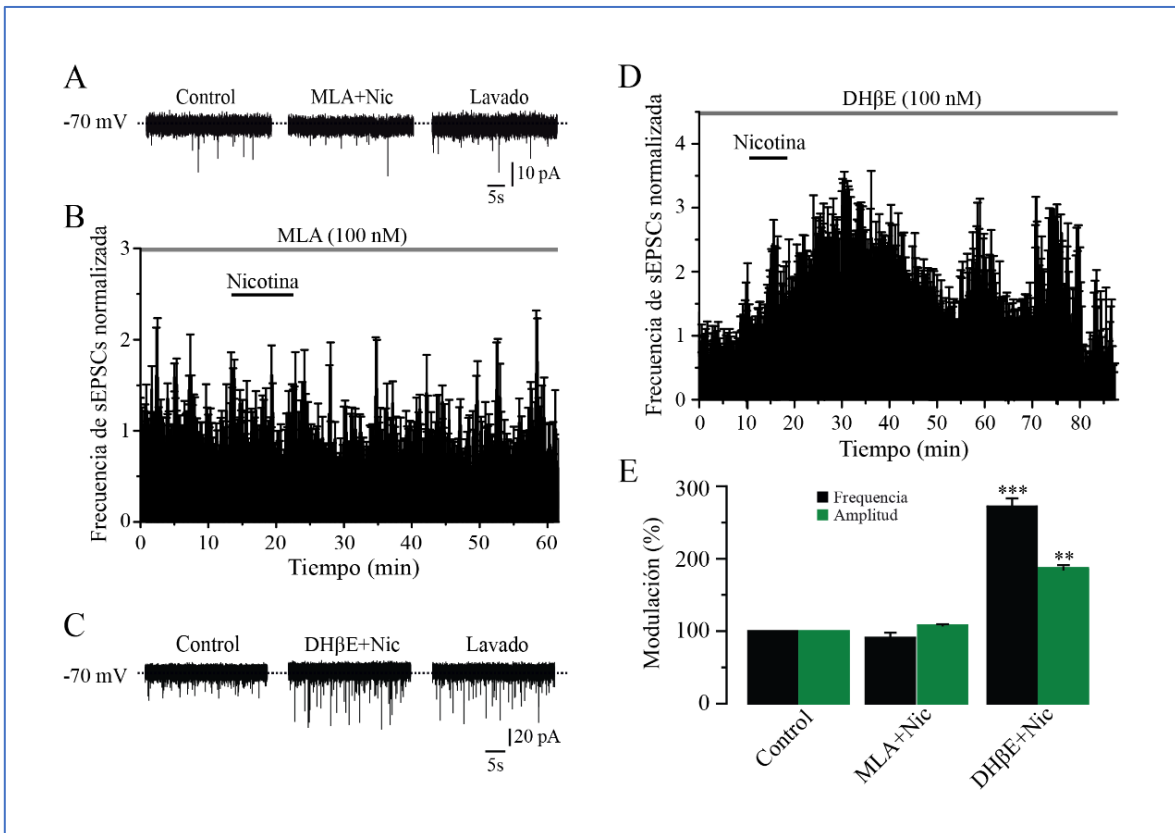


Figura 7. Los efectos de la nicotina en el RMTg son mediados a través de los receptores nicotínicos $\alpha 7$ y no $\alpha 4\beta 2$. (A) Trazos de corriente mostrando que la MLA (100 nM), un antagonista selectivo de los nAChRs $\alpha 7$, bloqueó completamente los efectos de la nicotina en las sEPSCs; el control (izquierda), 10 minutos después de la aplicación de nicotina, en presencia de la MLA (centro) y el lavado de la nicotina (derecha). (B) Histograma de frecuencia-tiempo normalizado que muestra la ausencia de efecto de la nicotina en presencia de la MLA ($n = 6$). (C) Trazos de control que muestran que la DH β E (100 nM), un antagonista selectivo de los nAChRs $\alpha 4\beta 2$, no bloqueó el efecto de la nicotina en las sEPSCs. (D) Histograma de frecuencia-tiempo normalizado mostrando que la nicotina incrementó la frecuencia de las sEPSCs en presencia de DH β E ($n = 6$). (E) Gráfico de barras que muestra el resumen de los datos obtenidos con los fármacos selectivos de los nAChRs (Prueba de U de Mann-Whitney). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

En contraste, la aplicación del agonista selectivo para los nAChRs subtipo $\alpha 4\beta 2$, RJR-2403 (100 nM), no produjo ningún cambio, ni en la frecuencia ni en la amplitud de las sEPSCs, en ninguna de las seis células gabaérgicas registradas (**Figura 8C – E**).

Estos datos en conjunto sugieren que la nicotina regula la liberación de glutamato a través de la activación de receptores nicotínicos $\alpha 7$, y no $\alpha 4\beta 2$, en las terminales glutamatérgicas que se encuentran en el RMTg.

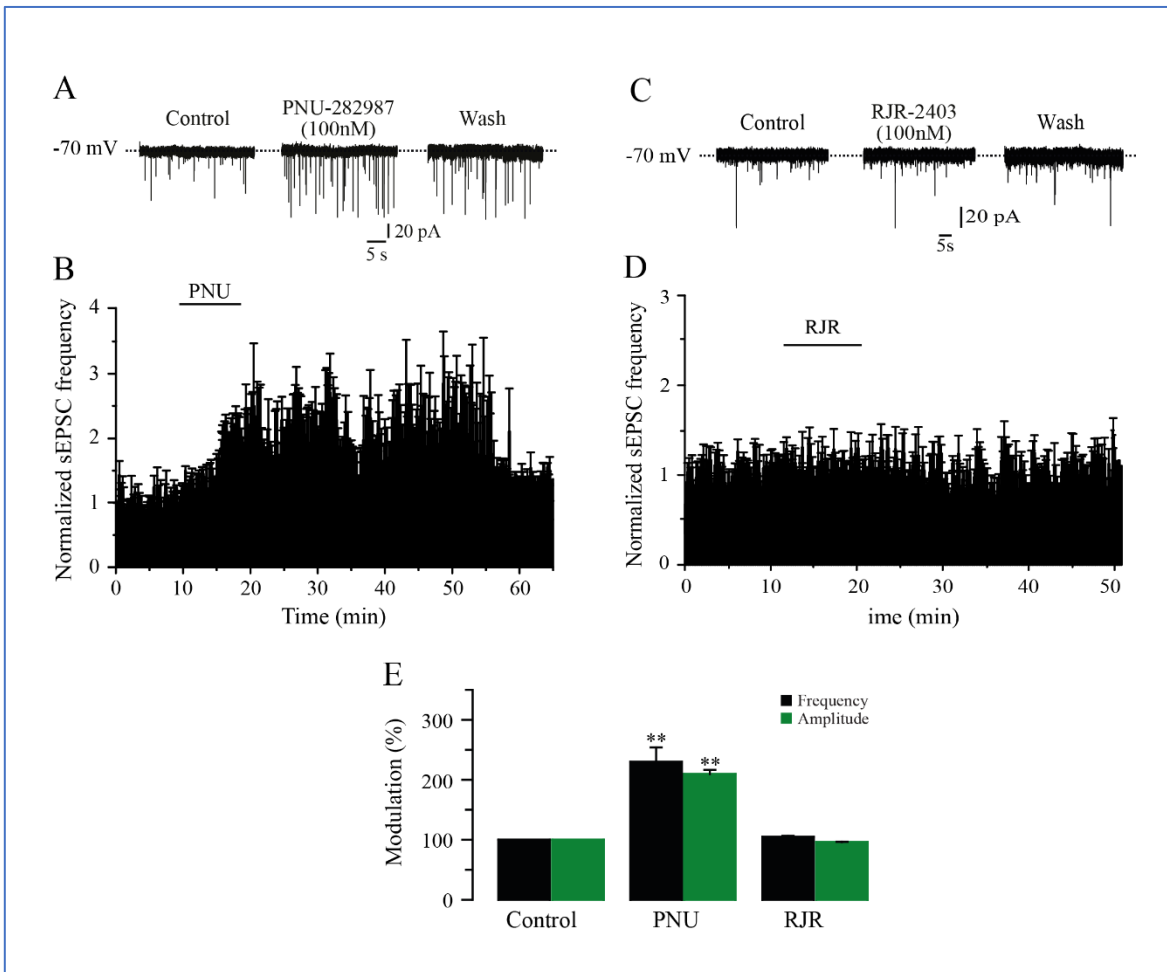


Figura 8. La activación de los nAChRs $\alpha 7$ con un agonista selectivo mimetiza los efectos de la nicotina. (A) Trazos de corriente que muestran las sEPSCs en condiciones control (izquierda), 10 minutos después de la aplicación de PNU-282987 (100 nM), un agonista selectivo de los nAChRs $\alpha 7$ (centro) y 20 minutos después del lavado del PNU (derecha). (B) Histograma de frecuencia-tiempo mostrando el curso temporal del efecto del PNU ($n = 6$). (C) Trazos de corriente mostrando las sEPSCs en condiciones de control (izquierda), 10 minutos después de la aplicación del RJR-2403 (100 nM), un agonista selectivo de los nAChRs $\alpha 4\beta 2$ (centro) y 20 minutos después del lavado del RJR (derecha). (D) Histograma de frecuencia-tiempo que ilustra la ausencia de efecto del RJR ($n = 6$). (E) Resumen de los datos (Prueba de U de Mann-Whitney). ** $p < 0.01$.

El incremento de la frecuencia de sEPSCs en neuronas del RMTg debido a la nicotina, es de origen presináptico

Tanto la nicotina como el agonista selectivo de receptores nicotínicos $\alpha 7$ incrementaron no solamente la frecuencia, sino también la amplitud de las sEPSCs. Por ello, era posible que los efectos observados por la aplicación de estas drogas fueran a través de la activación de receptores nicotínicos postsinápticos. Para examinar esta posibilidad, en cinco experimentos, las pipetas de registro se llenaron

con solución interna que contenía BAPTA (10 mM), un quelante rápido de calcio. El BAPTA secuestra el calcio intracelular e impide que este participe en diversas señales intracelulares (Wagner y Keizer, 1994; Gilabert, 2012).

Se observó que el BAPTA intracelular no tuvo ningún efecto sobre la actividad sináptica espontánea y no previno los efectos de la nicotina observados en las sEPSCs. Bajo estas condiciones, la nicotina incrementó la frecuencia de las sEPSCs en un $133\% \pm 4.2\%$, en comparación con el control (**Figura 9A, C**) (Prueba de U de Mann-Whitney, $p = 0.0018$, $n = 5$). Como era de esperarse, la amplitud de las sEPSCs también incrementó ($40\% \pm 2\%$) (**Figura 9C**).

Por otro lado, cuando las rebanadas cerebrales fueron perfundidas con BAPTA-AM (10 mM), un quelante de calcio que permea a través de las membranas celulares y, por lo tanto, puede entrar en las terminales sinápticas, la nicotina no tuvo ningún efecto, ni sobre la frecuencia ni sobre la amplitud de las corrientes postsinápticas excitatorias, en seis células registradas (**Figura 9B y C**).

Siguiendo la misma idea y para descartar la presencia de nAChRs postsinápticos, se aplicó acetilcolina de manera local, sobre 20 neuronas del RMTg registradas en fijación de voltaje, a un potencial de mantenimiento de -70 mV. Se aplicaron “puffs” de ACh (1 mM) de corta duración (500 ms), utilizando una micropipeta de vidrio que se colocó muy cerca y por encima de la célula registrada (ver capítulo de “Metodología”). Estos experimentos fueron realizados en presencia de atropina (5 μ M) y TTX (1 μ M), para bloquear receptores muscarínicos y descartar efectos indirectos, respectivamente. La ACh no produjo corrientes entrantes mediadas por nAChRs en ninguna de las 20 neuronas registradas en el RMTg (**Figura 9D, a la izquierda**). En contraste, en tres de las cuatro neuronas del VTA, células donde se ha reportado previamente la presencia de nAChRs (Wooltorton *et al.*, 2003), los “puffs” de acetilcolina produjeron respuestas conformadas por una corriente entrante rápida y otra lenta (**Figura 9D, a la derecha**).

El componente rápido mostró una amplitud grande con un tiempo de decaimiento corto, y fue mediado por nAChRs $\alpha 7$. El otro componente, con menor amplitud y una cinética más lenta, correspondió a una corriente entrante mediada a través de los nAChRs $\alpha 4\beta 2$ (Pidoplichko *et al.*, 1997; Klink *et al.*, 2001; Wooltorton *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004).

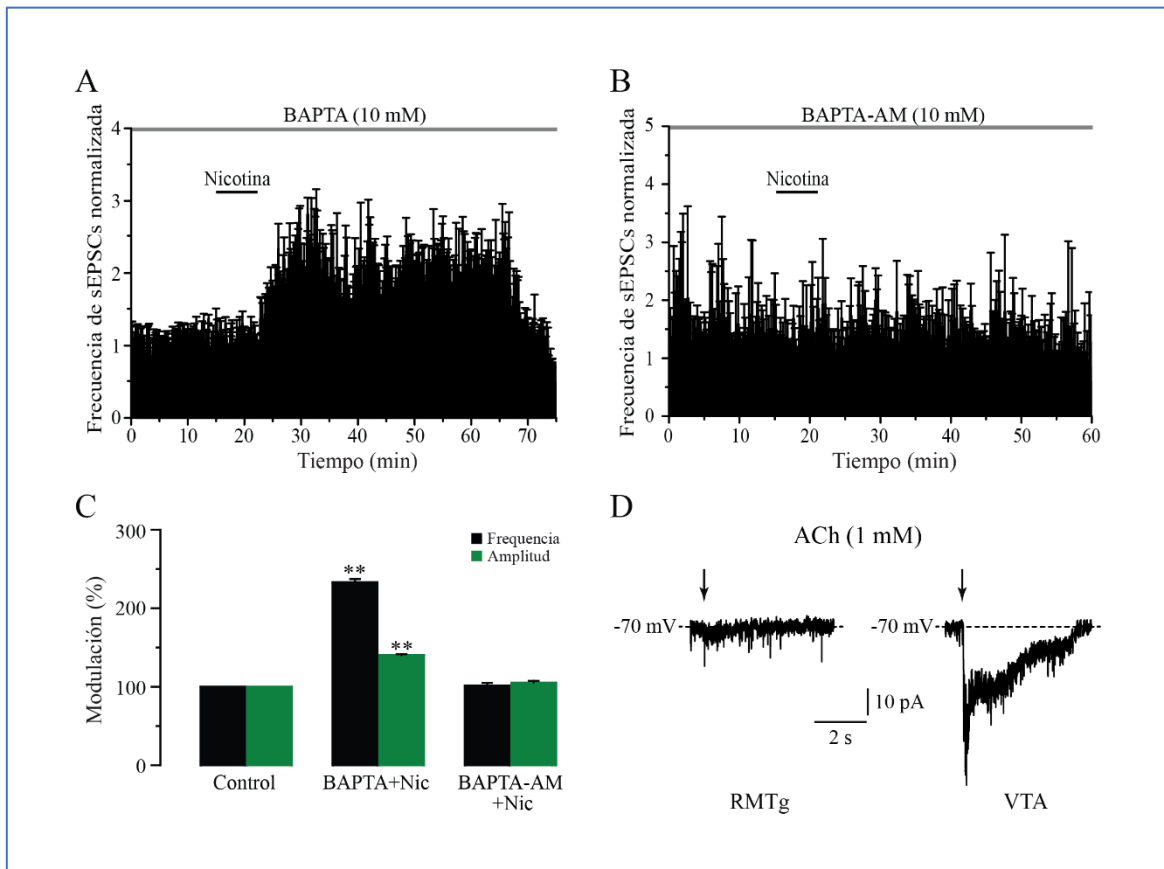


Figura 9. El mecanismo de acción de la nicotina es de origen presináptico. (A) Histograma de frecuencia-tiempo del curso temporal del efecto de la nicotina en presencia de BAPTA en la pipeta de registro ($n = 5$). (B) Histograma de frecuencia-tiempo mostrando el curso temporal del efecto de la nicotina en presencia del BAPTA-AM (10 mM), el cual fue añadido a la solución de perfusión y permea la membrana celular ($n = 6$). (C) Gráfico de barras que ilustra el resumen de los datos obtenidos con BAPTA y BAPTA-AM (Prueba de U de Mann-Whitney). (D) Registros de corrientes en fijación de voltaje, después de la aplicación local de “puffs” de acetilcolina (ACh) (1 mM) sobre una neurona del RMTg (izquierda) y en una neurona del VTA (derecha). Estos experimentos fueron hechos en presencia de atropina (5 μ M) y TTX (500 nM). ** $p < 0.01$.

Estos resultados, tomados conjuntamente, apoyan la idea de que los efectos de la nicotina son presinápticos y son mediados a través de los nAChRs $\alpha 7$, localizados en las terminales glutamatérgicas que inervan a las neuronas del RMTg.

La potenciación sináptica inducida por la nicotina depende de las reservas de calcio intracelular

Anteriormente, ha sido demostrado que la liberación de glutamato inducida por la nicotina involucra un mecanismo de “liberación de calcio inducida por calcio” (CICR, por sus siglas en inglés) que puede operar tanto a través de los nAChRs $\alpha 7$ (Sharma y Vijayaraghavan, 2003; Sharma *et al.*, 2008), como de los nAChRs que contienen la subunidad $\beta 2$ (Dajas-Bailador *et al.*, 2002; Dickinson *et al.*, 2008; Garduño *et al.*, 2012). Para explorar este mecanismo en el efecto de la nicotina en el RMTg, se utilizaron dos bloqueadores de la bomba (ATPasa) de calcio del retículo sarcoplásmico/endoplásmico (SERCA, por su abreviatura en inglés): la tapsigargina (en seis células) y el ácido ciclopiazónico (CPA) (en otras seis células registradas).

En presencia de la tapsigargina (10 μM) o CPA (10 μM), la nicotina no cambió ni la frecuencia ni la amplitud de las sEPSCs (**Figura 10A, B y D**) (Prueba de U de Mann-Whitney, $p = 0.1530$, $n = 6$).

También se investigó la participación de los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCCs, por sus siglas en inglés), a través de probar el efecto de la nicotina en presencia de cadmio (CdCl_2 , 100 μM) en siete células. En presencia de cadmio, la nicotina aún incrementó la frecuencia de las sEPSCs en todas las células registradas en un $251\% \pm 24\%$ (**Figura 10C y D**) (Prueba de U de Mann-Whitney, $p = 0.0001$, $n = 7$), un valor que es mayor si se compara con el de la nicotina sola. Esto podría explicarse por una potenciación de los receptores nicotínicos producida por el cadmio (Hsiao *et al.*, 2001; Garduño *et al.*, 2012). Como se observó anteriormente, la nicotina también incrementó la amplitud de las sEPSCs en un $173.2\% \pm 4\%$ con respecto a la línea base.

Los datos descritos arriba indican que la potenciación en la liberación de glutamato, inducida por la nicotina, requiere de calcio proveniente de las reservas intracelulares en las aferentes glutamatérgicas y no depende de la entrada de calcio a través de los VGCCs.

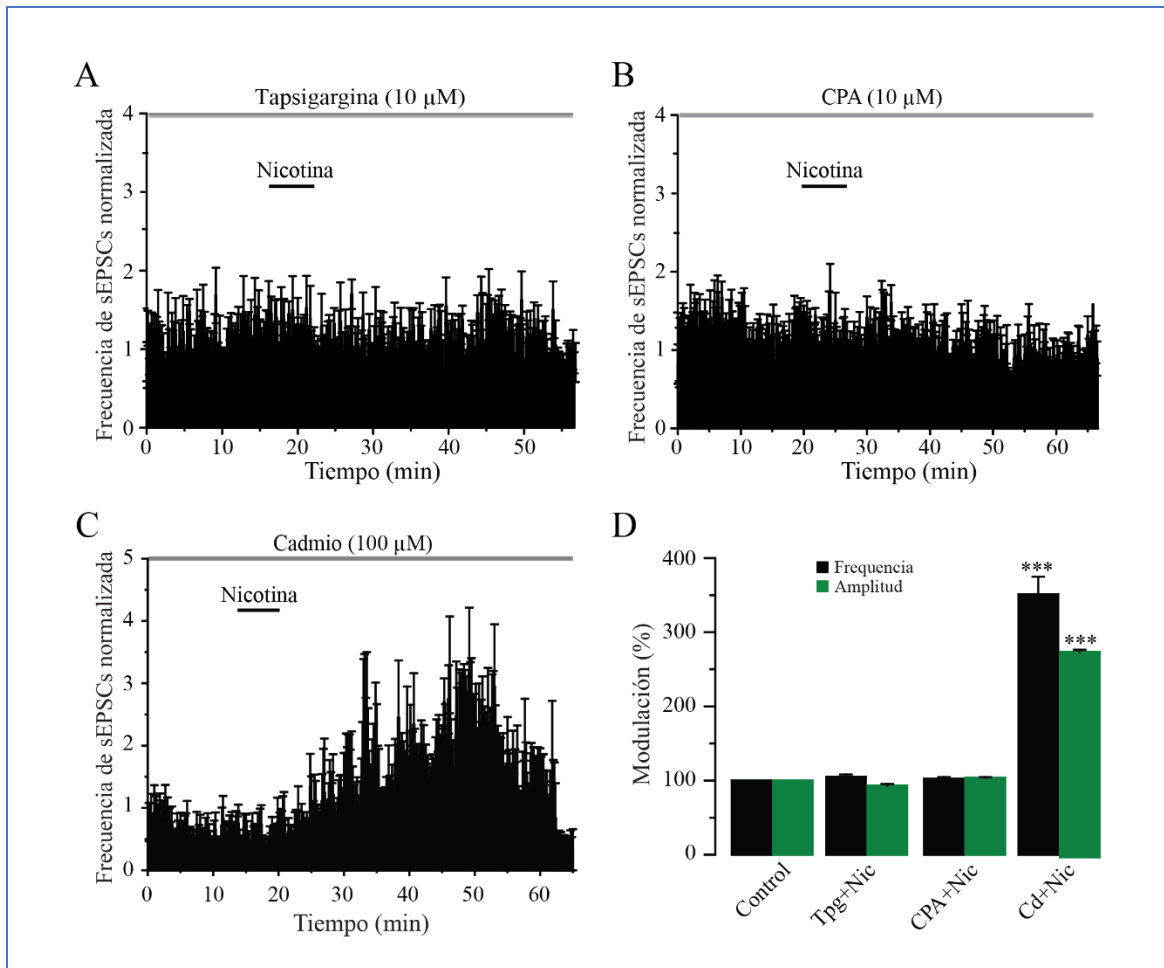


Figura 10. El bloqueo de las pozas intracelulares de calcio anuló los efectos de la nicotina. (A) Histograma de frecuencia-tiempo mostrando la ausencia de efecto de la nicotina sobre la frecuencia de las sEPSCs en presencia del bloqueador de la SERCA, thapsigargina (10 μM) ($n = 6$). (B) Histograma de frecuencia-tiempo mostrando la falta de efecto de la nicotina sobre la frecuencia de las sEPSCs en presencia del ácido ciclopiazónico (CPA, 10 μM) ($n = 6$). (C) Histograma de frecuencia-tiempo donde se aprecia que la nicotina tuvo efectos robustos sobre las sEPSCs en presencia de cadmio (100 μM), un bloqueador de los VGCCs ($n = 6$). (D) Gráfico de barras ilustrando el resumen de los datos mencionados arriba (Prueba de U de Mann-Whitney). *** $p < 0.001$.

La nicotina sincroniza la liberación de glutamato en el RMTg

Previamente ha sido demostrado, que la nicotina puede sincronizar la liberación de glutamato en ciertas estructuras del SNC (Sharma y Vijayaraghavan, 2003; Sharma *et al.*, 2008). Para probar esta misma idea en el RMTg, se reemplazó el 90% del calcio extracelular en la solución de Ringer por otros cationes divalentes: estroncio (en seis células registradas) y bario (en otras seis células registradas). Al sustituir el calcio por estos cationes divalentes se provoca una

desincronización en la liberación sináptica (Léna y Changeux, 1997; Xu-Friedman y Regehr, 2000; Good y Lupica, 2009).

Inmediatamente después de que se estableciera el efecto de la nicotina en la célula registrada, la solución externa con una concentración normal de calcio fue sustituida por otra solución que contenía estroncio (ver capítulo de “Metodología”). Como se esperaba, con la solución externa normal, la nicotina incrementó la frecuencia y amplitud de las sEPSCs. Sin embargo, cuando se intercambió con la solución de estroncio, se observó una disminución en la amplitud de las sEPSCs (**Figura 11A**). La gráfica de barras (**Figura 11B**) muestra la frecuencia de sEPSCs normalizada con respecto al control. Claramente la nicotina y los cationes divalentes incrementaron la frecuencia de las corrientes postsinápticas con respecto al control. Los incrementos en la frecuencia fueron: $176\% \pm 14\%$, $139\% \pm 6\%$ ($n = 6$) y $152\% \pm 10\%$ ($n = 6$), para la nicotina, el estroncio y el bario, respectivamente (prueba de U de Mann-Whitney, $p = 0.0017$). Además, se observó que el estroncio y el bario causaron pequeñas, pero estadísticamente significativas, reducciones de la frecuencia de sEPSCs, al ser comparadas con el valor de frecuencia de las sEPSCs correspondiente a la nicotina (prueba de U de Mann-Whitney, $p = 0.035$, $n = 6$).

La **Figura 11C** ilustra un histograma de amplitudes donde el control (color gris oscuro) y la nicotina (color rojo) representan la distribución de las amplitudes con la solución externa de calcio normal. Se aprecia que la nicotina desplazó hacia la derecha la distribución de las amplitudes. Cuando el calcio fue reemplazado con estroncio (color gris claro), este efecto fue revertido y la distribución de las amplitudes fue desplazada hacia la izquierda, es decir, hacia el control. Los incrementos en la amplitud de las sEPSCs, con respecto a la línea base, fueron: $139.7\% \pm 2.4\%$, $107.7\% \pm 1.7\%$ ($n = 6$) y $89.9\% \pm 1.7\%$ ($n = 6$), para la nicotina, el estroncio y el bario, respectivamente. La curva de las distribuciones acumuladas de la nicotina fue estadísticamente distinta a las curvas del estroncio y el bario (prueba de Kolmogórov-Smirnov para dos muestras, $p = 0.047$, $n = 6$).

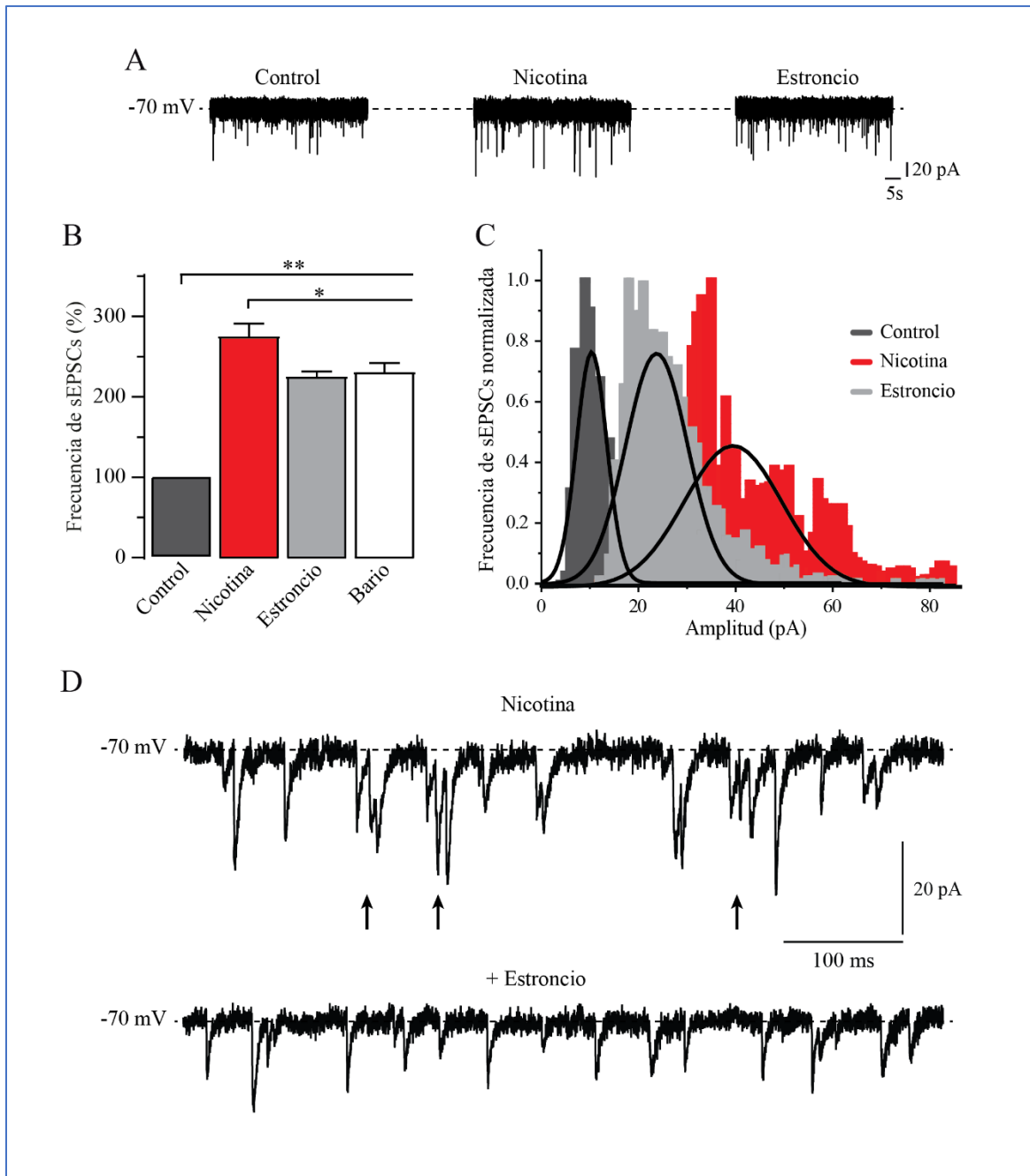


Figura 11. La nicotina sincroniza la liberación de glutamato en el RMTg. (A) Trazos de corriente mostrando las sEPSCs en condiciones control (izquierda), 10 minutos después de la aplicación de nicotina (centro) y 10 minutos después de reemplazar el 90% del calcio extracelular por estroncio (derecha). (B) Gráfico de barras de la frecuencia de las sEPSCs que compara diferentes condiciones: el control (en color gris oscuro), con nicotina (en color rojo), con estroncio (en color gris claro) y con bario (en color blanco) (Prueba de U de Mann-Whitney). (C) Histograma de las amplitudes de las sEPSCs en distintas condiciones: el control (color gris oscuro), a la aplicación nicotina (color rojo) y después del reemplazo con estroncio (color gris claro). (D) Trazos de corriente mostrando una típica *ráfaga* de sEPSCs producida por la nicotina (arriba, flechas negras). Nótese que, al agregar estroncio, se suprime la actividad “en ráfaga” y también disminuye la amplitud de las sEPSCs (abajo). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

La **Figura 11D** muestra trazos de corriente de un registro de una sola neurona, a los 10 minutos después de la aplicación de la nicotina (panel superior), y después del cambio de solución con el estroncio (panel inferior). Como se mostró previamente, la nicotina no solamente incrementó la frecuencia y amplitud de las sEPSCs, sino que además provocó *ráfagas* de estas corrientes. En la **Figura 11D** (panel superior) se observa la actividad “en ráfagas” (flechas) con una frecuencia promedio de 47 Hz, mucho mayor a la frecuencia control antes de la aplicación de nicotina, la cual fue de 3.5 Hz (no mostrada). Interesantemente, se observó que después de la adición de estroncio (con el intercambio de la solución externa), la actividad “en ráfaga” fue suprimida (**Figura 11D, panel inferior**), en tanto la frecuencia se mantuvo incrementada.

La nicotina induce un incremento de la actividad poblacional, bloqueado por un antagonista nicotínico tipo $\alpha 7$

Se realizaron experimentos de imagenología de calcio para explorar los efectos de la nicotina en la actividad simultánea de múltiples neuronas en el RMTg. Un dibujo esquemático de una rebanada coronal de cerebro, utilizada para estos registros poblacionales, se muestra en la **Figura 12A** (a la izquierda). La zona dentro del recuadro con línea punteada se amplificó (a la derecha) y los rectángulos grises muestran el área dentro del núcleo RMTg donde fueron realizados los registros de imagenología. En la **Figura 12B** se muestran imágenes de los registros de imagenología de calcio en condiciones control (izquierda) y en presencia de nicotina (derecha), de un solo experimento. Cada imagen fue obtenida tomando un solo fotograma del vídeo correspondiente.

Los transitorios de calcio, que son señales generadas por la actividad intracelular de calcio, fueron obtenidos de todas las células activas registradas durante el experimento en las diferentes condiciones y sus primeras derivadas fueron usadas para construir una matriz binaria, las cuales fueron utilizadas para construir gráficas tipo raster (ver capítulo de “Metodología”).

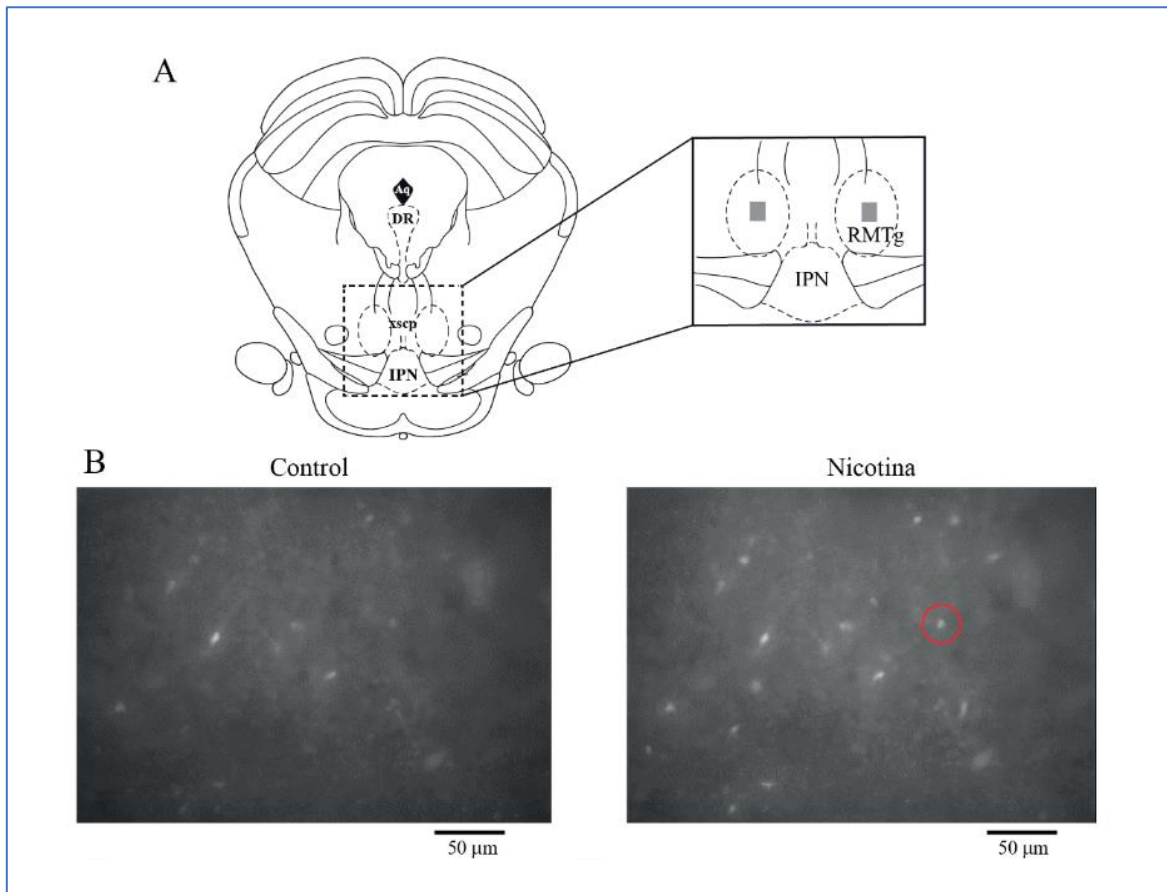


Figura 12. Registros de imagenología de calcio. (A) Representación esquemática de una rebanada coronal de cerebro conteniendo el área del RMTg. La zona dentro del recuadro con líneas punteadas fue ampliada (derecha). Los rectángulos de color gris señalan la región dentro del RMTg donde fueron realizados los registros de imagenología de calcio. (B) Imágenes de los registros de imagenología de calcio en condiciones control (izquierda) y después de aplicar nicotina (1 μ M, derecha). Cada imagen fue obtenida de un solo fotograma del vídeo correspondiente. RMTg, núcleo tegmental rostromedial; IPN, núcleo interpeduncular; xscp, decusación del pedúnculo cerebeloso superior; DR, núcleo rafe dorsal.

La **Figura 13A** muestra una gráfica tipo raster (*rasterplot*) que ilustra la actividad de 36 células de un solo experimento. Cada fila ilustra la actividad de una célula a lo largo del tiempo. Cada punto representa la actividad de la neurona dentro de un fotograma (ventana de tiempo de cada fotograma = 250 ms). El *rasterplot* enseña tres diferentes condiciones: el control, la aplicación de la nicotina (1 μ M, banda gris) y el lavado de la nicotina. Después de la aplicación de la nicotina, hubo un incremento de la actividad neuronal que persistió durante el lavado.

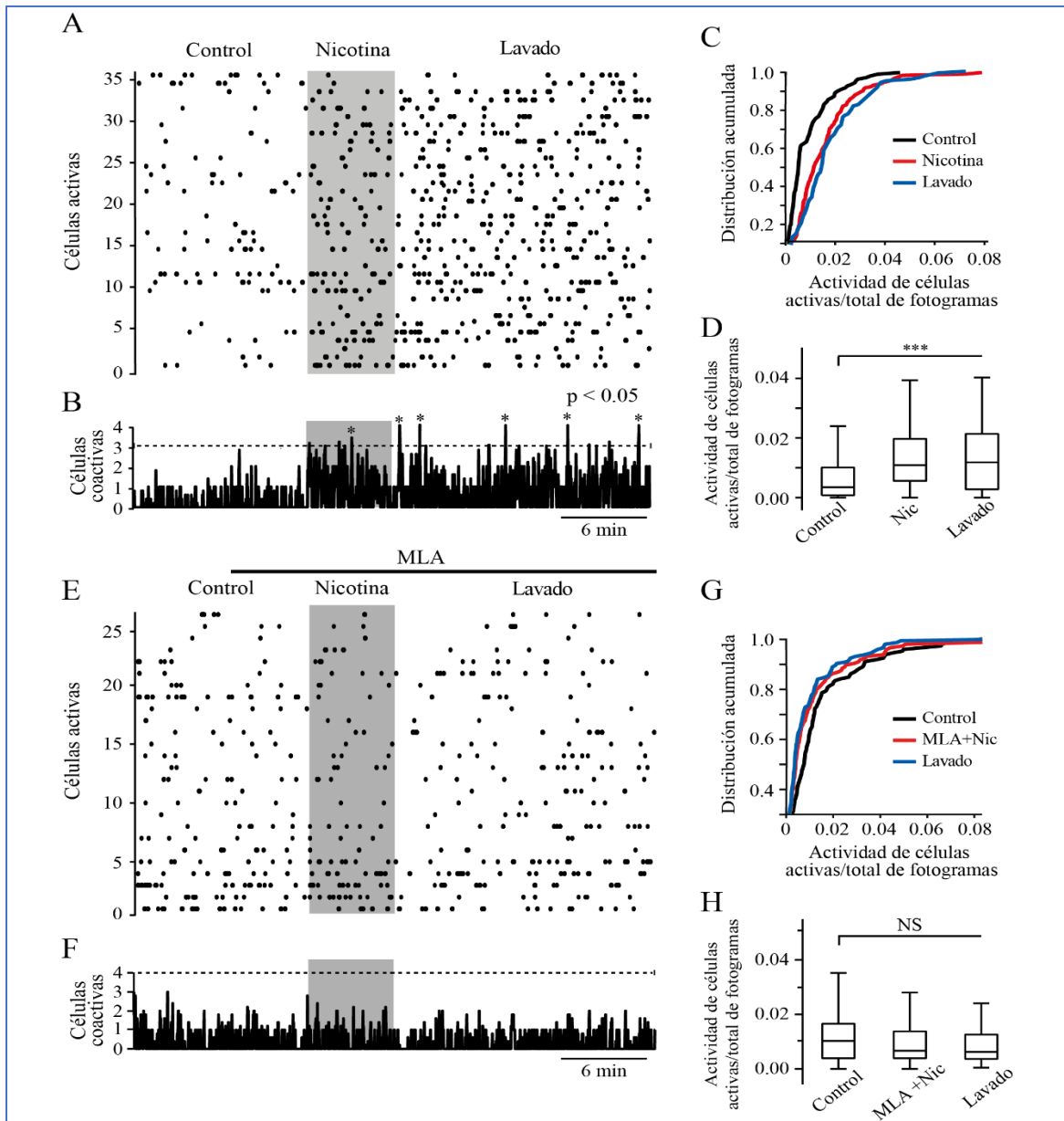


Figura 13. La nicotina incrementa la actividad poblacional del RMTg. (A) *Rasterplot* mostrando la actividad espontánea de 36 células de un solo experimento en el RMTg. Las filas representan la actividad individual de cada neurona a lo largo del experimento. Las columnas son los fotogramas del vídeo representados en escala de tiempo (minutos). Obsérvese que la actividad celular se incrementa al agregar nicotina (zona gris sombreada) y que dicho incremento persiste durante el lavado. (B) Histograma mostrando los picos de coactividad celular, los cuales representan el número de neuronas que dispararon juntas en un fotograma dado. Los picos (asteriscos) fueron estadísticamente significativos cuando sobrepasaron el umbral (Prueba de Monte Carlo). (C) Gráfica de las distribuciones acumuladas de la actividad celular en las tres diferentes condiciones. Nótese que con la nicotina (línea roja) y el lavado (línea azul), las distribuciones se desplazaron hacia la derecha, con respecto al control (línea negra), lo cual indica una mayor actividad celular. Las distribuciones de la nicotina y el lavado fueron estadísticamente distintas, comparadas con el control ($p < 0.001$). (D) Gráfica de cajas de la actividad celular en las tres distintas condiciones, donde se muestra un incremento significativo en la actividad con la nicotina y el lavado, comparando con el control ($***p < 0.001$, $n = 146$, seis experimentos). (E) *Rasterplot* mostrando la actividad espontánea de 27 células de un solo experimento en el RMTg. En presencia de MLA (100 nM, barra negra) la nicotina (zona gris sombreada) no incrementa la actividad celular. (F) El histograma muestra que los picos de coactividad no cambiaron en ninguna de las tres condiciones. (G) Distribuciones acumuladas donde se aprecia que no hubo cambios entre las tres condiciones ($p > 0.05$). (H) Gráfica de cajas de la actividad celular en las tres distintas condiciones, mostrando que no hubo cambios estadísticamente significativos de la actividad celular al aplicar nicotina en presencia de MLA (MLA+Nic) ni en el lavado, comparándolos con el control ($p > 0.05$, $n = 143$, cinco experimentos).

El histograma, debajo del *rasterplot*, los “picos” indican el número de neuronas coactivas en una ventana de tiempo (actividad poblacional sincrónica). Estos picos aparecen después de la aplicación de la nicotina e incrementan durante el tiempo del lavado (**Figura 13B**).

Las **Figura 13C** y **D** ilustran la actividad celular obtenida de 146 neuronas (seis experimentos). La actividad celular para cada neurona se obtuvo dividiendo el número de fotogramas en los cuales la célula estuvo activa entre el número total de fotogramas obtenidos durante todo el registro. La distribución acumulada de la actividad celular (**Figura 13C**) muestra que la nicotina (línea roja) desplazó la curva a la derecha y dicho desplazamiento se mantuvo durante el lavado (línea azul). Las distribuciones de la nicotina y el lavado fueron estadísticamente diferentes al control (línea negra) (Prueba de Kolmogórov-Smirnov, $p = 0.001$). La gráfica de cajas (*boxplot*) (**Figura 13D**) también muestra que hubo un incremento significativo en la actividad celular durante la aplicación de la nicotina y el lavado, en comparación con el control (prueba de Friedman, $p = 0.001$).

El *rasterplot* de la **Figura 13E** grafica 27 células de un solo experimento. Se muestra que la MLA (barra negra) bloquea el incremento en la actividad celular inducido por la nicotina (banda gris). La MLA por sí misma no tiene ningún efecto sobre la actividad neuronal. Los picos de actividad sincrónica no se observaron en ninguna de las tres condiciones: el control, la aplicación de la nicotina y el lavado (**Figura 13F**).

Las **Figura 13G** y **H** muestran el resumen de cinco experimentos (143 neuronas). La distribución acumulada de la actividad celular (**Figura 13G**) revela que no hubo diferencias entre las tres condiciones antes descritas (prueba de Kolmogórov-Smirnov, $p = 0.1632$). La gráfica de cajas no muestra cambios estadísticamente significativos de la actividad celular (**Figura 13H**) (Prueba de Friedman, $p = 0.1521$).

DISCUSIÓN

Los datos electrofisiológicos mostrados en este trabajo apoyan la idea de que la nicotina promueve una facilitación *a largo plazo* de la liberación de glutamato en el núcleo RMTg. Lo anterior está respaldado por la observación de que la nicotina incrementó de manera persistente la frecuencia y la amplitud de las sEPSCs registradas en neuronas gabaérgicas del RMTg. Los efectos de la nicotina fueron a través de la activación de receptores nicotínicos $\alpha 7$ y no $\alpha 4\beta 2$. Además, el agonista selectivo de los nAChRs $\alpha 7$ y la acetilcolina endógena, mimetizaron los efectos de la nicotina. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en un estudio previo, donde se observó que la nicotina incrementó la amplitud de las corrientes postsinápticas excitatorias en el RMTg, inducidas por estimulación eléctrica (Lecca *et al.*, 2011). Sin embargo, en dicho estudio se reporta que la nicotina incrementa la frecuencia de disparo en neuronas no identificadas del RMTg. En contraste, en nuestro trabajo la naturaleza gabaérgica de las neuronas registradas dentro del RMTg se comprobó primeramente por sus características electrofisiológicas, que fueron similares a las que se han reportado previamente: una tasa promedio de disparo de $\approx 11 - 17$ Hz, un potencial de acción de breve duración (≈ 1 ms) e intervalos interespiga con un rango de 50 – 70 ms (Jhou *et al.*, 2009a; Jalabert *et al.*, 2011; Lecca *et al.*, 2011). Posterior a los registros individuales, se utilizaron técnicas de inmunocitoquímica para corroborar la identidad gabaérgica de las neuronas registradas, empleando un anticuerpo específico contra la enzima GAD_{65/67} y otro contra el gen de transcripción temprana Fox-P1.

Por otro lado, los resultados aquí obtenidos permiten señalar que las terminales glutamatérgicas de la LHb, que llegan al núcleo RMTg, son reguladas por la activación de receptores nicotínicos $\alpha 7$. Dichas terminales tienen un efecto excitatorio sobre las neuronas gabaérgicas del RMTg, a través de receptores AMPA/Kainato (Balcita-Pedicino *et al.*, 2011; Lecca *et al.*, 2011). Además, en otro estudio se demostró que la estimulación optogenética de terminales axonales provenientes de la LHb produce corrientes postsinápticas excitatorias (EPSCs) en neuronas gabaérgicas del RMTg (Lammel *et al.*, 2012). La naturaleza glutamatérgica de las sEPSCs registradas se verificó con la

administración de CNQX, un antagonista de los receptores glutamatérgicos AMPA/Kainato, que provocó una supresión total de dichas corrientes (**Figura 1E**).

Tono colinérgico en el núcleo RMTg

La eserina es un fármaco inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa y, por lo tanto, favorece la persistencia de los efectos de la acetilcolina endógena. Con los experimentos realizados en presencia de la eserina y de atropina (un bloqueador de receptores colinérgicos muscarínicos), se observó un efecto similar al de la nicotina. Este resultado sugiere que existe un tono colinérgico mediado por receptores nicotínicos en el RMTg, el cual estaría regulado por la acetilcolinesterasa. Tal tono colinérgico es congruente con estudios anatómicos que reportan aferentes colinérgicas al RMTg desde los núcleos tegmentales laterodorsal (LTDg) y pedúnculo pontino (PPTg) (Woolf y Butcher, 1989; Barrot *et al.*, 2012; Bourdy y Barrot, 2012; Yeomans, 2012). Su importancia en la regulación de la actividad de las neuronas gabaérgicas del RMTg también repercute en la actividad de los núcleos dopaminérgicos mesencefálicos (VTA y SNc) a los cuales inervan dichas neuronas. Además, a pesar de que el efecto de la nicotina sobre las sEPSCs es parcialmente bloqueado por la aplicación de TTX, las mismas son totalmente atenuadas al aplicar CNQX, lo que indica que la excitabilidad de las neuronas del RMTg depende principalmente de la activación de receptores glutamatérgicos, aunque no se descarta la influencia de otras corrientes excitatorias.

Los efectos nicotínicos en el núcleo RMTg son presinápticos

Previamente se ha reportado que los receptores nicotínicos en el encéfalo se encuentran, en su mayoría, localizados en las terminales presinápticas donde están regulando la liberación de diversos neurotransmisores (Wonnacott, 1997; Sher *et al.*, 2004; Jensen *et al.*, 2005). Se sabe, además, que uno de los efectos presinápticos más comunes de la nicotina es modular la liberación de glutamato, la cual frecuentemente está mediada por nAChRs $\alpha 7$. Esto ha sido observado, por ejemplo, en la corteza prefrontal (Wang *et al.*, 2006; Konradsson-

Geuken *et al.*, 2009), el hipocampo (Maggi *et al.*, 2003, 2004; Sharma y Vijayaraghavan, 2003; Sharma *et al.*, 2008; Bancila *et al.*, 2009), el área tegmental ventral (Mansvelder y McGehee, 2000; Schilström *et al.*, 2000) y la habénula medial (McGehee *et al.*, 1995; Girod y Role, 2001).

Puesto que, en los experimentos en donde se utilizó un quelante de calcio intracelular (BAPTA) en la pipeta de registro, no se observó ningún bloqueo de las acciones de la nicotina, se puede concluir que el origen de los cambios en la frecuencia y la amplitud de las corrientes postsinápticas son debidos a un efecto presináptico. Por otro lado, la utilización de BAPTA-AM, otro quelante de calcio capaz de entrar tanto a los somas como a las terminales neuronales, suprimió los efectos de la nicotina. Esto confirma la idea de que la liberación de glutamato inducida por la nicotina depende de un incremento de los niveles de calcio en las terminales axónicas. Además, la aplicación de ACh directamente sobre las neuronas gabaérgicas del RMTg no produjo ninguna respuesta (**Figura 9D**), lo cual descartó la presencia de receptores nicotínicos postsinápticos.

La estimulación del receptor nicotínico $\alpha 7$ incrementa las sEPSCs

El agonista específico de los receptores nicotínicos $\alpha 7$, PNU-282987, mimetizó los efectos provocados por la nicotina en las sEPSCs (**Figura 8B**). El efecto del PNU fue menor al producido por la nicotina, pero es importante señalar que se utilizó una concentración muy baja del agonista (del orden nanomolar) para estos experimentos. Lo anterior debido a que, a concentraciones más altas del fármaco, se pierde selectividad. Congruente con la utilización del agonista de nAChRs $\alpha 7$, al emplear un bloqueador selectivo de estos mismos receptores nicotínicos, la metilcaconitina (MLA), el efecto de la nicotina sobre las corrientes postsinápticas fue suprimido (**Figura 7A, B y E**). Además, el mismo antagonista bloqueó el efecto de la nicotina a nivel poblacional en el RMTg, en experimentos de imagenología de calcio (**Figura 13**).

Los efectos de la nicotina en el RMTg dependen de las pozas intracelulares de calcio en la presinapsis

Los datos presentados muestran que los efectos de la nicotina son dependientes de un incremento del calcio intracelular y un mecanismo de “liberación de calcio inducida por calcio” (CICR, por sus siglas en inglés) ya que al utilizar dos bloqueadores de la SERCA como la tapsigargina y el CPA, se bloquearon los efectos inducidos por la nicotina sobre la frecuencia y amplitud de las sEPSCs.

En contraste, el cadmio no bloqueó los efectos inducidos por la nicotina en las sEPSCs, lo que indica que la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCCs) no es una condición necesaria para dichos efectos. Debido a que el receptor nicotínico $\alpha 7$ es 10 veces más permeable al calcio que el subtipo $\alpha 4\beta 2$ (Role y Berg, 1996), la entrada de calcio a la célula a través de los nAChRs $\alpha 7$, es suficiente para inducir el mecanismo de “liberación de calcio inducida por calcio”, sin la intervención de los VGCCs (Figura 10C) (Gray *et al.*, 1996; Sharma y Vijayaraghavan, 2003; Sharma *et al.*, 2008).

La nicotina promueve la liberación sincronizada de glutamato en las aferentes colinérgicas del RMTg

En muchas células registradas, la nicotina no solamente incrementó la frecuencia y la amplitud de las sEPSCs, sino que provocó la “actividad en ráfagas” de estas corrientes. La sustitución del 90% del calcio extracelular con cationes divalentes (estroncio y bario), eliminó por completo las ráfagas de las sEPSCs y bloqueó el incremento de la amplitud de éstas, facilitado por la nicotina. El calcio es el catión divalente que permite la sincronización de la maquinaria de liberación presináptica de neurotransmisor; al evitar la participación de calcio en dicho mecanismo (con la sustitución de otros cationes divalentes), el estroncio y el bario son incapaces de realizar correctamente el papel del calcio, lo que se refleja en la amplitud de las sEPSCs. Los cationes divalentes también provocaron una reducción pequeña, pero significativa, de la frecuencia de las sEPSCs previamente incrementada por la nicotina (Figura 11). Estos datos sugieren que la nicotina está

provocando una liberación sincronizada de glutamato desde los axones terminales, a través de un mecanismo dependiente de calcio (Sharma y Vijayaraghavan, 2003; Sharma *et al.*, 2008). Esta liberación sincrónica es interrumpida mediante el reemplazo de calcio con otros cationes divalentes (Léna y Changeux, 1997; Good y Lupica, 2009). Además, también los datos presentados aquí concuerdan con trabajos previos donde reportan que las acciones de la nicotina a través de los nAChRs $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$ involucran un mecanismo de CICR que incrementa la liberación sincronizada y la eficiencia sináptica en diferentes áreas del cerebro (Dajas-Bailador *et al.*, 2002; Dickinson *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2008; Garduño *et al.*, 2012).

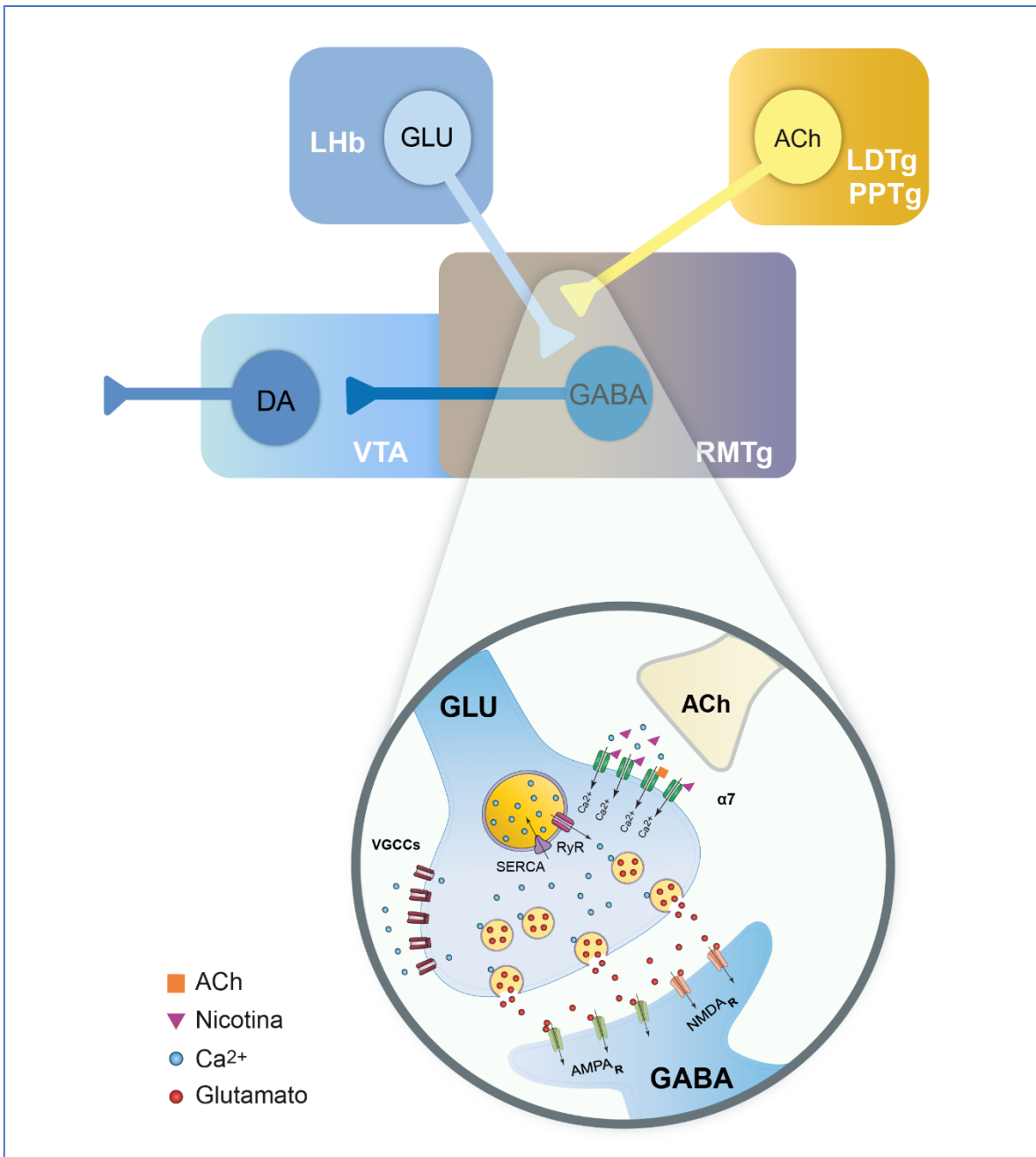


Figura 14. Diagrama resumiendo los efectos de la nicotina en las terminales glutamatérgicas en el RMTg. El esquema ilustra las aferencias principales al RMTg y los neurotransmisores involucrados (arriba). El núcleo RMTg recibe entradas glutamatérgicas (GLU) provenientes de la hipófisis lateral (LHb) y entradas colinérgicas (ACh) desde los núcleos tegmentales laterodorsal (LDTg) y pedúnculo pontino (PPTg).

Apoyando estos hallazgos, se ha reportado que los almacenes de calcio intracelular localizados en elementos presinápticos pueden regular la liberación de neurotransmisores en distintas áreas cerebrales (Llano *et al.*, 2000; Conti *et al.*, 2004).

La nicotina provoca efectos excitatorios a largo plazo

Los datos mostraron que la nicotina produce efectos persistentes de alrededor de 20 – 40 minutos, después del lavado de esta droga y que tales cambios no dependen del desarrollo de potenciales de acción por las neuronas glutamatérgicas que proyectan al RMTg, ya que la TTX no impidió el incremento de la frecuencia y de la amplitud de las mEPSCs, promovido por la nicotina. Sin embargo, en presencia de la TTX, se observó que el efecto de la nicotina fue menor al compararlo con el de la nicotina sola (**Figura 5C y Figura 6F**). Esto sugiere que existe una liberación sostenida de glutamato, probablemente debida al disparo tónico de potenciales de acción de las células glutamatérgicas que conectan con el RMTg y que facilita la acción de la nicotina sobre la liberación de neurotransmisor. Pero, puesto que la aplicación de la TTX no bloquea el incremento nicotínico de las mEPSCs, se puede sugerir que la nicotina tiene un efecto directo sobre las terminales glutamatérgicas que es independiente del disparo de potenciales de acción.

Por otro lado, se observó que el efecto del incremento de la amplitud es más duradero que el de la frecuencia (**Figura 5C**), indicando que la liberación sináptica permanece potenciada *a largo plazo*, incluso después del lavado de la nicotina.

Los registros de imagenología de calcio revelaron datos similares y consistentes con los obtenidos en registros de célula única, ya que la nicotina incrementó la excitabilidad poblacional de las neuronas del RMTg, y el efecto persistió más de 20 minutos después de que la nicotina fue retirada de la solución de perfusión. Además, los picos de coactividad indicaron que las neuronas coactivas fueron más frecuentes durante el tiempo del lavado. Lo anterior puede explicarse por los mecanismos celulares que desencadena la nicotina y que permanecen

activos aún después del retiro de la misma como, por ejemplo, vías intracelulares dependientes de enzimas reguladoras de la homeostasis del calcio. (**Figura 13A**).

En resumen, El RMTg ejerce un importante efecto inhibitorio mediado por GABA sobre las neuronas dopaminérgicas (DA) del área tegmental ventral (VTA). En la **Figura 14**, se muestra una vista detallada de los mecanismos de acción de la nicotina en las terminales glutamatérgicas de la LHb (abajo). La nicotina activa receptores nicotínicos $\alpha 7$ (nAChR $\alpha 7$); el flujo de calcio a través de los nAChR $\alpha 7$ provocará, a su vez, liberación de calcio inducida por calcio (CICR) desde el retículo endoplásmico a través de la activación de receptores de rianodina (RyR). Esto resultará en una liberación sincronizada de glutamato a largo plazo y un incremento de la excitabilidad de las neuronas gabaérgicas del RMTg.

Implicaciones fisiológicas

En este estudio se utilizó una concentración de 1 μ M de nicotina, la cual es de relevancia fisiológica, ya que dicha concentración se encuentra en el rango encontrado en el plasma de fumadores, después de fumar un cigarro (Dani y Heinemann, 1996). Esta baja concentración de nicotina fue capaz de producir una liberación sincronizada de glutamato *a largo plazo* en el núcleo RMTg. Además, la nicotina causó cambios sinápticos *a largo plazo* que fueron independientes del disparo neuronal.

Se ha descrito ampliamente que la nicotina produce una rápida desensibilización de los nAChRs (Wooltorton *et al.*, 2003). Sin embargo, el incremento de la eficiencia sináptica observado persistió por mucho tiempo después de que la desensibilización sucediera. Esto puede explicarse porque el flujo de calcio a través de los nAChRs α 7 provoca CICR (Figura 14) y esto lleva a la activación de cinasas dependientes de calcio (Dickinson *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2008; Garduño *et al.*, 2012; Zhong *et al.*, 2013). Lo cual, a su vez, induce una plasticidad sináptica de largo plazo. Esto resulta en una excitabilidad sostenida y sincrónica de las neuronas gabaérgicas del RMTg, como lo demostraron los experimentos de imagenología de calcio. Por lo tanto, la nicotina es capaz de modificar la actividad de la red neuronal del núcleo RMTg.

Es bien sabido que la nicotina activa nAChRs de diversas áreas cerebrales relacionadas con la recompensa, como el VTA (Mansvelder y McGehee, 2002; Miller y Picciotto, 2016) y el núcleo accumbens (Pontieri *et al.*, 1996; Picciotto *et al.*, 1998; Zoli *et al.*, 2002). La estimulación nicotínica de estructuras relacionadas con la recompensa juega un papel importante en el establecimiento y el mantenimiento del hábito de fumar (Kenny y Markou, 2006). Sin embargo, también la nicotina produce efectos aversivos, mediados por varias estructuras cerebrales, incluyendo la habénula medial (MHb) y el IPN (Fowler *et al.*, 2013; Shih *et al.*, 2014). Por ejemplo, estudios recientes han mostrado que la activación de la vía MHb-IPN elimina el efecto recompensante inducido por la nicotina y disminuye el consumo de nicotina (Tuesta *et al.*, 2017).

De acuerdo con los datos presentados en este trabajo, las acciones de la nicotina en el RMTg podrían también provocar efectos aversivos debido a un incremento de la actividad de neuronas gabaérgicas lo cual inhibiría, a su vez, los sistemas mesolímbicos relacionados con la recompensa. Apoyando esta idea, se ha reportado que la estimulación de las aferentes glutamatérgicas al RMTg provoca aversión a estímulos que normalmente eran inocuos (Stamatakis y Stuber, 2012). Adicionalmente, se ha mostrado que las neuronas del RMTg que proyectan al VTA codifican información sobre estímulos motivacionales negativos, pero no positivos (Li *et al.*, 2019b, 2019a).

En conclusión, incrementar la excitabilidad de los circuitos neuronales que están mediando las propiedades aversivas de la nicotina, podría ser una estrategia efectiva para disminuir la adicción a la nicotina (Fowler y Kenny, 2014). Acorde con esto, se ha observado que las reacciones aversivas a la nicotina son importantes para reducir la probabilidad de desarrollar un hábito por el tabaco, en fumadores que inician el consumo por primera vez (Sartor *et al.*, 2010). Por lo tanto, el núcleo RMTg podría ser un blanco farmacológico potencial contra la adicción al tabaco. Por ejemplo, el uso de un modulador alostérico positivo de los nAChRs $\alpha 7$ podría potenciar los efectos aversivos de la nicotina, al incrementar el disparo sincrónico de las neuronas gabaérgicas del RMTg y con ello, inhibir a las neuronas dopaminérgicas del VTA.

CONCLUSIONES

1. La nicotina aumenta la liberación de glutamato en el RMTg, a través de la activación de receptores nicotínicos $\alpha 7$ localizados en las terminales glutamatérgicas.
2. El efecto de la nicotina depende del calcio proveniente de las pozas intracelulares y no del influjo de calcio a través de los VGCCs.
3. La nicotina tiene un efecto a largo plazo, persistiendo aún después de la desensibilización de los nAChRs.
4. La nicotina produce un incremento en la excitabilidad y disparo sincrónico en las neuronas del RMTg.
5. La manipulación farmacológica de este efecto nicotínico sobre la potenciación de la liberación de glutamato sobre las neuronas gabaérgicas del RMTg, que resulta en una inhibición de las neuronas dopaminérgicas –promoviendo aversión–, pudiera ser útil para inducir aversión a la nicotina.

BIBLIOGRAFÍA

- Albuquerque, E. X., Pereira, E. F. R., Alkondon, M., y Rogers, S. W. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: From structure to function. *Physiol. Rev.* doi:10.1152/physrev.00015.2008.
- Allen, N. J., Káradóttir, R., y Attwell, D. (2004). Reversal or reduction of glutamate and GABA transport in CNS pathology and therapy. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* doi:10.1007/s00424-004-1318-x.
- Aparicio-Juárez, A., Duhne, M., Lara-González, E., Ávila-Cascajares, F., Calderón, V., Galarraga, E., et al. (2019). Cortical stimulation relieves parkinsonian pathological activity in vitro. *Eur. J. Neurosci.* doi:10.1111/ejn.13806.
- Balcita-Pedicino, J. J., Omelchenko, N., Bell, R., y Sesack, S. R. (2011). The inhibitory influence of the lateral habenula on midbrain dopamine cells: Ultrastructural evidence for indirect mediation via the rostromedial mesopontine tegmental nucleus. *J. Comp. Neurol.* doi:10.1002/cne.22561.
- Bancila, V., Cordeiro, J. M., Bloc, A., y Dunant, Y. (2009). Nicotine-induced and depolarisation-induced glutamate release from hippocampus mossy fibre synaptosomes: Two distinct mechanisms. *J. Neurochem.* doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06169.x.
- Barik, J., y Wonnacott, S. (2009). Molecular and cellular mechanisms of action of nicotine in the CNS. *Handb. Exp. Pharmacol.* 192, 173–207. doi:10.1007/978-3-540-69248-5_7.
- Barrot, M., Sesack, S. R., Georges, F., Pistis, M., Hong, S., y Jhou, T. C. (2012). Braking Dopamine Systems: A New GABA Master Structure for Mesolimbic and Nigrostriatal Functions. *J. Neurosci.* 32, 14094–14101. doi:10.1523/JNEUROSCI.3370-12.2012.
- Barrot, M., y Thome, J. (2011). Discovering a new anatomical structure in the brain: Implications for neuropsychiatry and therapy. *World J. Biol. Psychiatry.* doi:10.3109/15622975.2011.598386.

- Benowitz, N. L. (2010). Nicotine Addiction. <http://dx.doi.org.pbid.unam.mx:8080/10.1056/NEJMra0809890> 362, 2295–2303. doi:10.1056/NEJMRA0809890.
- Bourdy, R., y Barrot, M. (2012). A new control center for dopaminergic systems: Pulling the VTA by the tail. *Trends Neurosci.* 35, 681–690. doi:10.1016/j.tins.2012.06.007.
- Bourdy, R., Sánchez-Catalán, M. J., Kaufling, J., Balcita-Pedicino, J. J., Freund-Mercier, M. J., Veinante, P., et al. (2014). Control of the nigrostriatal dopamine neuron activity and motor function by the tail of the ventral tegmental area. *Neuropsychopharmacology* 39, 2788–2798. doi:10.1038/npp.2014.129.
- Breese, C. R., Adams, C., Logel, J., Drebing, C., Rollins, Y., Barnhart, M., et al. (1997). Comparison of the regional expression of nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ mRNA and [125I]- α -bungarotoxin binding in human postmortem brain. *J. Comp. Neurol.* 387, 385–398. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19971027)387:3<385::AID-CNE5>3.0.CO;2-X.
- Brinschwitz, K., Dittgen, a., Madai, V. I., Lommel, R., Geisler, S., y Veh, R. W. (2010). Glutamatergic axons from the lateral habenula mainly terminate on GABAergic neurons of the ventral midbrain. *Neuroscience* 168, 463–476. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.03.050.
- Broide, R. S., O'Connor, L. T., Smith, M. A., Smith, J. A. M., y Leslie, F. M. (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.
- Bromberg-Martin, E. S., Matsumoto, M., y Hikosaka, O. (2010). Dopamine in Motivational Control: Rewarding, Aversive, and Alerting. *Neuron* 68, 815–834. doi:10.1016/j.neuron.2010.11.022.
- Carrillo-Reid, L., Hernández-López, S., Tapia, D., Galarraga, E., y Bargas, J. (2011). Dopaminergic modulation of the striatal microcircuit: Receptor-specific configuration of cell assemblies. *J. Neurosci.* doi:10.1523/JNEUROSCI.3226-11.2011.
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Tapia, D., Hernández-Cruz, A.,

- Galarraga, E., Drucker-Colin, R., et al. (2008). Encoding network states by striatal cell assemblies. *J. Neurophysiol.* doi:10.1152/jn.01131.2007.
- Changeux, J. P., Bertrand, D., Corringier, P. J., Dehaene, S., Edelstein, S., Léna, C., et al. (1998). Brain nicotinic receptors: Structure and regulation, role in learning and reinforcement. en *Brain Research Reviews* doi:10.1016/S0165-0173(97)00040-4.
- Changeux, J. P., Devillers-Thiery, A., y Bertrand, D. (1992). The functional architecture of the acetylcholine nicotinic receptor explored by affinity labelling and site-directed mutagenesis. *Q. Rev. Biophys.* 25, 395–432. doi:10.1017/S0033583500004352.
- Chen, D. T., Miller, F. G., y Rosenstein, D. L. (2003). Nicotine induces glutamate release from thalamocortical terminals in prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*.
- Christoph, G. R., Leonzio, R. J., y Wilcox, K. S. (1986). Stimulation of the lateral habenula inhibits dopamine-containing neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area of the rabbit. *J. Neurosci.* doi:10.1523/jneurosci.06-03-00613.1986.
- Conti, R., Tan, Y. P., y Llano, I. (2004). Action potential-evoked and ryanodine-sensitive spontaneous Ca²⁺ transients at the presynaptic terminal of a developing CNS inhibitory synapse. *J. Neurosci.* doi:10.1523/JNEUROSCI.1397-04.2004.
- Cooper, J., Bloom, F., y Roth, R. (2002). “Amino acid transmitters, ‘Glutamic Acid’”, en *Biochemical Basis of Neuropharmacology (8th edition)* (Oxford University Press: USA, 2002.), 132–148. doi:10.1002/hup.553.
- Cooper, J. R., Bloom, F. E., y Roth, R. H. (1975). The Biochemical Basis of Neuropharmacology. *Anesthesiology*. doi:10.1097/00000542-197502000-00029.
- Dajas-Bailador, F. A., Mogg, A. J., y Wonnacott, S. (2002). Intracellular Ca²⁺ signals evoked by stimulation of nicotinic acetylcholine receptors in SH-SY5Y cells: Contribution of voltage-operated Ca²⁺ channels and Ca²⁺ stores. *J. Neurochem.* doi:10.1046/j.1471-4159.2002.00846.x.

Dani, J. A. (2015). "Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Structure and Function and Response to Nicotine", en *International Review of Neurobiology* doi:10.1016/bs.irn.2015.07.001.

Dani, J. A., 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.

Dani, J. A., y Heinemann, S. (1996). Molecular and cellular aspects of nicotine abuse. *Neuron*. doi:10.1016/S0896-6273(00)80112-9.

Dani, J. A., Radcliffe, K. A., y Pidoplichko, V. I. (2000). Variations in desensitization of nicotinic acetylcholine receptors from hippocampus and midbrain dopamine areas. *Eur. J. Pharmacol.*, 31–38.

Decker, M. W., Brioni, J. D., Bannon, A. W., y Arneric, S. P. (1995). Diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: Lessons from behavior and implications for cns therapeutics. *Life Sci.* doi:10.1016/0024-3205(94)00488-E.

Dickinson, J. A., Kew, J. N. C., y 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.

Engstrom, P. F., Clapper, M. L., y Schnoll, R. A. (2003). "Physiochemical Composition of Tobacco Smoke", en *Holland-Frei Cancer Medicine*, eds. Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, y et al. (Hamilton: BC Decker). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13173/> [Consultado septiembre 8, 2021].

Exley, R., y Cragg, S. J. (2008). Presynaptic nicotinic receptors: A dynamic and diverse cholinergic filter of striatal dopamine neurotransmission. en *British Journal of Pharmacology* doi:10.1038/sj.bjp.0707510.

Ferreira, J. G. P., Del-Fava, F., Hasue, R. H., y Shammah-Lagnado, S. J. (2008). Organization of ventral tegmental area projections to the

ventral tegmental area-nigral complex in the rat. *Neuroscience*. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.02.003.

- Fisher, S. K., y Wonnacott, S. (2012). "Acetylcholine", en *Basic Neurochemistry* (Elsevier), 258–282. doi:10.1016/B978-0-12-374947-5.00013-4.
- Flores, C. M., Rogers, S. W., Pabreza, L. A., Wolfe, B. B., y Kellar, K. J. (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.*
- Fowler, C. D., y Kenny, P. J. (2014). Nicotine aversion: Neurobiological mechanisms and relevance to tobacco dependence vulnerability. *Neuropharmacology* 76, 533–544. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.09.008.
- Fowler, C. D., Tuesta, L., y Kenny, P. J. (2013). Role of anicotinic acetylcholine receptors in the effects of acute and chronic nicotine treatment on brain reward function in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. doi:10.1007/s00213-013-3235-1.
- Freund, T. F., y Gulyás, A. I. (1991). GABAergic interneurons containing calbindin D28K or somatostatin are major targets of GABAergic basal forebrain afferents in the rat neocortex. *J. Comp. Neurol.* doi:10.1002/cne.903140117.
- Galindo-Charles, L., Hernández-López, S., Galarraga, E., Tapia, D., Bargas, J., Garduño, J., et al. (2008). Serotonergic dorsal raphe neurons possess functional postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors. *Synapse*. doi:10.1002/syn.20526.
- Gao, D. M., Huffman, D., y Benabid, A. L. (1996). Simultaneous recording of spontaneous activities and nociceptive responses from neurons in the Pars compacta of Substantia nigra and in the lateral habenula. *Eur. J. Neurosci.* doi:10.1111/j.1460-9568.1996.tb01609.x.
- Garduño, J., Galindo-Charles, L., Jimenez-Rodriguez, J., Galarraga, E., Tapia, D., Mihailescu, S., et al. (2012). Presynaptic $\alpha 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptors Increase Glutamate Release and Serotonin Neuron Excitability in the Dorsal Raphe Nucleus. *J.*

Neurosci. 32, 15148–15157. doi:10.1523/JNEUROSCI.0941-12.2012.

Geisler, S., Derst, C., Veh, R. W., y Zahm, D. S. (2007). Glutamatergic afferents of the ventral tegmental area in the rat. *J. Neurosci.* doi:10.1523/JNEUROSCI.0012-07.2007.

Geisler, S., y Wise, R. a (2008). Functional implications of glutamatergic projections to the ventral tegmental area. *Rev. Neurosci.* 19, 227–244. doi:10.1515/REVNEURO.2008.19.4-5.227.

Geisler, S., y Zahm, D. S. (2005). Afferents of the ventral tegmental area in the rat-anatomical substratum for integrative functions. *J. Comp. Neurol.* 490, 270–294. doi:10.1002/cne.20668.

Gilabert, J. A. (2012). Cytoplasmic calcium buffering. *Adv. Exp. Med. Biol.* doi:10.1007/978-94-007-2888-2_20.

Gioanni, Y. (1999). Nicotinic receptors in the rat prefrontal cortex: Increase in glutamate release and facilitation of mediodorsal thalamo-cortical transmission. *Eur. J. Neurosci.* 11, 18–30. doi:10.1046/j.1460-9568.1999.00403.x.

Girod, R., y Role, L. W. (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.

Gonçalves, L., Segó, C., y Metzger, M. (2012). Differential projections from the lateral habenula to the rostromedial tegmental nucleus and ventral tegmental area in the rat. *J. Comp. Neurol.* doi:10.1002/cne.22787.

Good, C. H., y Lupica, C. R. (2009). Properties of distinct ventral tegmental area synapses activated via pedunculo-pontine or ventral tegmental area stimulation in vitro. *J. Physiol.* doi:10.1113/jphysiol.2008.164194.

Gotti, C., y Clementi, F. (2004). Neuronal nicotinic receptors: From structure to pathology. *Prog. Neurobiol.* doi:10.1016/j.pneurobio.2004.09.006.

- Gotti, C., Fornasari, D., y Clementi, F. (1997). Human neuronal nicotinic receptors. *Prog. Neurobiol.* doi:10.1016/S0301-0082(97)00034-8.
- Gotti, C., Zoli, M., y Clementi, F. (2006). Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends Pharmacol. Sci.* doi:10.1016/j.tips.2006.07.004.
- Gray, R., Rajan, A. S., Radcliffe, K. A., Yakehiro, M., y Dani, J. A. (1996). Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature.* doi:10.1038/383713a0.
- Grunnet, M., Jensen, A. A., Grupe, M., Nielsen, K. S., y Christensen, J. K. (2012). Potentiation of in vivo glutamate release in rat prefrontal cortex following systemic administration of a positive allosteric modulator of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors. *Acta Neuropsychiatr.* 24, 16–17. Available at: https://www.mendeley.com/catalogue/92d20bb3-511e-3807-addf-766d558b068d/?utm_source=desktop&utm_medium=1.19.4&utm_campaign=open_catalog&userDocumentId=%7Be29590f8-5f9e-42e4-b70e-770e36794ebd%7D [Consultado marzo 18, 2021].
- Gulley, J. M., Kuwajima, M., Mayhill, E., y Rebec, G. V. (1999). Behavior-related changes in the activity of substantia nigra pars reticulata neurons in freely moving rats. *Brain Res.* doi:10.1016/S0006-8993(99)01932-0.
- Harvey, S. C., McIntosh, J. M., Cartier, G. E., Maddox, F. N., y Luetje, C. W. (1997). Determinants of specificity for α -conotoxin MII on α 3 β 2 neuronal nicotinic receptors. *Mol. Pharmacol.* doi:10.1124/mol.51.2.336.
- Hassel, B., y Dingledine, R. (2012). Glutamate and Glutamate Receptors. *Basic Neurochem.*, 342–366. doi:10.1016/B978-0-12-374947-5.00017-1.
- Hogg, R. C., Raggenbass, M., y Bertrand, D. (2003). Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* doi:10.1007/s10254-003-0005-1.
- Holstege, G. (2009). The mesopontine rostromedial tegmental nucleus and the emotional motor system: Role in basic survival behavior. *J.*

Comp. Neurol. doi:10.1002/cne.21990.

- Holstege, G., Bandler, R., y Saper, C. B. (1996). The emotional motor system. *Prog. Brain Res.* doi:10.1016/s0079-6123(08)61855-5.
- Hong, S., Jhou, T. C., Smith, M., Saleem, K. S., y Hikosaka, O. (2011). Negative reward signals from the lateral habenula to dopamine neurons are mediated by rostromedial tegmental nucleus in primates. *J. Neurosci.* 31, 11457–11471. doi:10.1523/JNEUROSCI.1384-11.2011.
- Hsiao, B., Dweck, D., y Luetje, C. W. (2001). Subunit-dependent modulation of neuronal nicotinic receptors by zinc. *J. Neurosci.* doi:10.1523/jneurosci.21-06-01848.2001.
- Ikegaya, Y., Le Bon-Jego, M., y Yuste, R. (2005). Large-scale imaging of cortical network activity with calcium indicators. *Neurosci. Res.* doi:10.1016/j.neures.2005.02.004.
- Jalabert, M., Bourdy, R., Courtin, J., Veinante, P., Manzoni, O. J., Barrot, M., et al. (2011). Neuronal circuits underlying acute morphine action on dopamine neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.1105418108.
- Jensen, A. A., Frølund, B., Liljefors, T., y Krogsgaard-Larsen, P. (2005). Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors: Structural Revelations, Target Identifications, and Therapeutic Inspirations. *J. Med. Chem.* 48, 4705–4745. doi:10.1021/jm040219e.
- Jhou, T. C. (2005). Neural Mechanisms of Freezing and Passive Aversive Behaviors. 114, 111–114. doi:10.1002/cne.20734.
- Jhou, T. C., Fields, H. L., Baxter, M. G., Saper, C. B., y Holland, P. C. (2009a). The Rostromedial Tegmental Nucleus (RMTg), a GABAergic Afferent to Midbrain Dopamine Neurons, Encodes Aversive Stimuli and Inhibits Motor Responses. *Neuron* 61, 786–800. doi:10.1016/j.neuron.2009.02.001.
- Jhou, T. C., Geisler, S., Marinelli, M., Degarmo, B. A., y Zahm, D. S. (2009b). The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: A structure targeted by the lateral habenula that projects to the ventral tegmental area of Tsai and substantia nigra compacta. *J.*

Comp. Neurol. 513, 566–596. doi:10.1002/cne.21891.

- Jhou, T. C., Xu, S. P., Lee, M. R., Gallen, C. L., y Ikemoto, S. (2012). Mapping of reinforcing and analgesic effects of the mu opioid agonist Endomorphin-1 in the ventral midbrain of the rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 224, 303–312. doi:10.1007/s00213-012-2753-6.
- Ji, H., y Shepard, P. D. (2007). Lateral habenula stimulation inhibits rat midbrain dopamine neurons through a GABAA receptor-mediated mechanism. *J. Neurosci.* doi:10.1523/JNEUROSCI.0958-07.2007.
- Jones, S., y Bonci, A. (2005). Synaptic plasticity and drug addiction. *Curr. Opin. Pharmacol.* doi:10.1016/j.coph.2004.08.011.
- Kauffling, J., y Aston-Jones, G. (2015). Persistent Adaptations in Afferents to Ventral Tegmental Dopamine Neurons after Opiate Withdrawal. *J. Neurosci.* 35, 10290–10303. doi:10.1523/jneurosci.0715-15.2015.
- Kauffling, J., Veinante, P., Pawlowski, S. a., Freund-Mercier, M. J., y Barrot, M. (2009). Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat. *J. Comp. Neurol.* 513, 597–621. doi:10.1002/cne.21983.
- Kauffling, J., Veinante, P., Pawlowski, S. A., Freund-Mercier, M. J., y Barrot, M. (2010a). γ -Aminobutyric Acid Cells with Cocaine-Induced Δ FosB in the Ventral Tegmental Area Innervate Mesolimbic Neurons. *Biol. Psychiatry* 67, 88–92. doi:10.1016/j.biopsych.2009.08.001.
- Kauffling, J., Waltisperger, E., Bourdy, R., Valera, A., Veinante, P., Freund-Mercier, M. J., et al. (2010b). Pharmacological recruitment of the GABAergic tail of the ventral tegmental area by acute drug exposure. *Br. J. Pharmacol.* 161, 1677–1691. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00984.x.
- Kenny, P. J., y Markou, A. (2006). Nicotine self-administration acutely activates brain reward systems and induces a long-lasting increase in reward sensitivity. *Neuropsychopharmacology*. doi:10.1038/sj.npp.1300905.

- Kleppner, S. R., y Tobin, A. J. (2001). GABA signalling: Therapeutic targets for epilepsy, Parkinson's disease and Huntington's disease. *Expert Opin. Ther. Targets*. doi:10.1517/14728222.5.2.219.
- Klink, R., De Kerchove D'Exaerde, A., Zoli, M., y Changeux, J. P. (2001). Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. *J. Neurosci.* doi:10.1523/jneurosci.21-05-01452.2001.
- Konradsson-Geuken, A., Gash, C. R., Alexander, K., Pomerleau, F., Huettl, P., Gerhardt, G. A., et al. (2009). Second-by-second analysis of alpha 7 nicotine receptor regulation of glutamate release in the prefrontal cortex of awake rats. *Synapse*. doi:10.1002/syn.20693.
- Lahti, L., Haugas, M., Tikker, L., Airavaara, M., Voutilainen, M. H., Anttila, J., et al. (2016). Differentiation and molecular heterogeneity of inhibitory and excitatory neurons associated with midbrain dopaminergic nuclei. *Dev.* 143, 516–529. doi:10.1242/dev.129957.
- Lambe, E. K., Picciotto, M. R., y Aghajanian, G. K. (2003). Nicotine induces glutamate release from thalamocortical terminals in prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*. doi:10.1038/sj.npp.1300032.
- Lammel, S., Lim, B. K., Ran, C., Huang, K. W., Betley, M. J., Tye, K. M., et al. (2012). Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature* 491, 212–217. doi:10.1038/nature11527.
- Lavezzi, H. N., Parsley, K. P., y Zahm, D. S. (2012). Mesopontine rostromedial tegmental nucleus neurons projecting to the dorsal raphe and pedunculo pontine tegmental nucleus: Psychostimulant-elicited Fos expression and collateralization. *Brain Struct. Funct.* 217, 719–734. doi:10.1007/s00429-011-0368-z.
- Lavezzi, H. N., y Zahm, D. S. (2011). The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: An integrative modulator of the reward system. *Basal Ganglia* 1, 191–200. doi:10.1016/j.baga.2011.08.003.
- Lecca, S., Melis, M., Luchicchi, A., Ennas, M. G., Castelli, M. P.,

- Muntoni, A. L., et al. (2011). Effects of drugs of abuse on putative rostromedial tegmental neurons, inhibitory afferents to midbrain dopamine cells. *Neuropsychopharmacology* 36, 589–602. doi:10.1038/npp.2010.190.
- Lecca, S., Melis, M., Luchicchi, A., Muntoni, A. L., 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* 37, 1164–1176. doi:10.1038/npp.2011.302.
- Léna, C., y Changeux, J. P. (1997). Role of Ca²⁺ ions in nicotinic facilitation of GABA release in mouse thalamus. *J. Neurosci.* doi:10.1523/JNEUROSCI.17-02-00576.1997.
- Li, H., Pullmann, D., Cho, J. Y., Eid, M., y Jhou, T. C. (2019a). Generality and opponency of rostromedial tegmental (RMTg) roles in valence processing. *Elife* 8, 1–19. doi:10.7554/elife.41542.
- Li, H., Vento, P. J., Parrilla-Carrero, J., Pullmann, D., Chao, Y. S., Eid, M., et al. (2019b). Three Rostromedial Tegmental Afferents Drive Triply Dissociable Aspects of Punishment Learning and Aversive Valence Encoding. *Neuron*. doi:10.1016/j.neuron.2019.08.040.
- Lindstrom, J., Anand, R., Gerzanich, V., Peng, X., Wang, F., y Wells, G. (1996). Structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. en *Progress in Brain Research* doi:10.1016/s0079-6123(08)62094-4.
- Llano, I., González, J., Caputo, C., Lai, F. A., Blayney, L. M., Tan, Y. P., et al. (2000). Presynaptic calcium stores underlie large-amplitude miniature IPSCs and spontaneous calcium transients. *Nat. Neurosci.* doi:10.1038/81781.
- Luetje, C. W., y Patrick, J. (1991). Both α - and β -subunits contribute to the agonist sensitivity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurosci.* doi:10.1523/jneurosci.11-03-00837.1991.
- MacDermott, A. B., Role, L. W., y Siegelbaum, S. A. (1999). Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release. *Annu. Rev. Neurosci.* doi:10.1146/annurev.neuro.22.1.443.

- Machaalani, R., Kashi, P. K., y Waters, K. A. (2010). Distribution of nicotinic acetylcholine receptor subunits $\alpha 7$ and $\beta 2$ in the human brainstem and hippocampal formation. *J. Chem. Neuroanat.* doi:10.1016/j.jchemneu.2010.05.009.
- Maggi, L., Le Magueresse, C., Changeux, J. P., y Cherubini, E. (2003). Nicotine activates immature "silent" connections in the developing hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* doi:10.1073/pnas.0437947100.
- Maggi, L., Sola, E., Minneci, F., Le Magueresse, C., Changeux, J. P., y 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.
- Mansvelder, H. D., Keath, J. R., y McGehee, D. S. (2002). Synaptic mechanisms underlie nicotine-induced excitability of brain reward areas. *Neuron.* doi:10.1016/S0896-6273(02)00625-6.
- Mansvelder, H. D., y McGehee, D. S. (2000). Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. *Neuron.* doi:10.1016/S0896-6273(00)00042-8.
- Mansvelder, H. D., y McGehee, D. S. (2002). Cellular and synaptic mechanisms of nicotine addiction. *J. Neurobiol.* doi:10.1002/neu.10148.
- Mansvelder, H. D., Van Aerde, K. I., Couey, J. J., y Brussaard, A. B. (2006). Nicotinic modulation of neuronal networks: From receptors to cognition. en *Psychopharmacology* doi:10.1007/s00213-005-0070-z.
- Mao, D., Gallagher, K., y McGehee, D. S. (2011). Nicotine potentiation of excitatory inputs to ventral tegmental area dopamine neurons. *J. Neurosci.* doi:10.1523/JNEUROSCI.5671-10.2011.
- Mathers, M., Toumbourou, J. W., Catalano, R. F., Williams, J., y Patton, G. C. (2006). Consequences of youth tobacco use: A review of prospective behavioural studies. *Addiction.* doi:10.1111/j.1360-0443.2006.01438.x.

- Matsui, A., y Williams, J. T. (2011). Opioid-sensitive GABA inputs from rostromedial tegmental nucleus synapse onto midbrain dopamine neurons. *J. Neurosci.* doi:10.1523/JNEUROSCI.4570-11.2011.
- Matsumoto, M., y Hikosaka, O. (2007). Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature.* doi:10.1038/nature05860.
- Mazei-Robison, M. S., y Nestler, E. J. (2012). Opiate-induced molecular and cellular plasticity of ventral tegmental area and locus coeruleus catecholamine neurons. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* doi:10.1101/cshperspect.a012070.
- McGehee, D. S., Heath, M. J. S., Gelber, S., Devay, P., y Role, L. W. (1995). Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors. *Science (80-).* doi:10.1126/science.7569895.
- McKay, B. E., Placzek, A. N., y Dani, J. A. (2007). Regulation of synaptic transmission and plasticity by neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem. Pharmacol.* doi:10.1016/j.bcp.2007.07.001.
- Miao, H., Liu, C., Bishop, K., Gong, Z. H., Nordberg, A., y Zhang, X. (1998). Nicotine exposure during a critical period of development leads to persistent changes in nicotinic acetylcholine receptors of adult rat brain. *J. Neurochem.* doi:10.1046/j.1471-4159.1998.70020752.x.
- Millar, N. S., y Gotti, C. (2009). Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology.* doi:10.1016/j.neuropharm.2008.07.041.
- Miller, M. B., y Picciotto, M. R. (2016). "Nicotine pharmacology, abuse, and addiction", en *Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical, Second Edition* doi:10.1007/978-1-4939-3474-4_157.
- Miralles, C. P., Li, M., Mehta, A. K., Khan, Z. U., y De Blas, A. L. (1999). Immunocytochemical localization of the $\beta 3$ subunit of the γ -aminobutyric acid(A) receptor in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19991101)413:4<535::AID-CNE4>3.0.CO;2-T.

- Nestler, E. J. (2004). Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology*. doi:10.1016/j.neuropharm.2004.06.031.
- Nicholls, D. G. (1989). Release of Glutamate, Aspartate, and γ -Aminobutyric Acid from Isolated Nerve Terminals. *J. Neurochem.* doi:10.1111/j.1471-4159.1989.tb09126.x.
- Olsen, R. W. (1999). GABA Synthesis, Uptake and Release. *Basic Neurochem. Mol. Cell. Med. Asp.*
- Omelchenko, N., y Sesack, S. R. (2005). Laterodorsal tegmental projections to identified cell populations in the rat ventral tegmental area. *J. Comp. Neurol.* 483, 217–235. doi:10.1002/cne.20417.
- Ozawa, S., Kamiya, H., y Tsuzuki, K. (1998). Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* doi:10.1016/S0301-0082(97)00085-3.
- Pérez-Ortega, J., Duhne, M., Lara-González, E., Plata, V., Gasca, D., Galarraga, E., et al. (2016). Pathophysiological signatures of functional connectomics in parkinsonian and dyskinetic striatal microcircuits. *Neurobiol. Dis.* doi:10.1016/j.nbd.2016.02.023.
- Perrotti, L. I., Bolaños, C. A., Choi, K.-H., Russo, S. J., Edwards, S., Ulery, P. G., et al. (2005). Δ FosB accumulates in a GABAergic cell population in the posterior tail of the ventral tegmental area after psychostimulant treatment. *Eur. J. Neurosci.* 21, 2817–2824. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04110.x.
- Picciotto, M. R. (2003). Nicotine as a modulator of behavior: Beyond the inverted U. *Trends Pharmacol. Sci.* doi:10.1016/S0165-6147(03)00230-X.
- Picciotto, M. R., Zoli, M., Rimondini, R., Léna, C., Marubio, L. M., Pich, E. M., et al. (1998). Acetylcholine receptors containing the β 2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature*. doi:10.1038/34413.
- Pidoplichko, V. I., DeBiasi, M., Williams, J. T., y Dani, J. A. (1997). Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. *Nature* 390, 401–404.

- Pierce, R. C., y Kumaresan, V. (2006). The mesolimbic dopamine system: The final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 30, 215–238. doi:10.1016/j.neubiorev.2005.04.016.
- Pontieri, F. E., Tanda, G., Orzi, F., y Di Chiara, G. (1996). Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. *Nature*. doi:10.1038/382255a0.
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Katz, L. C., LaMantia, A.-S., McNamara, J. O., et al. (2001). “Acetylcholine”, en *Neuroscience. 2nd edition*. (Sinauer Associates). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11143/> [Consultado marzo 17, 2021].
- Rashmi, D., Zanan, R., John, S., Khandagale, K., y Nadaf, A. (2018). “ γ -Aminobutyric Acid (GABA): Biosynthesis, Role, Commercial Production, and Applications”, en *Studies in Natural Products Chemistry* doi:10.1016/B978-0-444-64057-4.00013-2.
- Role, L. W., y Berg, D. K. (1996). Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron*. doi:10.1016/S0896-6273(00)80134-8.
- Rowley, N. M., Madsen, K. K., Schousboe, A., y Steve White, H. (2012). Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. *Neurochem. Int.* doi:10.1016/j.neuint.2012.02.013.
- Russo, S., y Nestler, E. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 609–625. doi:10.1038/nrn3381.
- Sanchez-Catalan, M.-J., Kaufling, J., Georges, F., Veinante, P., y Barrot, M. (2014). The Antero-Posterior Heterogeneity of the Ventral Tegmental Area. *Neuroscience* 282, 198–216. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.09.025.
- Sartor, C. E., Lessov-Schlaggar, C. N., Scherrer, J. F., Bucholz, K. K., Madden, P. A. F., Pergadia, M. L., et al. (2010). Initial response to cigarettes predicts rate of progression to regular smoking: Findings from an offspring-of-twins design. *Addict. Behav.* doi:10.1016/j.addbeh.2010.03.004.

- Schilström, B., Fagerquist, M. V., Zhang, X., Hertel, P., Panagis, G., Nomikos, G. G., et al. (2000). Putative role of presynaptic $\alpha 7^*$ nicotinic receptors in nicotine stimulated increases of extracellular levels of glutamate and aspartate in the ventral tegmental area. *Synapse*. doi:10.1002/1098-2396(20001215)38:4<375::AID-SYN2>3.0.CO;2-Y.
- Schousboe, A., y Waagepetersen, H. S. (2009). "Gamma-Aminobutyric Acid (GABA)", en *Encyclopedia of Neuroscience* doi:10.1016/B978-008045046-9.00685-9.
- Schultz, W., Dayan, P., y Montague, P. R. (1997). A neural substrate of prediction and reward. *Science* (80-). doi:10.1126/science.275.5306.1593.
- Seguela, P., Wadiche, J., Dineley-Miller, K., Dani, J. A., y Patrick, J. W. (1993). Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain $\alpha 7$: A nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J. Neurosci.* doi:10.1523/jneurosci.13-02-00596.1993.
- Senay, E. C. (1991). Drug abuse and public health. A global perspective. *Drug Saf.*
- Sharma, G., Grybko, M., y 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.
- 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.
- Sher, E., Chen, Y.-H., Sharples, T. J. W., Broad, L. M., Benedetti, G., Zwart, R., et al. (2004). Physiological Roles of Neuronal Nicotinic Receptors Subtypes: New Insights on the Nicotinic Modulation of Neurotransmitter Release, Synaptic Transmission and Plasticity. *Curr. Top. Med. Chem.* 4, 283–297. doi:10.2174/1568026043451393.
- Shih, P. Y., Engle, S. E., Oh, G., Deshpande, P., Puskar, N. L., Lester, H. A., et al. (2014). Differential expression and function of nicotinic acetylcholine receptors in subdivisions of medial habenula. *J.*

Neurosci. doi:10.1523/JNEUROSCI.0476-14.2014.

Shumake, J., Ilango, A., Scheich, H., Wetzell, W., y Ohi, F. W. (2010). Differential neuromodulation of acquisition and retrieval of avoidance learning by the lateral habenula and ventral tegmental area. *J. Neurosci.* doi:10.1523/JNEUROSCI.3604-09.2010.

Slotkin, T. A., Southard, M. C., Adam, S. J., Cousins, M. M., y Seidler, F. J. (2004). $\alpha 7$ Nicotinic acetylcholine receptors targeted by cholinergic developmental neurotoxicants: Nicotine and chlorpyrifos. *Brain Res. Bull.* doi:10.1016/j.brainresbull.2004.07.005.

Smith, R. J., Vento, P. J., Chao, Y. S., Good, C. H., y Jhou, T. C. (2018). Gene expression and neurochemical characterization of the rostromedial tegmental nucleus (RMTg) in rats and mice. *Brain Struct. Funct.* 0, 0. doi:10.1007/s00429-018-1761-7.

Stamatakis, A. M., y Stuber, G. D. (2012). Activation of lateral habenula inputs to the ventral midbrain promotes behavioral avoidance. *Nat. Neurosci.* 15, 1105–1107. doi:10.1038/nn.3145.

Stauderman, K. A., Mahaffy, L. S., Akong, M., Veliçelebi, G., Chavez-Noriega, L. E., Crona, J. H., et al. (1998). Characterization of human recombinant neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit combinations $\alpha 2\beta 4$, $\alpha 3\beta 4$ and $\alpha 4\beta 4$ stably expressed in HEK293 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*

Surmeier, D. J., y Graybiel, A. M. (2012). A feud that wasn't: Acetylcholine evokes dopamine release in the striatum. *Neuron.* doi:10.1016/j.neuron.2012.06.028.

Tuesta, L. M., Chen, Z., Duncan, A., Fowler, C. D., Ishikawa, M., Lee, B. R., et al. (2017). GLP-1 acts on habenular avoidance circuits to control nicotine intake. *Nat. Neurosci.* doi:10.1038/nn.4540.

Van de Kamp, J. L., y Collins, A. C. (1994). Prenatal nicotine alters nicotinic receptor development in the mouse brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* doi:10.1016/0091-3057(94)90293-3.

Wagner, J., y Keizer, J. (1994). Effects of rapid buffers on Ca^{2+} diffusion and Ca^{2+} oscillations. *Biophys. J.* doi:10.1016/S0006-

3495(94)80500-4.

Walls, A. B., Nilsen, L. H., Eyjolfsson, E. M., Vestergaard, H. T., Hansen, S. L., Schousboe, A., et al. (2010). GAD65 is essential for synthesis of GABA destined for tonic inhibition regulating epileptiform activity. *J. Neurochem.* doi:10.1111/j.1471-4159.2010.07043.x.

Wang, B. W., Liao, W. N., Chang, C. T., y Wang, S. J. (2006). Facilitation of glutamate release by nicotine involves the activation of a Ca²⁺/calmodulin signaling pathway in rat prefrontal cortex nerve terminals. *Synapse.* doi:10.1002/syn.20267.

Wasserman, D. I., Wang, H. G., Rashid, A. J., Josselyn, S. a., y Yeomans, J. S. (2013). Cholinergic control of morphine-induced locomotion in rostromedial tegmental nucleus versus ventral tegmental area sites. *Eur. J. Neurosci.* 38, 2774–2785. doi:10.1111/ejn.12279.

Watson, M., Roeske, W., y Yamamura, H. (1987). “Cholinergic receptor heterogeneity: Psychopharmacology: the third generation”, en *Psychopharmacology: The Third Generation of Progress*, ed. H. Meltzer (New York: Raven Press), 241–248. Available at: [https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Psychopharmacology%3A The Third Generation of Progress&publication_year=1987&author=M. Watson&author=W.R. Roeske&author=H.I. Yamamura&authuser=1](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Psychopharmacology%3A+The+Third+Generation+of+Progress&publication_year=1987&author=M.+Watson&author=W.R.+Roeske&author=H.I.+Yamamura&authuser=1) [Consultado marzo 15, 2021].

Whiting, P. J., Liu, R., Morley, B. J., y Lindstrom, J. M. (1987). Structurally different neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes purified and characterized using monoclonal antibodies. *J. Neurosci.* 7, 4005–4016. doi:10.1523/jneurosci.07-12-04005.1987.

Whiting, P., y Lindstrom, J. (1986). Pharmacological properties of immuno-isolated neuronal nicotinic receptors. *J. Neurosci.* 6, 3061–3069. doi:10.1523/jneurosci.06-10-03061.1986.

Whiting, P., Schoepfer, R., Lindstrom, J., y Priestley, T. (1991). Structural and pharmacological characterization of the major brain

nicotinic acetylcholine receptor subtype stably expressed in mouse fibroblasts. *Mol. Pharmacol.*

- Wonnacott, S. (1997). Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci.* 20, 92–98. doi:10.1016/S0166-2236(96)10073-4.
- Woolf, N. J., y Butcher, L. 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.
- Wooltorton, J., Pidoplichko, V., Broide, R., y Dani, J. (2003). Differential desensitization and distribution of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in midbrain dopamine areas. *J. Neurosci.* 23, 3176–3185. Available at: <http://www.jneurosci.org/content/jneuro/23/8/3176.full.pdf>.
- World Health Organization, W. (2019). WHO Report on the Global Tobacco Epidemic, 2019. *World Heal. Organ.*
- Wu, J., George, A. A., Schroeder, K. M., Xu, L., Marxer-Miller, S., Lucero, L., et al. (2004). Electrophysiological, pharmacological, and molecular evidence for $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors in rat midbrain dopamine neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* doi:10.1124/jpet.104.070417.
- Wu, J., y Lukas, R. J. (2011). Naturally-expressed nicotinic acetylcholine receptor subtypes. en *Biochemical Pharmacology* doi:10.1016/j.bcp.2011.07.067.
- Xu-Friedman, M. A., y Regehr, W. G. (2000). Probing fundamental aspects of synaptic transmission with strontium. *J. Neurosci.* doi:10.1523/jneurosci.20-12-04414.2000.
- Yeomans, J. S. (2012). Muscarinic receptors in brain stem and mesopontine cholinergic arousal functions. *Handb. Exp. Pharmacol.* doi:10.1007/978-3-642-23274-9_11.
- Yetnikoff, L., Lavezzi, H. N., Reichard, R. A., y Zahm, D. S. (2014). An update on the connections of the ventral mesencephalic dopaminergic complex. *Neuroscience.* doi:10.1016/j.neuroscience.2014.04.010.

- Zahm, D. S., Becker, M. L., Freiman, A. J., Strauch, S., Degarmo, B., Geisler, S., et al. (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.
- Zhao, C., Eisinger, B., y Gammie, S. C. (2013). Characterization of GABAergic Neurons in the Mouse Lateral Septum: A Double Fluorescence In Situ Hybridization and Immunohistochemical Study Using Tyramide Signal Amplification. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0073750.
- Zhong, C., Talmage, D. A., y Role, L. W. (2013). Nicotine elicits prolonged calcium signaling along ventral hippocampal axons. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0082719.
- Zoli, M., Léna, C., Picciotto, M. R., y Changeux, J. P. (1998). Identification of four classes of brain nicotinic receptors using β mutant mice. *J. Neurosci*. doi:10.1523/jneurosci.18-12-04461.1998.
- Zoli, M., Moretti, M., Zanardi, A., McIntosh, J. M., Clementi, F., y 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.
- Zoli, M., Pistillo, F., y Gotti, C. (2015). Diversity of native nicotinic receptor subtypes in mammalian brain. *Neuropharmacology* 96, 302–311. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.11.003.
- Zucker, R. S., y Regehr, W. G. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol*. doi:10.1146/annurev.physiol.64.092501.114547.

APÉNDICES

Apéndice 1. Referencia del artículo generado con los datos del presente trabajo.

Castillo-Rolón D, Ramírez-Sánchez E, Arenas-López G, Garduño J, Hernández-González O, Mihailescu S and Hernández-López S (2021). Nicotine Increases Spontaneous Glutamate Release in the Rostromedial Tegmental Nucleus. *Front. Neurosci.* 14:604583. doi: 10.3389/fnins.2020.604583



Nicotine Increases Spontaneous Glutamate Release in the Rostromedial Tegmental Nucleus

Diego Castillo-Rolón, Enrique Ramírez-Sánchez, Gabina Arenas-López, Julieta Garduño, Omar Hernández-González, Stefan Mihailescu and Salvador Hernández-López*

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

OPEN ACCESS

Edited by:

M. Foster Olive,
Arizona State University, United States

Reviewed by:

Jiang Hong Ye,
Rutgers University, Newark,
United States
Jonna Jackson,
Arizona State University, United States

*Correspondence:

Salvador Hernández-López
salvadorhl@comunidad.unam.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Neuropharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Neuroscience

Received: 09 September 2020

Accepted: 23 November 2020

Published: 13 January 2021

Citation:

Castillo-Rolón D, Ramírez-Sánchez E, Arenas-López G, Garduño J, Hernández-González O, Mihailescu S and Hernández-López S (2021) Nicotine Increases Spontaneous Glutamate Release in the Rostromedial Tegmental Nucleus. *Front. Neurosci.* 14:604583. doi: 10.3389/fnins.2020.604583

The rostromedial tegmental nucleus (RMTg) is a bilateral structure localized in the brainstem and comprise of mainly GABAergic neurons. One of the main functions of the RMTg is to regulate the activity of dopamine neurons of the mesoaccumbens pathway. Therefore, the RMTg has been proposed as a modulator of the reward system and adaptive behaviors associated to reward learning. The RMTg receives an important glutamatergic input from the lateral habenula. Also, it receives cholinergic inputs from the laterodorsal and pedunculo pontine tegmental nuclei. Previously, it was reported that nicotine increases glutamate release, evoked by electric stimulation, in the RMTg nucleus. However, the mechanisms by which nicotine induces this effect were not explored. In the present work, we performed electrophysiological experiments in brainstem slices to study the effect of nicotine on spontaneous excitatory postsynaptic currents recorded from immunocytochemically identified RMTg neurons. Also, we used calcium imaging techniques to explore the effects of nicotine on multiple RMTg neurons simultaneously. We found that nicotine promotes the persistent release of glutamate through the activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors present on glutamatergic afferents and by a mechanism involving calcium release from intracellular stores. Through these mechanisms, nicotine increases the excitability and synchronizes the activity of RMTg neurons. Our results suggest that the RMTg nucleus mediates the noxious effects of the nicotine, and it could be a potential therapeutic target against tobacco addiction.

Keywords: nicotine, glutamate, synaptic release, calcium imaging, neuronal excitability

INTRODUCTION

The rostromedial tegmental nucleus (RMTg) is a bilateral mesencephalic structure localized posterior to the ventral tegmental area (VTA) and dorsal to the interpeduncular nucleus (IPN) (Perrotti et al., 2005; Jhou et al., 2009b; Sanchez-Catalan et al., 2014). The RMTg receives an important glutamatergic input from the lateral habenula (Jhou et al., 2009b; Kaufling et al., 2009; Lavezzi and Zahm, 2011), as well as cholinergic inputs from the laterodorsal (LDTg) and pedunculo pontine (PPTg) tegmental nuclei (Yeomans, 2012; Wasserman et al., 2013; Yetnikoff et al., 2014). The RMTg has projections to the VTA, substantia nigra compacta (SNc), and the hypothalamus, among other structures (Jhou et al., 2009a,b; Hong et al., 2011; Lavezzi and Zahm, 2011; Bourdy and Barrot, 2012). Most of the RMTg projection neurons ($\approx 72\%$) synthesize

and release γ -aminobutyric acid (GABA) (Perrotti et al., 2005; Kaufling et al., 2010; Gonçalves et al., 2012). These GABAergic neurons have been shown to express specific transcription factors including Sox14, Sox2, and FoxP1 (Lahti et al., 2016). Among them, FoxP1 has been characterized as a reliable neurochemical marker for RMTg neurons in both rats and mice (Lahti et al., 2016; Smith et al., 2018). RMTg neurons projecting to the VTA and SNc also exhibit dense immunoreactivity to μ -opioid and somatostatin receptors (Jhou et al., 2009b). Because of its GABAergic influence, the RMTg exerts inhibitory control over mesolimbic dopamine systems (Jhou et al., 2009b; Hong et al., 2011; Kaufling and Aston-Jones, 2015), and it seems to play a role in reward processes, learning by reinforcement, and motivation behavior (Jhou et al., 2009a; Barrot et al., 2012; Bourdy and Barrot, 2012; Vento et al., 2017).

Several studies have shown that the activation of the RMTg produces aversion and avoidance-like behaviors to stimuli that are normally innocuous. On the opposite, the bilateral lesion of RMTg inhibits anxiety and adaptive behaviors to threatening or harmful stimuli (Jhou, 2005; Jhou et al., 2009a; Stamatakis and Stuber, 2012). Dysfunction of this nucleus could be associated with diverse pathologies such as anxiety and drug addictions (Jhou et al., 2013; Glover et al., 2019). Nicotine is one of the drugs of abuse most commonly used whose effects in the RMTg have been studied. It has been reported that nicotine increased the amplitude of excitatory postsynaptic currents (EPSCs) evoked by electrical stimuli and that this effect was blocked by an $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) antagonist (Lecca et al., 2012). However, the effect on spontaneous glutamate release and the action mechanisms of nicotine have not been explored with detail in this nucleus. In the present work, we studied the effects of nicotine on spontaneous glutamate release by measuring spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs) recorded from identified RMTg GABAergic neurons, and we determined the calcium mechanisms involved in those effects. By using calcium imaging, we also studied the effect of nicotine on the excitability of RMTg neurons. We found that nicotine increases the frequency and the amplitude of sEPSCs through the activation of presynaptic $\alpha 7$ but not $\alpha 4\beta 2$ nAChRs at glutamatergic terminals. These effects were dependent on calcium release from intracellular stores. Local application of acetylcholine (ACh) on RMTg neurons failed to produce nicotinic receptor-mediated currents discarding the presence of postsynaptic nAChRs. Our experiments also showed that nicotine promotes long-lasting glutamate release and synchronized firing of RMTg neurons. Our data confirm that nicotine activates the aversive system represented by the lateral habenula LHb and the RMTg nucleus.

MATERIALS AND METHODS

Slices Preparation

All experiments were carried out following the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the Institutional Animal Care Committee of the Universidad Nacional Autónoma de México.

The experiments were performed in young male Wistar rats (25–30 postnatal days). Animals were anesthetized intraperitoneally with ketamine-xylazine (85–15 mg/kg) and then decapitated. Their brains were quickly removed and placed into ice-cold (4°C) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) consisting of (in mM) 125 NaCl, 3 KCl, 25 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 1 MgCl₂, 1.2 CaCl₂, and 25 glucose, 300 mOsm/L, pH 7.3 by bubbling with 95% O₂–5% CO₂. Coronal midbrain slices (250 μ m thick) containing the RMTg nucleus were obtained with a vibratome (Pelco 102; Ted Pella, Inc) and stored in oxygenated ACSF at room temperature for at least 1 h before recordings.

Whole-Cell Recordings

Individual slices were transferred into a custom-made Plexiglas recording chamber and superfused with ACSF at a rate of 4–5 mL/min. The temperature was maintained at 33°C with an in-line solution heater (TC-324B; Warner Instruments). RMTg GABAergic neurons were visualized by using an infrared video microscopy system (BX51WI; Olympus Instruments, Japan) fitted with an 80 \times water-immersion objective. Whole-cell current-clamp and voltage-clamp recordings were performed with a Multiclamp 700B amplifier (Molecular Devices, LLC). Data were digitized by using a Digidata 1440A analog to digital converter (Molecular Devices, LLC) at a sampling rate of 5 kHz and stored in a personal computer running Clampex 10 software (Molecular Devices, LLC). Only one cell was recorded per brain slice. The recording electrodes were made from borosilicate glass tubes (WPI, Sarasota, FL) with a Flaming-Brown puller (Sutter Instruments, Novato, CA). The impedance of the electrodes varied between 4 and 7 M Ω . The internal solution consisted of (in mM) 140 K-gluconate, 5 NaCl, 1 MgCl₂, 0.02 EGTA, 10 HEPES, 2 Mg₂-ATP, 0.5 Na₂GTP, and 0.3% biocytin, pH 7.2–7.3, with Trizma base, 280–300 mOsm/L. In an experimental group, we added 1-2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N,N-tetraacetic acid (BAPTA) (10 mM) in the same internal solution with 130 mM K-gluconate (**Figure 5A**). Each recorded cell was first identified based on its electrophysiological characteristics by generating a stimulus–response relationship in current-clamp mode. sEPSCs were recorded continuously in whole-cell voltage-clamp mode at a holding potential of -70 mV. All experiments were made in the presence of gabazine or bicuculline (10 μ M) to block GABA_A receptors. Access resistance was monitored by using depolarizing step pulses of 5 mV and 50 ms duration. When access resistance varied > 15%, the experiment was discarded. One limitation in our experiments is the space clamping because in slice recordings it is impossible to reach a good voltage clamping in cell areas remote from the soma, for instance, the dendrites. However, the RMTg neurons have a small average size (\approx 17 μ m diameter), which allows a good voltage clamping in the soma, and in general, the recordings of sEPSCs were stable during the experiments.

Calcium Imaging

These methods have been described before (Carrillo-Reid et al., 2008; Garduño et al., 2019). Briefly, slices containing the RMTg nucleus were incubated in the dark for 25–30 min at 27°C with 10 μ M of fluo 4 AM (Invitrogen, Life Technologies)

in 0.1% dimethyl sulfoxide and dissolved in the same ACSF solution. The cells were visualized by using an Eclipse FN-1 microscope (Nikon) equipped with a 16 × water-immersion objective. The image field visualized was 280 × 260 μm size. The fluorophore was stimulated with light pulses at 488-nm wavelength (15–25 ms exposure time) delivered with a Lambda HPX-L5 lamp (Sutter Instruments) connected to the microscope by optic fiber. Image sequences or videos were acquired at a frequency of 4 frames/s (250 ms/frame) by using a digital camera (Cool SNAP MYO, Photometrics) and a custom-made software designed in the LabView environment (Im-Patch) (Pérez-Ortega et al., 2016). Videos lasted 6 min (1,440 frames). Active cells were selected in each video by using a circular template of variable size (4–30 μm), and a coordinates map of active neurons was automatically generated from the summary image by using Im-Patch software (Pérez-Ortega et al., 2016). The intracellular calcium signals (calcium transients) from each region of interest were collected over time. Calcium-dependent fluorescence signals were computed as $(\Delta F/F)$, where ΔF is fluorescence intensity at any frame, and F is resting fluorescence. Calcium transients and their first derivative were taken as indicators of cell firing (Carrillo-Reid et al., 2008). Only transient events with amplitudes 2.5 times above the standard deviation of the noise were considered for analysis. From calcium transients, a binary matrix of ones and zeros was built for each experiment, in which each row belongs to an active cell and each column to a frame, where 1 indicates an active and 0 an inactive frame for each neuron. The y -axis in the matrix represents the number of active neurons, and the x -axis represents the number of image frames in a video. Matrices were used to generate raster plot graphs that illustrated the activity of all the cells along with the experiment. The summed activity was graphed below the raster plot in a form of a histogram (coactivity histogram) (Carrillo-Reid et al., 2008). Monte Carlo simulations (1,000) were used to find the significance of neurons being active together (Carrillo-Reid et al., 2008, 2011; Pérez-Ortega et al., 2016; Lara-González et al., 2019). MATLAB was used to analyze the activity of individual cells along with the different conditions as described in Aparicio-Juárez et al. (2019).

Drug Administration

All drugs were dissolved into the ACSF from daily made stock solutions and administered at a 4 mL/min speed by using a gravity-driven superfusion system. A complete experiment consisted of three stages: a control recording period, the drug administration, and an additional recording period after the drug washout. Each of these stages was taken for analysis. The control recordings consisted of 10–15 min to allow the stabilization of sEPSC frequency. This control was taken in the presence of GABA_A receptors blockers (gabazine or bicuculline). In the drug administration stage, nicotine, eserine, or nAChRs agonists were added to the perfusion fluid for 8–10 min. After the drug washout, an additional recording period of at least 30 min was taken. In those experiments where nAChRs antagonists, tetrodotoxin (TTX), or calcium-channel blockers were used, the drug was administered for at least 10 min, and its effects on sEPSCs were recorded.

Afterward, nicotine was added to the perfusion fluid for 8–10 min, and a final 30–40 min recording period was taken after nicotine washout. TTX, atropine, 6-cyano-2,3-dihydroxy-7-nitroquinoxaline (CNQX), SR-95531 (gabazine), (-)-bicuculline methiodide, methyllycaconitine (MLA), dihydro-β-erythroidine hydrobromide (DHβE), BAPTA, BAPTA-AM, cadmium chloride (CdCl₂), and biocytin were purchased from Sigma–Aldrich/RBI (St Louis, MO). Thapsigargin, ryanodine, cyclopiazonic acid (CPA), (E)-N-methyl-4-(3-pyridinyl)-3-buten-1-amine oxalate (RJR-2403 oxalate), and N-(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl-4-chlorobenzamide (PNU-282987) were purchased from Tocris Bioscience (Ellisville, MO).

Local Administration of ACh

Local applications of ACh (1 mM) on RMTg or the VTA neurons were made by using a microinjector (IM 300, Narisihige Comp., Japan) coupled to a fine-tip glass micropipette placed about 50 μm above the recorded neuron. Brief “puffs” of ACh (2–5 psi, during 500 ms) were applied in the presence of atropine (5 μM) and TTX (1 μM) to eliminate the muscarinic component of the response and avoid indirect effects (Galindo-Charles et al., 2008). Intervals of 3–5 min were left between each ACh administration to avoid desensitization of the nicotinic receptors (Wooltorton et al., 2003).

Immunocytochemistry

A combination of intracellular labeling and GAD_{65/67} or FoxP1 immunocytochemistry was used to identify RMTg recorded neurons. Neurons were filled with biocytin dissolved in the internal solution. At the end of the experiment, the slices containing recorded neurons were fixed for 48 h with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4). The slices were then washed twice with PBS, put into a 30% sucrose solution at 4°C overnight, and cut into coronal sections (40 μm thick) with a vibratome. Then, the sections were incubated for 24 h in a PBS solution containing 0.25% Triton X-100 and streptavidin conjugated to Cy3 (Invitrogen, Carlsbad, CA, dilution 1:200) to label the recorded cell. The sections were rinsed in PBS and incubated for 18–24 h with primary antibodies. We used the anti-GAD_{65/67} antibody produced in rabbit (Sigma–Aldrich, dilution 1:1,000) and rabbit anti-FoxP1 (Sigma–Aldrich, dilution 1:1,000) in blocking solution. Afterward, sections were washed three times with PBS and reincubated with a secondary antibody conjugated to fluorescein (Vector Laboratories, Burlingame, CA, dilution 1:200) for 30 min at room temperature. Reacted sections were washed three times for 10 min in PBS, mounted in an anti-quenching medium (Vectashield, Vector Laboratories), and examined under a confocal microscope (MRC 1024, Bio-Rad, Natford, United Kingdom) equipped with a krypton/argon laser. A two-line laser emitting at 550 and 500 nm wavelength was used for exciting Cy3 and fluorescein, respectively. Digitized images were transferred to a personal computer by using the image-capturing software (Confocal Assistant, T. C. Brelje, Minneapolis, MN). The omission of primary antisera resulted in no detectable signal (data not shown).

Data Analysis

Offline analysis of the data was performed using Clampfit 10.2 (Molecular Devices), Mini Analysis (Synaptosoft, Decatur, GA), and graphing and statistical software packages (Origin 8, OriginLab, Northampton, MA; and GraphPad Prism 6, San Jose CA, United States). MiniAnalysis software was used to detect and analyze sEPSCs. Initially, a noise analysis was conducted for each recorded cell, and detection thresholds were set to exceed noise values. For each recorded cell, 10 s bin sEPSCs or mEPSC frequency histograms were constructed, and then all the cells of each experimental group were averaged. The changes in sEPSC frequency or amplitude produced by drug administration were expressed as values normalized to the baseline (“control”) for each experimental group. We took 5 min of the maximal effect as the window of analysis for statistical comparisons. Upon small samples, we used the Mann–Whitney *U* and Friedman tests. To compare distributions, we used the Kolmogorov–Smirnov test. The data are expressed as means \pm SEM. For each experimental group, a minimum of five cells was recorded. $P < 0.05$ was taken as statistically significant.

RESULTS

We recorded 121 RMTg cells, which were first identified as being GABAergic neurons based on their electrophysiological properties: high spontaneous firing rate (≈ 17 Hz), a biphasic and brief action potential (duration < 1.5 ms), and short after-hyperpolarizing-potential duration (Jhou et al., 2009b; Lecca et al., 2011). During the recording experiments, RMTg neurons were filled with biocytin dissolved in the internal solution. After the experiments, they were identified by immunocytochemistry by using anti-GAD_{65/67} or anti-FoxP1, two of the main markers of the RMTg neurons (Jhou et al., 2009b; Lahti et al., 2016; Smith et al., 2018). Eighty of 121 cells were immunocytochemically identified. From these neurons, 33 were FoxP1-positive, and 47 were GAD-positive. The data reported here are from all the responsive cells independently if they were immunocytochemically identified or not. A cell was taken as responsive when there was a statistically significant change, with respect to the baseline, within the 10 min after the drug administration.

Nicotine Increased the Frequency and Amplitude of sEPSCs Recorded From GABAergic RMTg Neurons

The nicotine-evoked increases in frequency and amplitude of sEPSCs were observed in 15/19 GABA-positive recorded cells. RMTg neurons were identified based on their firing features (Figure 1A); sEPSCs were recorded in voltage-clamp mode from a holding potential of -70 mV (Figure 1B). All the experiments were made in the presence of bicuculline ($10 \mu\text{M}$). The bath application of nicotine ($1 \mu\text{M}$) increased the sEPSC frequency by $172\% \pm 3.9\%$ with respect to the baseline (Mann–Whitney *U*-test, $p = 0.0014$, $n = 15$), and this effect persisted for about 25–30 min after the drug washout (Figures 1B–D, top). Besides

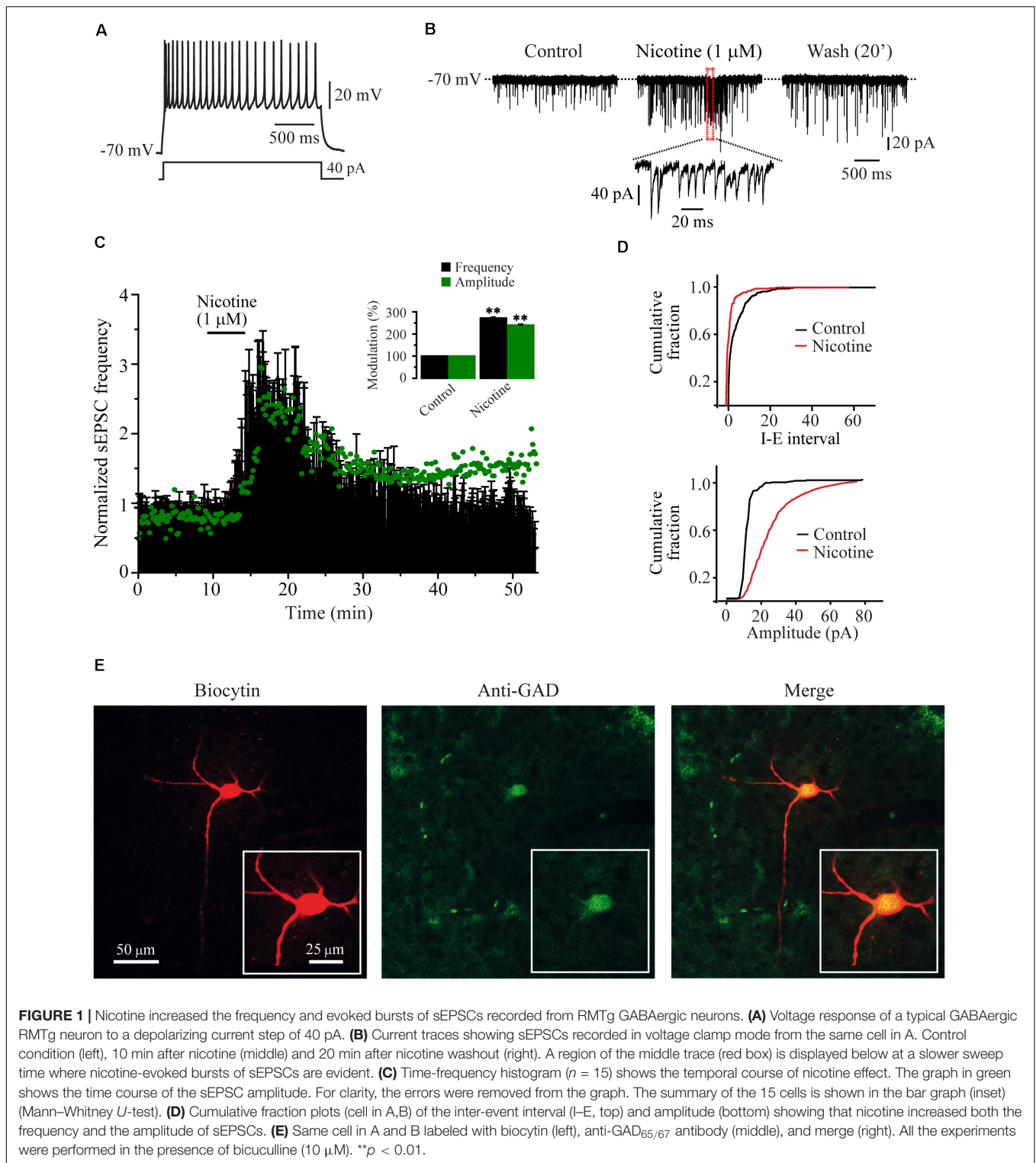
the frequency, nicotine increased the amplitude of the sEPSCs. The time course of the average change in amplitude is shown in Figure 1C (green dots). The inset graph shows the frequency and amplitude increase. The amplitude increase was $140.3\% \pm 3.8\%$ compared to the baseline. Figure 1D (bottom) shows the cumulative fraction of the sEPSC amplitudes for the cell in A and B (two-sample Kolmogorov–Smirnov test, $p = 0.0001$). The effect on the amplitude suggests a possible postsynaptic effect (Zucker and Regehr, 2002; Garduño et al., 2012). Previously, it was reported that nicotine can evoke bursts of sEPSCs. This bursting activity is important because it suggests a synchronized release of glutamate from the terminals (Sharma and Vijayaraghavan, 2003; Sharma et al., 2008). In this work, a burst was defined as a short period of time 50–150 ms, where the frequency of synaptic events exceeded 50% of the frequency observed in the baseline. We found that nicotine evoked bursts of sEPSCs in 93% of the recorded cells (Figure 1B inset). In six experiments, CNQX ($10 \mu\text{M}$), an antagonist of AMPA/kainate receptors, was applied after nicotine washout. In all the recorded cells, CNQX completely abolished sEPSCs, demonstrating their glutamatergic nature (not shown). The recordings shown in Figures 1A,B belong to the GAD_{65/67}-positive cell illustrated in Figure 1E.

Endogenous ACh Mimicked the Effects of Nicotine

The action potential dependence of the nicotinic effect was tested in six cells by adding TTX (500 nM) to the bath. In the presence of TTX, nicotine ($1 \mu\text{M}$) still enhanced the frequency of mEPSCs (Figures 2A,B). mEPSC frequency was increased by $89.7\% \pm 5.6\%$ with respect to the baseline (Mann–Whitney *U*-test, $p = 0.0021$, $n = 6$) and the amplitude ($56.5\% \pm 1.2\%$) (Figure 2F and Supplementary Figure 1), indicating that the nicotinic effect is independent of the action potential. To investigate if endogenous ACh had the same effect as nicotine, we applied eserine ($10 \mu\text{M}$), an acetylcholinesterase inhibitor. Eserine increased the sEPSC frequency in eight RMTg recorded cells (Figures 2C–E left,F), and the effect was also persistent as shown for nicotine. sEPSC frequency increased by $107.4\% \pm 17.8\%$ with respect to the baseline (Mann–Whitney *U*-test, $p = 0.0016$). The amplitude increase was $37\% \pm 1.5\%$ (Figures 2D green dots and F), suggesting that endogenous ACh is tonically regulating glutamate release in the RMTg nucleus. Figure 2E (right) shows the increase in the sEPSC amplitude of the cell in C (two-sample Kolmogorov–Smirnov test, $p = 0.001$). The recording shown in Figure 2C belongs to a cell that was positive to FoxP1, another marker of RMTg neurons (Lahti et al., 2016; Figure 2G).

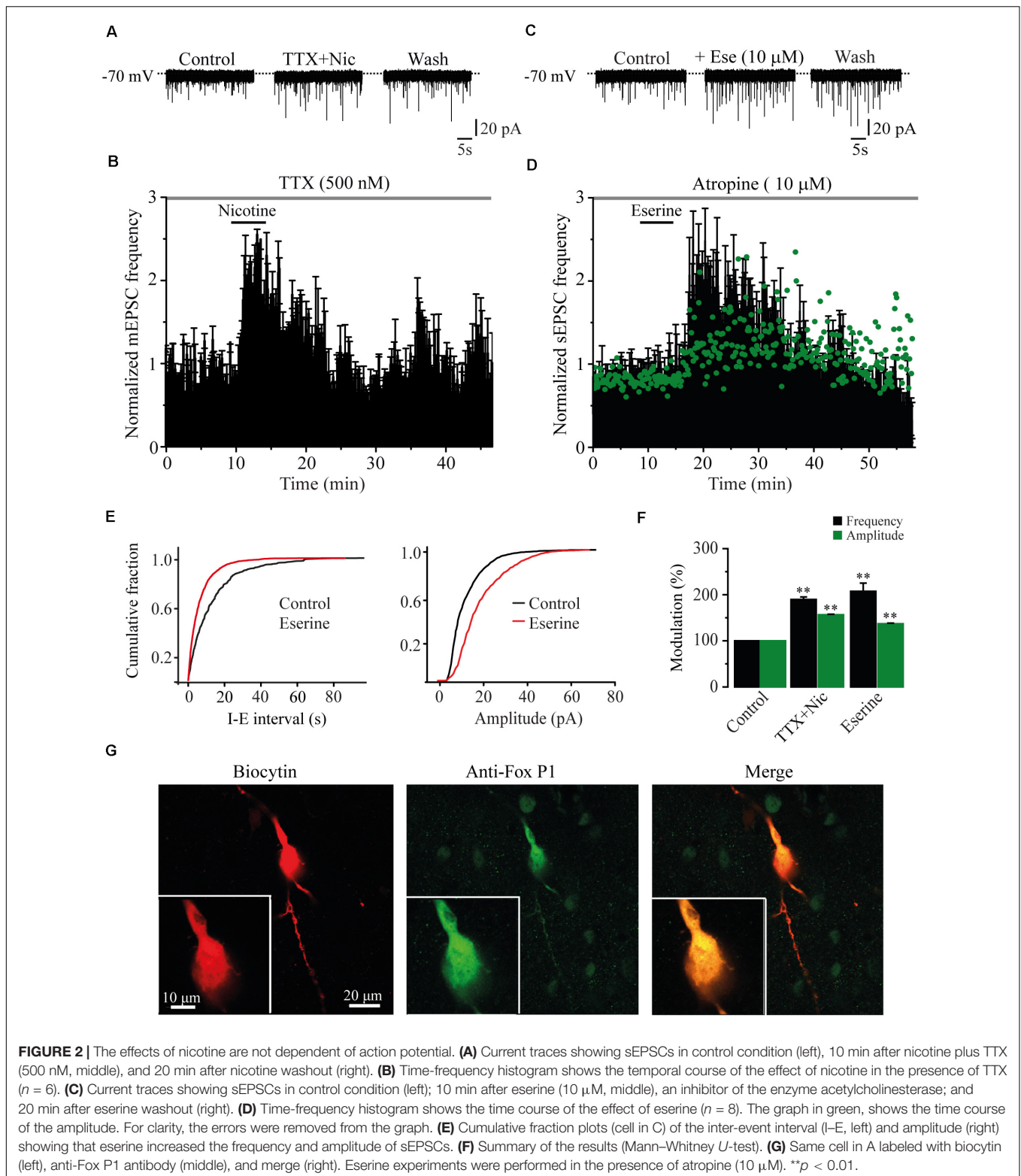
The Effects of Nicotine Were Mediated Through $\alpha 7$ nAChRs

It is well known that the $\alpha 4\beta 2$ and the $\alpha 7$ subtypes are the most commonly expressed nAChRs in the CNS (Whiting and Lindstrom, 1986). To identify which subtype of nAChRs was mediating the effects of nicotine, we tested the selective nAChRs antagonists MLA and DH β E. Blocking the $\alpha 7$ nAChRs with MLA (100 nM) in six cells completely suppressed the effect of nicotine



on sEPSC frequency (**Figures 3A,B,E**). At this concentration, MLA did not produce any significant effect by itself, but it blocked the nicotinic effects ($91\% \pm 6.9\%$ with respect to the baseline, **Figure 3E**) (Mann-Whitney U -test, $p = 0.1752$, $n = 6$). MLA also blocked the increase in sEPSC amplitude induced by nicotine

(**Figure 3E** and **Supplementary Figure 2A**). In contrast, in the presence of DH β E (100 nM), an antagonist of the $\alpha 4\beta 2$ nAChRs, nicotine increased both the frequency and amplitude of sEPSCs in six cells. The sEPSC frequency increased by $172\% \pm 11.2\%$ with respect to the baseline, and the effect persisted for more



than 30 min after nicotine washout (**Figures 3C–E**) (Mann-Whitney U -test, $p = 0.001$, $n = 6$). The amplitude increase was $86\% \pm 4.8\%$ (**Figure 3E** and **Supplementary Figure 2B**). To further investigate the identity of the nAChR subtype involved

in nicotine-induced glutamate release, we used $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nAChRs-selective agonists. The selective $\alpha 7$ nAChR agonist, PNU-282987 (100 nM), mimicked the effect of nicotine as it increased the frequency in six cells (**Figures 4A,B,E**). The

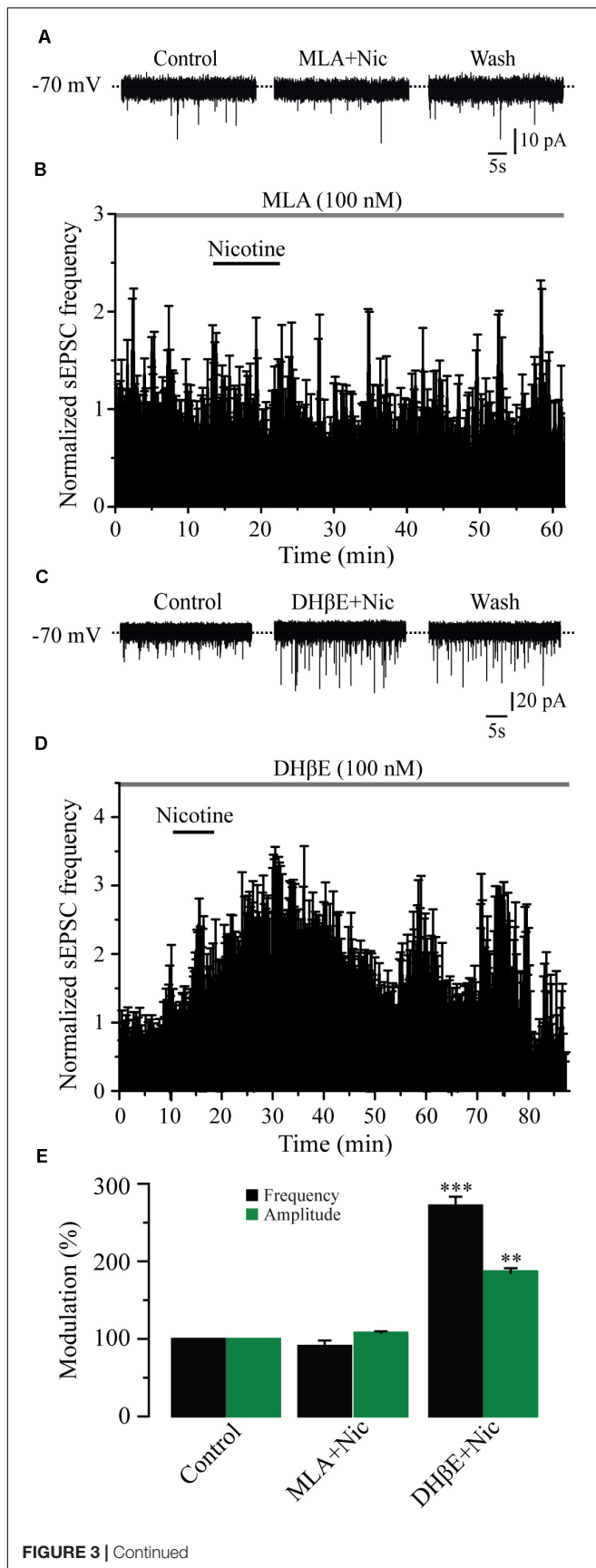


FIGURE 3 | Nicotine effects are mediated through $\alpha 7$ but not $\alpha 4\beta 2$ nAChRs. **(A)** Current traces showing that MLA (100 nM), a selective antagonist of the $\alpha 7$ nAChRs, completely blocked the effects of nicotine on sEPSCs, control condition (left), 10 min after nicotine plus MLA (middle), and nicotine washout (right). **(B)** Normalized time-frequency histogram showing the lack of effect of nicotine in the presence of MLA ($n = 6$). **(C)** Current traces showing that DH β E (100 nM), a selective antagonist of the $\alpha 4\beta 2$ nAChRs did not block the effect of nicotine on sEPSCs. **(D)** Normalized time-frequency histogram showing that nicotine increased the frequency of sEPSCs in the presence of DH β E ($n = 6$). **(E)** Bar graph illustrating a summary of the data (Mann–Whitney U -test). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

frequency increase produced by PNU was $130\% \pm 23.9\%$ with respect to the baseline, and it was statistically significant (Mann–Whitney U -test, $p = 0.0013$, $n = 6$). The amplitude increase was $110.4\% \pm 5.6\%$ (Figure 4E and Supplementary Figure 3A). Conversely, the selective $\alpha 4\beta 2$ nAChR agonist RJR-2403 (100 nM) did not change the sEPSC frequency or amplitude in any of the six GABAergic-positive recorded cells (Figures 4C–E and Supplementary Figure 3B). These data suggest that nicotine regulates glutamate release by activating $\alpha 7$ but not $\alpha 4\beta 2$ nAChRs in the glutamatergic terminals of the RMTg nucleus.

Nicotine Increased EPSCs Frequency and Amplitude by Presynaptic Mechanisms

As nicotine and the $\alpha 7$ nAChR agonist increased not only the frequency but also the amplitude of sEPSCs, it is possible that these drugs activated postsynaptic nAChRs. To test this possibility, we buffered the postsynaptic calcium by loading the patch pipette with an internal solution containing BAPTA (10 mM) in five cells. It was observed that intracellular BAPTA had no effect on spontaneous synaptic activity and did not prevent the effects of nicotine on sEPSCs. In these conditions, nicotine increased sEPSC frequency by $133\% \pm 4.2\%$ with respect to the baseline (Figures 5A,C) (Mann–Whitney U -test, $p = 0.0018$, $n = 5$). As expected, sEPSC amplitude was also increased ($40\% \pm 2\%$) (Figure 5C and Supplementary Figure 4A). On the other hand, nicotine did not have any effect on the frequency or the amplitude of sEPSCs when the slices were perfused for 30 min with the membrane-permeable calcium-chelator BAPTA-AM (10 mM) in six recorded cells (Figures 5B,C and Supplementary Figure 4B). To further discard the presence of postsynaptic nAChRs, we locally applied ACh onto 20 RMTg neurons recorded in voltage-clamp mode at a holding potential of -70 mV. Brief (500 ms) “puffs” of ACh (1 mM) were applied by using a glass micropipette located on top of the recorded cell (see section “Materials and Methods”). These experiments were performed in the presence of atropine (5 μ M) and TTX (1 μ M) to block muscarinic receptors and discard indirect effects, respectively. ACh did not evoke inward currents in any of the 20 RMTg recorded cells (Figure 5D, left). In contrast, in three of four VTA neurons, in which the presence of nAChRs was previously reported (Wooltorton et al., 2003), “puffs” of ACh evoked fast and slow inward currents (Figure 5D, right). The fast component exhibited a high amplitude and short decay time and

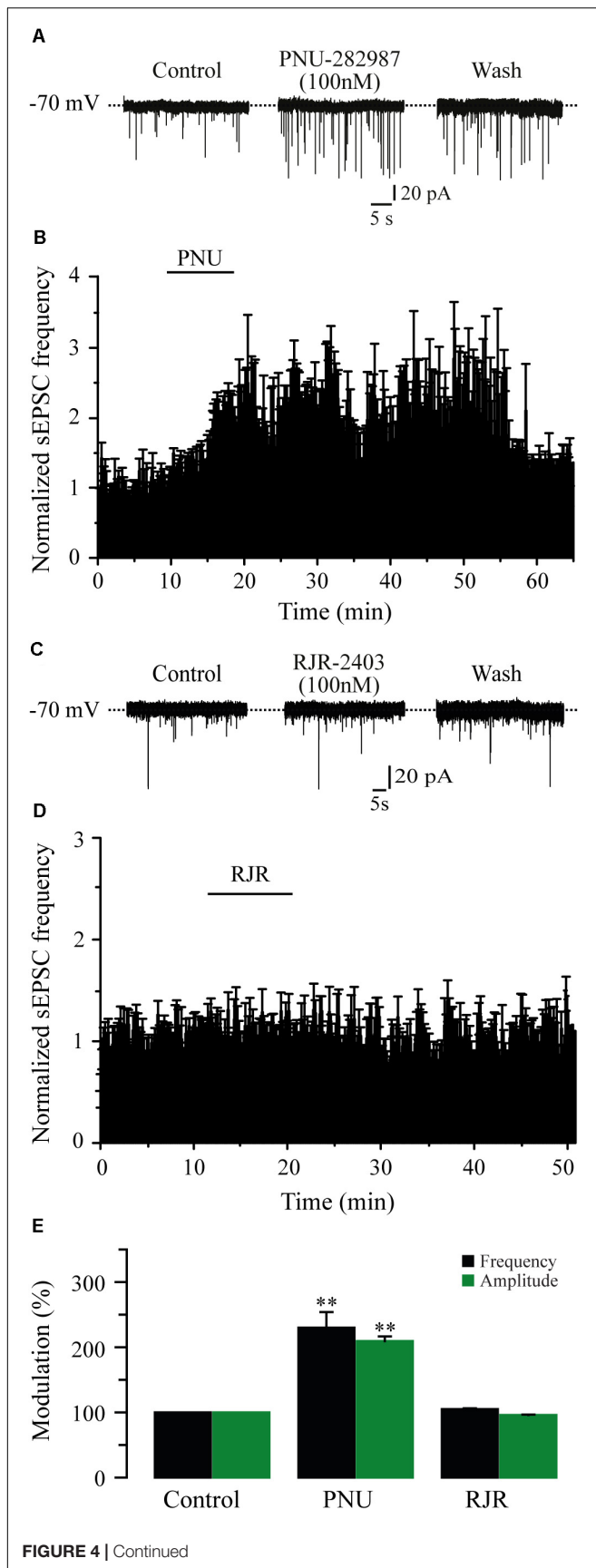


FIGURE 4 | The activation of $\alpha 7$ nAChRs with a selective agonist mimicked the effect of nicotine. **(A)** Current traces showing sEPSCs in control condition (left), 10 min after the application of PNU-282987, a selective agonist of $\alpha 7$ nAChRs (PNU 100 nM, middle), and 20 min after PNU washout (right). **(B)** Time-frequency histogram showing the time course of PNU effects ($n = 6$). **(C)** Current traces showing sEPSCs in control condition (left), 10 min after the application of RJR-2403, a selective agonist of the $\alpha 4\beta 2$ nAChRs (RJR 100 nM, middle), and 20 min after RJR washout (right). **(D)** Normalized time-frequency histogram showing the lack of effect of RJR ($n = 6$). **(E)** Summary of the data (Mann-Whitney U -test). ** $p < 0.01$.

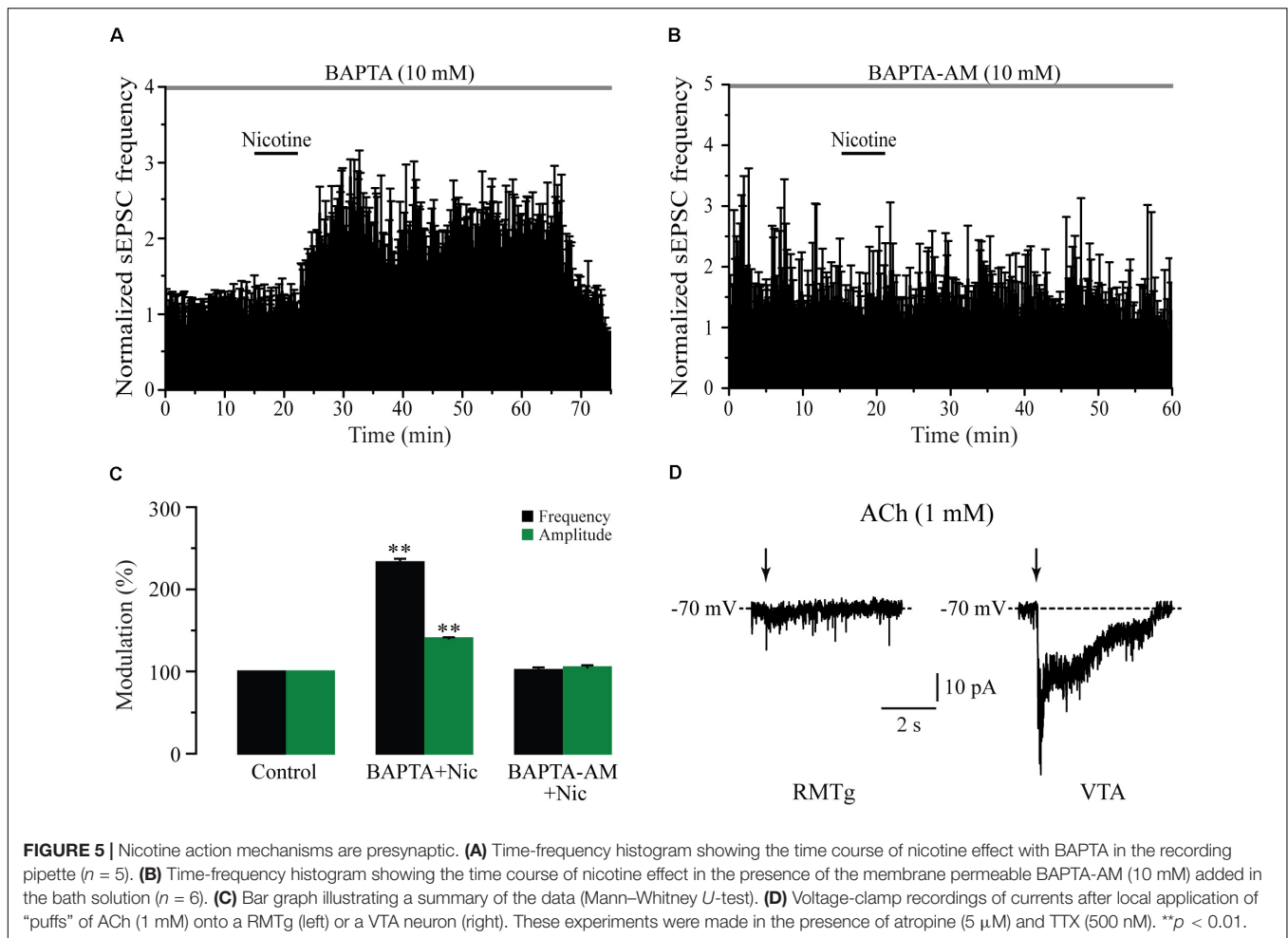
is mediated by $\alpha 7$ nAChRs. The other component, with smaller amplitude and slower kinetic, corresponds to an inward current mediated by $\alpha 4\beta 2$ nAChRs (Pidoplichko et al., 1997; Klink et al., 2001; Wooltorton et al., 2003; Wu et al., 2004). Taken together, these results support the idea that nicotinic effects are presynaptic and mediated through the activation of $\alpha 7$ nAChRs located at glutamate terminals in the RMTg nucleus.

Nicotine-Induced Synaptic Potentiation Depends on Intracellular Calcium Stores

Previously, it has been shown that nicotine-induced glutamate release involves a calcium-induced calcium release (CICR) mechanism acting through either $\alpha 7$ (Sharma and Vijayaraghavan, 2003; Sharma et al., 2008) or $\beta 2$ subunit-containing nAChRs (Dajas-Bailador et al., 2002; Dickinson et al., 2008; Garduño et al., 2012). To explore this issue, we used thapsigargin (six cells) and CPA (six cells), two blockers of the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase pump (SERCA). In the presence of thapsigargin (10 μM) or CPA (10 μM), nicotine did not change the sEPSC frequency or the amplitude with respect to the blocker alone, taken as the control (**Figures 6A,B,D** and **Supplementary Figures 5A,B**) (Mann-Whitney U -test, $p = 0.1530$, $n = 6$). We also explored the involvement of voltage-gated calcium channels (VGCCs) by testing the effect of nicotine in the presence of cadmium (CdCl_2 , 100 μM) in seven cells. In the presence of cadmium, nicotine still increased the sEPSC frequency in all the recorded cells by $251\% \pm 24\%$ (**Figures 6C,D**) (Mann-Whitney U -test, $p = 0.0001$, $n = 7$), a value that is much higher when compared with the effect of nicotine alone. This could be explained by a potentiation of nAChRs produced by cadmium (Hsiao et al., 2001; Garduño et al., 2012). As observed before, nicotine also increased the sEPSC amplitude by $173.2\% \pm 4\%$ with respect to the baseline (see **Supplementary Figure 5C**). These data indicate that nicotine-induced synaptic potentiation of glutamate release requires calcium from intracellular stores of glutamatergic afferents and does not depend on calcium influx through VGCCs.

Nicotine Synchronized Glutamate Release in the RMTg Nucleus

Previously, it was reported that nicotine may synchronize the release of glutamate in other cells (Sharma and Vijayaraghavan, 2003; Sharma et al., 2008). To test this idea, we replaced 90% of calcium with the divalent cations, strontium (6 cells), or barium (6 cells) in the external solution to desynchronize synaptic release

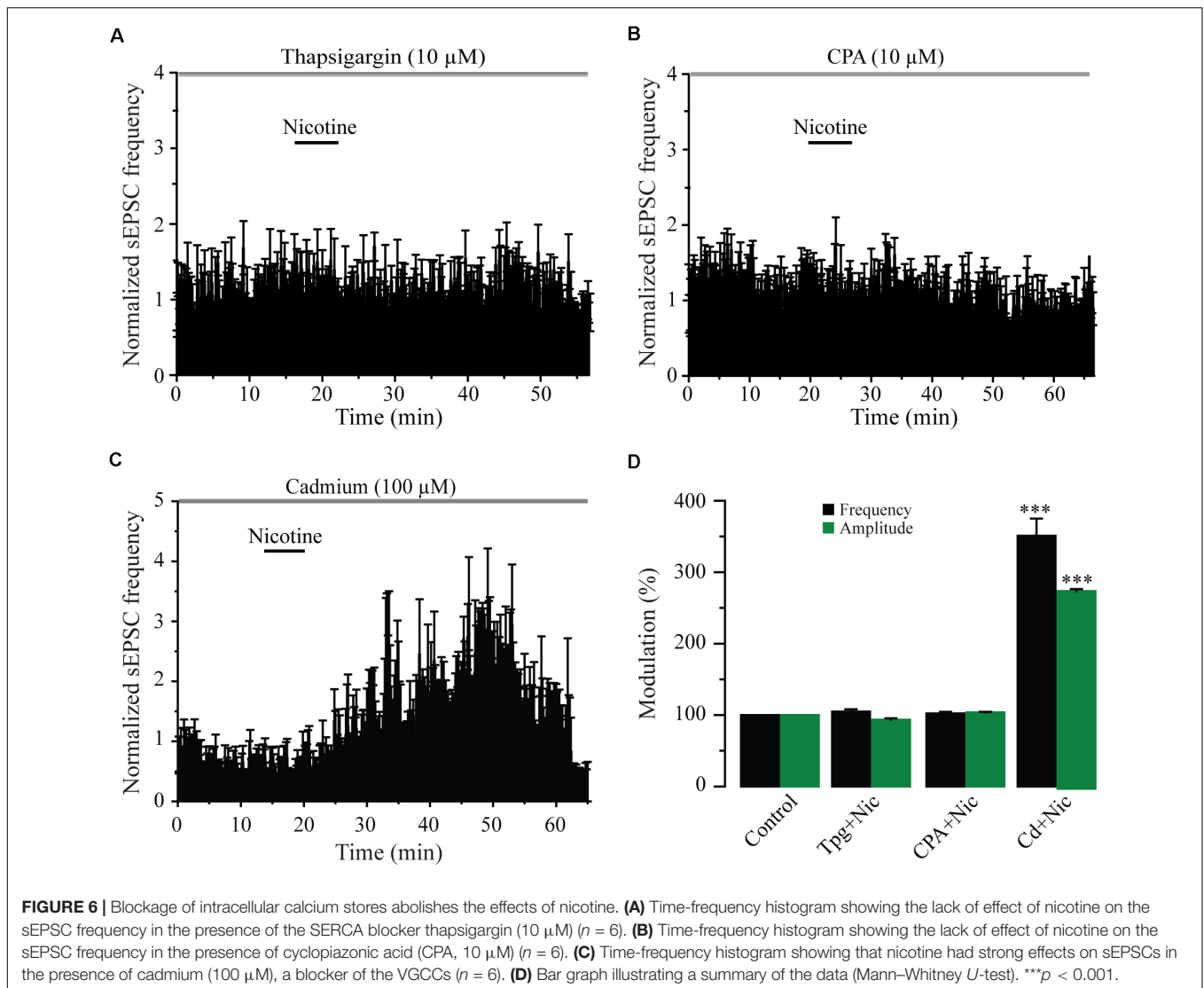


(Léna and Changeux, 1997; Xu-Friedman and Regehr, 2000; Good and Lupica, 2009). Immediately after the nicotine effect was patent, the normal calcium external solution was substituted by a strontium external solution (see section “Materials and Methods”). As expected, for a normal external solution, nicotine increased the frequency and amplitude of sEPSCs. However, when strontium was added, a decrease in the amplitude of sEPSCs was noticed (**Figure 7A**). The bar graph (**Figure 7B**), shows the sEPSC frequency normalized to the control. Clearly, nicotine and the divalent cations increased the sEPSC frequency with respect to the control. The frequency increments were as follows: $176\% \pm 14\%$, $139\% \pm 6\%$ ($n = 6$), and $152\% \pm 10\%$ ($n = 6$), for nicotine, strontium, and barium, respectively (Mann–Whitney U -test, $p = 0.0017$). Besides, it was observed that strontium and barium produced a small but statistically significant reduction of the sEPSC frequency when compared to nicotine (Mann–Whitney U -test, $p = 0.035$, $n = 6$). **Figure 7C** illustrates an amplitude histogram where the control (dark gray) and the nicotine (red) represent the amplitude distributions in normal calcium external solution. Nicotine shifted the distribution of the amplitudes to the right. When calcium was replaced with strontium (light gray), the amplitude distribution was shifted to the left, toward the control. sEPSC amplitude increments, with

respect to the baseline, were $139.7\% \pm 2.4\%$, $107.7\% \pm 1.7\%$ ($n = 6$), and $89.9\% \pm 1.7\%$ ($n = 6$) for nicotine, strontium, and barium, respectively. Nicotine was statistically different from both strontium and barium (two-sample Kolmogorov–Smirnov test, $p = 0.047$, $n = 6$). **Figure 7D** shows current traces of an individual neuron after 10 min of nicotine application (top) followed by strontium (bottom). As previously shown, nicotine not only increased the frequency and the amplitude but also caused bursts of sEPSCs. **Figure 7D** (top) shows bursting activity (arrows) with a frequency of about 47 Hz compared to the control frequency before nicotine, which was 3.5 Hz (not shown). It was observed that after adding the strontium external solution, the bursting activity was abolished (**Figure 7D** bottom) while the frequency remained high.

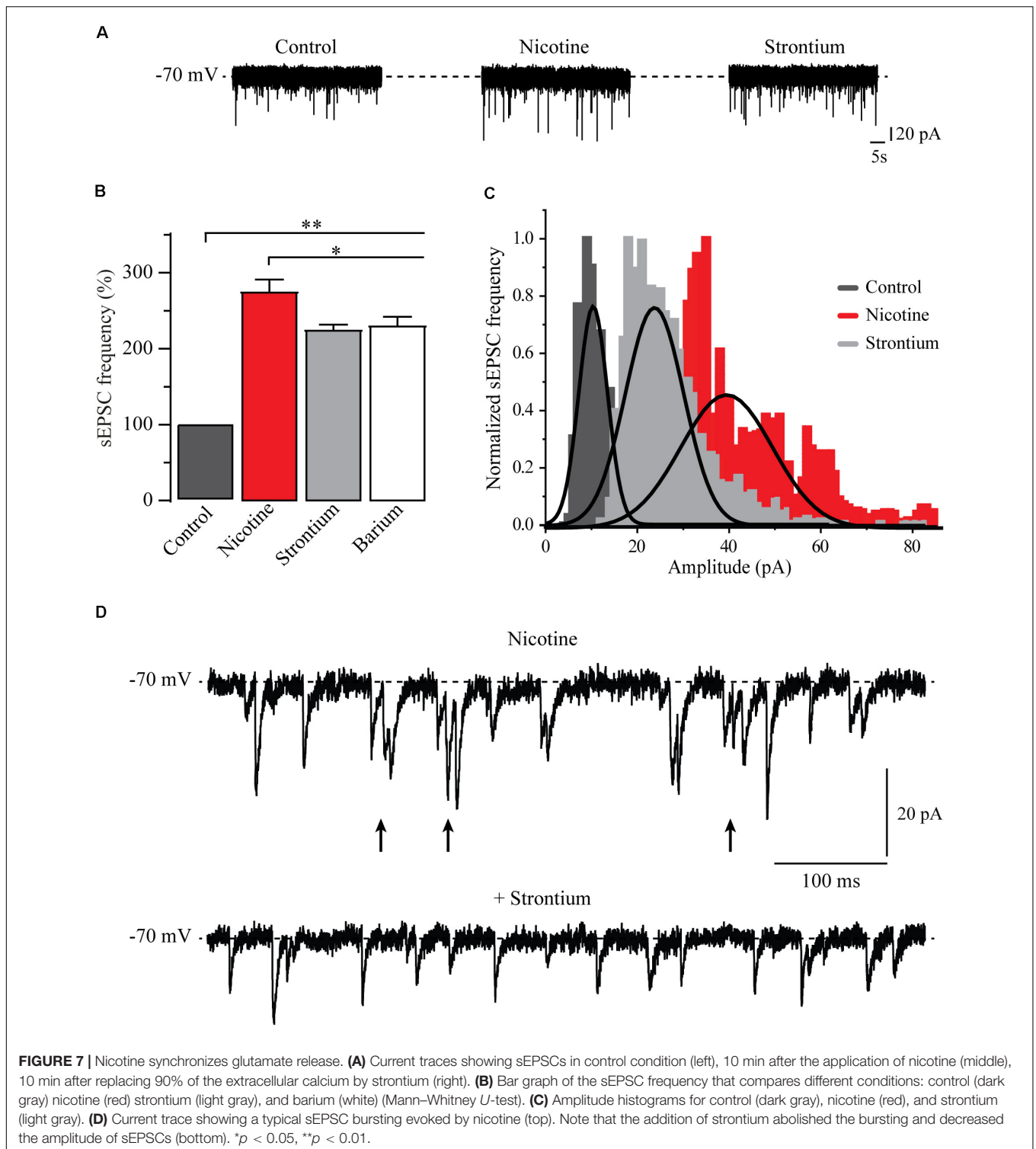
Nicotine Increased the Activity of RMTg Neurons, and the Effect Was Blocked by MLA

We performed calcium imaging experiments to explore the effect of nicotine on the activity of multiple cells simultaneously in the RMTg nucleus. A schematic drawing of a coronal slice is shown in **Figure 8A** (left). The zone within the dashed square



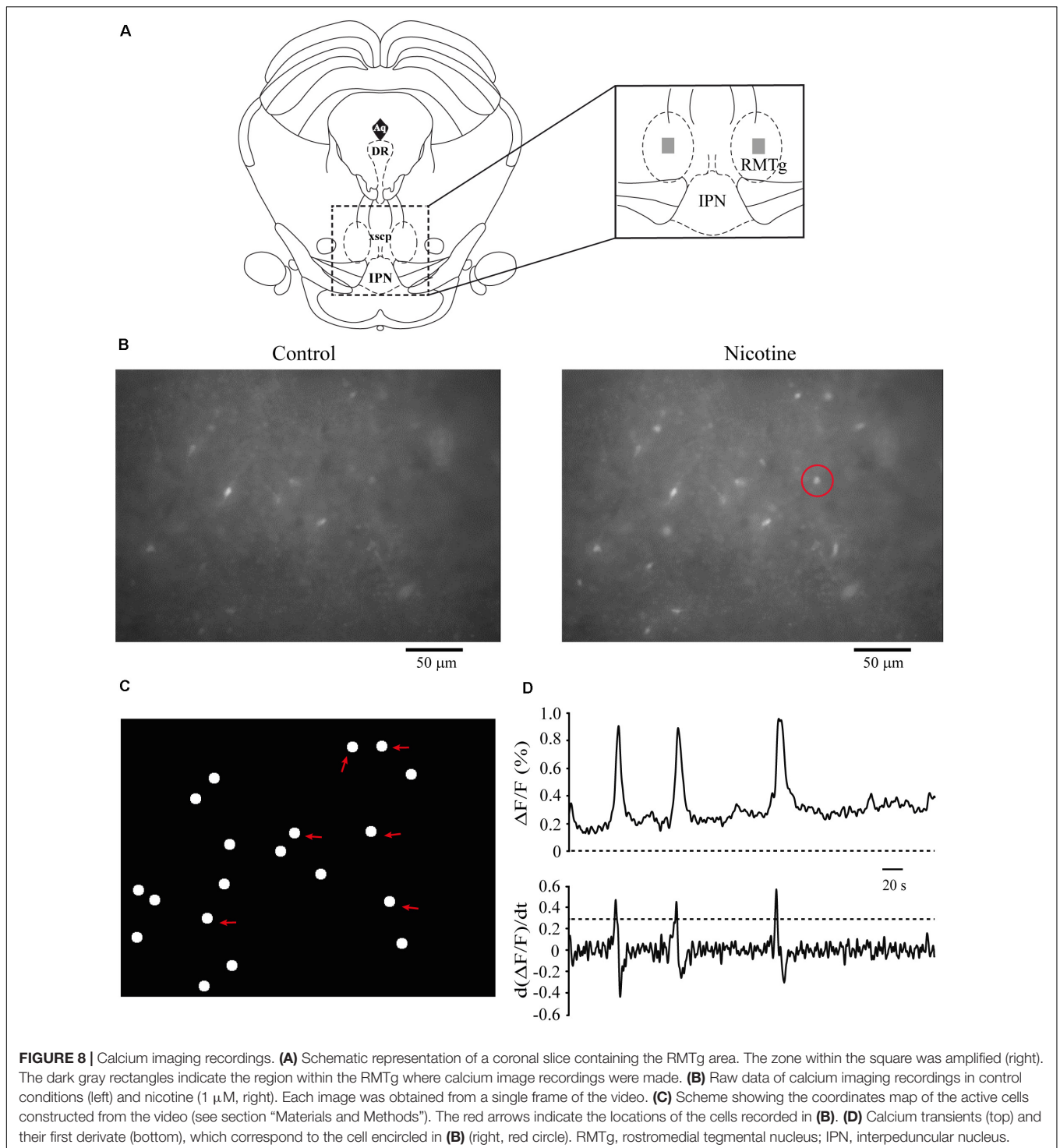
was amplified (right), and the gray rectangles show the area within the RMTg nucleus where image recordings were made. Recordings were made in the left or the right RMTg indistinctly. **Figure 8B** shows calcium imaging recordings in control (left) and nicotine (right) conditions from a single experiment. Each image was obtained by taking a single frame from the video. A circular template was used to mark off each active cell and construct the coordinates map as shown in **Figure 8C**. The red arrows indicate the regions corresponding to active cells whose fluorescence increased with nicotine. **Figure 8D** shows the calcium transients (top) and their first derivative (bottom) corresponding to the encircled neuron in **Figure 8B** (right, red circle). Calcium transients were obtained from all the active cells recorded during the experiment in the different conditions, and their first derivatives were used to make the binary matrix, which in turn was used to construct the raster plots (see section “Materials and Methods”). **Figure 9A** shows a raster plot that illustrates the activity of 36 cells from a single experiment. Each

row represents the activity of a cell as a function of time. The dots represent the activity of a given neuron in a frame. The raster plot illustrates three different conditions: control, nicotine (1 μ M, gray band), and wash (**Figure 9A**). After nicotine, there is an increase in the activity that persists during the washout. The histogram in the bottom shows peaks of coactive neurons that appear after nicotine addition and increase during wash time (**Figure 9B**). **Figures 9C,D** illustrate the summary of six experiments (146 neurons). The cumulative distribution of the cellular activity (**Figure 9C**) shows that nicotine shifted the curve (red line) to the right and remained displaced during wash conditions (blue line). Nicotine and wash distributions were statistically different to control (black line) (Kolmogorov–Smirnov test, $p = 0.001$). The box plot (**Figure 9D**) also illustrates that there is a significant increase in cellular activity in nicotine and washout conditions as compared to control (Friedman test, $p = 0.001$). The raster plot in **Figure 9E** represents 27 cells from a single experiment. It shows that MLA (black bar) blocked the



increase in the cell activity induced by nicotine (gray band). MLA by itself did not have any effect on the cell activity. Synchrony peaks of activity were not observed in any of the three conditions: control, nicotine, or wash (Figure 9F). Figures 9G,H illustrate the summary of five experiments (143 neurons). The cumulative

distribution of the cellular activity (Figure 9G) shows that there were no differences between the three conditions (Kolmogorov–Smirnov test, $p = 0.1632$). The box plot did not show statistically significant changes in cell activity either (Figure 9H) (Friedman test, $p = 0.1521$).



DISCUSSION

The electrophysiological data presented in this study argue that nicotine promotes a long-lasting enhancement of glutamate release in the RMTg nucleus. This was measured as an increase in the frequency and amplitude of sEPSCs recorded from identified GABAergic neurons. Nicotinic effects were mediated by the

activation $\alpha 7$ but not $\alpha 4\beta 2$ nAChRs. Furthermore, the $\alpha 7$ nAChR selective agonist PNU-282987 mimicked the effects of nicotine. We found variations in the time course and the delay of the effect of nicotine in different cells. We noticed that recorded cells close to the surface of the slice responded faster than that located at deeper levels. Therefore, it is possible that variations of the diffusion time for the drug to reach the cells recorded could

explain the delay of the effects. With respect to the time course, the variations could depend on the proportion and integrity of the glutamatergic terminals preserved in the slice and each cell recorded. However, we observed that nicotine produced long-lasting effects after the drug washout.

Nicotinic Actions Are Presynaptic

Nicotinic actions were presynaptic as buffering intracellular calcium BAPTA, inside the recorded cells, did not prevent the effects. In contrast, BAPTA-AM, which is capable of entering the somas and terminals, suppressed the effect of nicotine. Besides, the local application of ACh on RMTg neurons did not evoke any response (Figure 5D), which discards any postsynaptic effects. This also indicates that nicotine-induced glutamate release depends on an increase in calcium levels in the axon terminals. Eserine, an acetylcholinesterase inhibitor, also mimicked the effects of nicotine suggesting the presence of an endogenous cholinergic tone that regulates glutamate release and basal excitability in the RMTg nucleus. Our results agree with those obtained in a previous study where it was reported that nicotine increases the amplitude of excitatory postsynaptic currents in the RMTg, evoked by electrical stimulation (Lecca et al., 2011).

Nicotine Effects Depend on Intracellular Calcium

Our data showed that nicotine effects are dependent on an increase in intracellular calcium and a CICR mechanism as CPA and thapsigargin, two blockers of SERCA, abolished nicotine-induced enhancement of sEPSCs. In contrast, cadmium did not block nicotine-induced sEPSC enhancement indicating that the activation of VGCCs is not a necessary condition for these effects. Because $\alpha 7$ nAChRs are 10 times more calcium-permeable than $\alpha 4\beta 2$ nAChRs (Role and Berg, 1996), calcium influx through presynaptic $\alpha 7$ nAChRs is enough to induce CICR and neurotransmitter release without the intervention of VGCCs (Figure 10; Gray et al., 1996; Sharma and Vijayaraghavan, 2003; Sharma et al., 2008). On the other hand, the neurotransmitter release exerted through $\beta 2$ subunit-containing nAChRs is entirely dependent on the activation of VGCCs, which induces an additional increase in intracellular calcium levels and CICR (Tsuneki et al., 2000; Shoop et al., 2001; Dajas-Bailador et al., 2002; Dickinson et al., 2008; Garduño et al., 2012).

Nicotine Caused Synchronic Release From Glutamate Terminals

In most of the cells recorded, nicotine not only increased the frequency and the amplitude but also evoked bursts of EPSCs. Substitution of 90% of extracellular calcium with the divalent cations, strontium, or barium abolished the bursting and decreased the nicotine-induced amplitude enhancement of sEPSCs. Divalent cations also produced a small but significant decrease in sEPSC frequency, which was previously enhanced by nicotine (Figure 7). These data suggest that nicotine is causing a synchronic glutamate release from axon terminals by a calcium-dependent mechanism (Sharma and Vijayaraghavan, 2003; Sharma et al., 2008). This synchronic release is disrupted

by replacing the calcium with the divalent cations (Léna and Changeux, 1997; Good and Lupica, 2009). Our data also agree with previous works reporting that nicotinic actions through $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nAChRs involve a CICR mechanism that increases release synchrony and synaptic efficiency in different brain areas (Dajas-Bailador et al., 2002; Dickinson et al., 2008; Sharma et al., 2008; Garduño et al., 2012). In support of these findings, it was reported that presynaptic calcium stores regulate neurotransmitter release in different brain areas (Llano et al., 2000; Conti et al., 2004).

Nicotine Caused Long-Lasting Excitatory Effects

Our results also showed that nicotinic effects were persistent for about 20–40 min after drug washout and that these effects were independent of action potential as TTX did not prevent the nicotine-induced increase in frequency or amplitude of mEPSCs. The increasing effect on the amplitude lasted longer than that of the frequency (Figure 1C) suggesting that synaptic release remained potentiated long after the drug washout. Calcium imaging experiments are consistent with these results because nicotine increased the excitability of RMTg nucleus neurons, and the effect persisted more than 20 min after nicotine was removed from the bath solution. Moreover, synchrony peaks indicating coactive neurons were more frequent during the wash time (Figure 9A).

Physiological Relevance

In the present study, we used nicotine at a concentration of 1 μM , which is physiologically relevant. This concentration is in the range of that found in the plasma of smokers after smoking a cigarette (Dani and Heinemann, 1996). This low nicotine concentration was able to produce a long-lasting synchronized release of glutamate in the RMTg nucleus. Nicotine caused long-term synaptic changes in a way that was independent of action potentials.

Nicotinic Increase in Glutamate Release Persists Beyond Desensitization of nAChRs

It is well known that nicotine produces rapid desensitization of nAChRs (Wooltorton et al., 2003). However, the increase in synaptic efficiency persisted a long time after desensitization occurred. Calcium influx through $\alpha 7$ nAChRs would cause CICR (Figure 10) and activation of calcium-dependent kinases (Dickinson et al., 2008; Sharma et al., 2008; Garduño et al., 2012; Zhong et al., 2013), resulting in this form of long-term synaptic plasticity. This provoked sustained excitability and peaks of coactive neurons as shown in calcium imaging experiments. Therefore, nicotine alters network activity by facilitating the synchronic activity of RMTg neurons.

Nicotine Can Produce Rewarding and Aversive Effects

It is well known that nicotine activates nAChRs on diverse reward areas such as the VTA (Mansvelder et al., 2002;

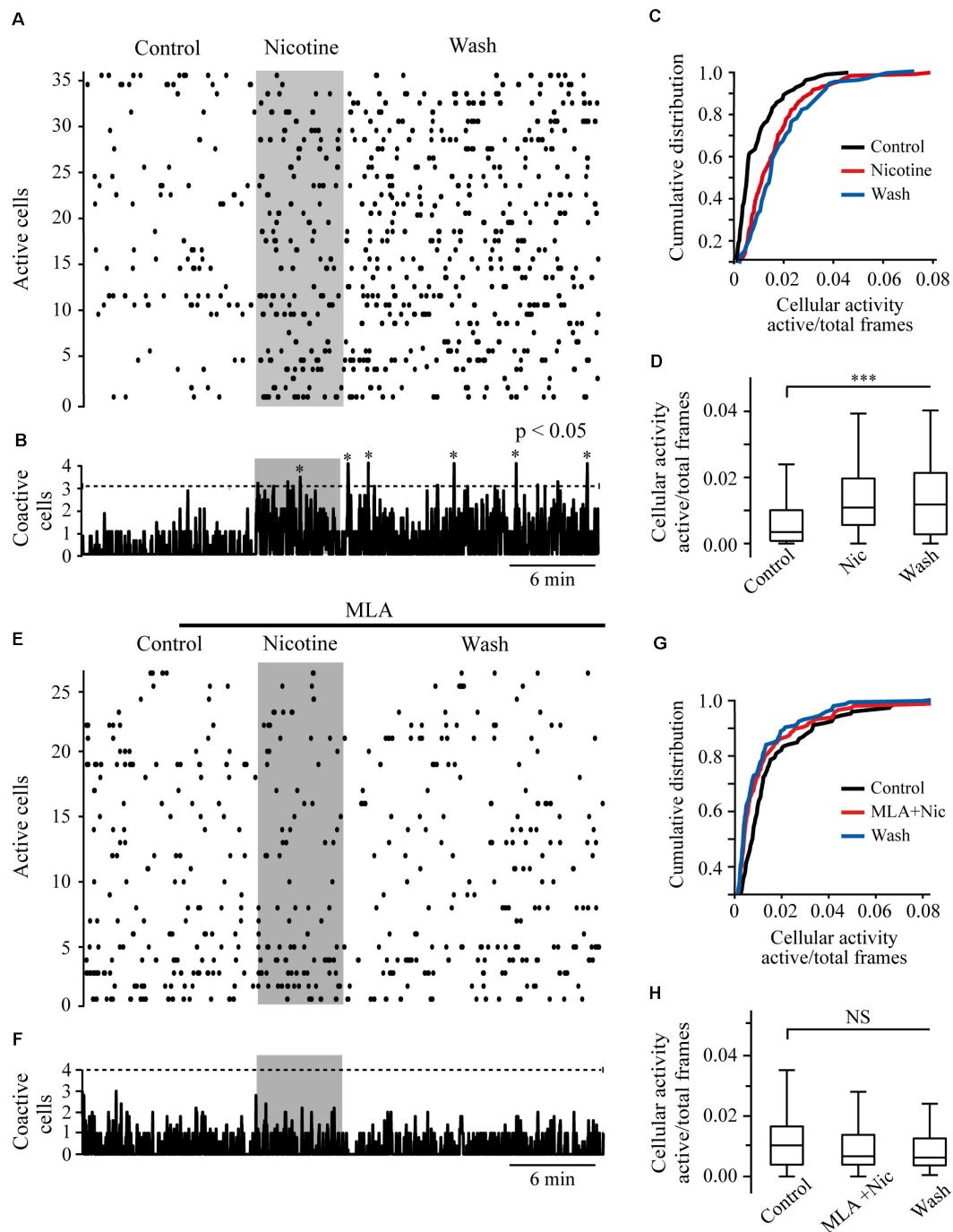
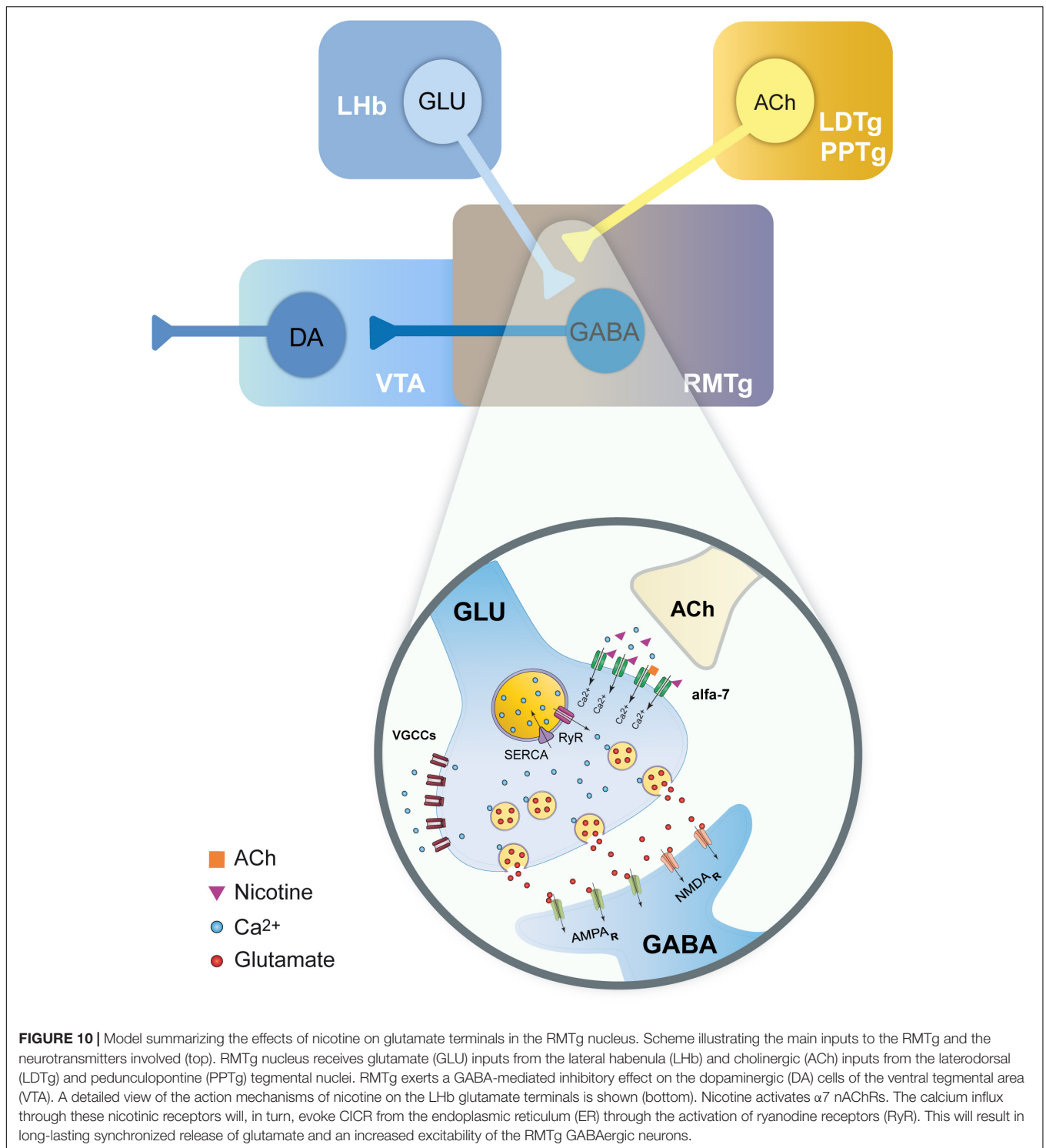


FIGURE 9 | Nicotine increases RMTg neuronal activity. **(A)** Raster plot showing the spontaneous activity of 36 cells from a single experiment in RMTg nucleus. Rows represent the activity of individual neurons during the total time of the experiment. Columns are video frames converted to time in minutes. Note that cell activity is increased in nicotine (gray band) and wash conditions as compared with control. **(B)** Histogram showing coactive cell peaks, which represent the number of neurons that fired together in a given frame. Those peaks (asterisks) are statistically significant when they overpass the threshold (Monte Carlo test). Note that coactivity peaks occurrence started in nicotine but were more evident during the wash time. **(C)** Cumulative distribution of cellular activity of all cells in the three different conditions. Note that in nicotine (red line) and wash (blue line) conditions, the distributions were shifted to the right with respect to the control (black line), which indicates greater cellular activity. The distributions of nicotine and wash were statistically different as compared to control ($p < 0.001$). **(D)** Box plot of the cellular activity in the three different conditions, which shows the significant increase in activity in nicotine and wash conditions as compared to control (** $p < 0.001$, $n = 146$, six experiments). **(E)** Raster plot showing the spontaneous activity of 27 cells from a single experiment in RMTg nucleus. In the presence of MLA (100 nM, black bar), nicotine (gray band) did not increase cell activity. **(F)** The histogram shows that coactivity peaks did not change in the different conditions. **(G)** Cumulative distributions show no differences of cellular activity among the three conditions ($p > 0.05$). **(H)** Box plot of the cellular activity in the three different conditions did not show statistically significant changes of cell activity in nicotine in the presence of MLA (MLA+Nic) or wash conditions as compared to control ($p > 0.05$, $n = 143$, five experiments).



Miller and Picciotto, 2016) and the accumbens nucleus (Pontieri et al., 1996; Picciotto et al., 1998; Zoli et al., 2002). Nicotinic stimulation of reward structures is considered to play a key role in the establishment and maintenance of the tobacco habit (Kenny and Markou, 2006). However, nicotine also produces aversive

effects mediated by several brain structures including the medial habenula (MHb) and the IPN, among others (Fowler et al., 2013; Shih et al., 2014) (see Fowler and Kenny, 2014, for review). Recent studies showed that the activation of the MHb-IPN circuit abolishes nicotine-evoked reward and decreases nicotine

intake (Tuesta et al., 2017). Also, it was proposed that nicotine mediates aversive effects by modulating GABAergic IPN inputs to the LDTg nucleus and regulating the LDTg-VTA pathway (Wolfman et al., 2018).

The RMTg Nucleus Mediates the Aversive Effects of Nicotine

According to our data, the actions of nicotine in the RMTg nucleus would also produce aversive effects as an increase in GABAergic neurons activity would inhibit the mesolimbic reward systems. In support of this idea, it was reported that the stimulation of the glutamatergic inputs to the RMTg evokes aversion to stimuli that are normally innocuous (Stamatakis and Stuber, 2012). Furthermore, it was shown that RMTg neurons projecting to the VTA encode negative but not positive motivational stimuli (Li et al., 2019a,b). Increasing the excitability of the circuits mediating the noxious properties of nicotine could be an effective strategy to decrease nicotine addiction (Fowler and Kenny, 2014). Accordingly, it was observed that aversive reactions to nicotine are important to decrease the probability of developing habitual tobacco use in first-time smokers (Sartor et al., 2010). Therefore, the RMTg nucleus could be a potential therapeutic target against tobacco addiction. For instance, the use of a positive allosteric modulator of $\alpha 7$ nAChRs would potentiate the noxious effects of nicotine by increasing the synchronic firing of RMTg neurons and inhibiting the VTA dopaminergic system.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by the Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), Facultad de Medicina UNAM.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

DC-R performed the experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript. ER-S performed the experiments and analyzed the data. GA-L performed immunocytochemical work. JG performed immunocytochemical work and revised the manuscript. OH-G analyzed the data. SM analyzed the data and revised the manuscript. SH-L designed the experiments, prepared the figures, and wrote the manuscript.

All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by the DGAPA-PAPIIT (UNAM) (Grant IN216319).

ACKNOWLEDGMENTS

DC-R is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received the fellowship 595267 from CONACyT. We thank Jorge Bravo-Martínez for his valuable technical assistance and Ruth Rincón Heredia for her helpful collaboration in confocal microscopy work.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2020.604583/full#supplementary-material>

Supplementary Figure 1 | Time-amplitude histogram showing the time course of nicotine effect in the presence of TTX. The graph in black shows the time course of the mEPSCs frequency. For clarity, the errors were removed from the graph.

Supplementary Figure 2 | Time-amplitude histograms showing the time course of nicotine effect in the presence of MLA **(A)** and DH β E **(B)**. The graphs in black show the time course of the sEPSCs frequency in both graphs. For clarity, the errors were removed from the graphs.

Supplementary Figure 3 | **(A)** Time-amplitude histogram showing the time course of the effect of PNU-282987, a selective agonist of $\alpha 7$ nAChRs. The graph in black shows the time course of the sEPSCs frequency. For clarity, the errors were removed from the graph. **(B)** Time-amplitude histogram showing the time course of the effect of RJR, a selective agonist of the $\alpha 4\beta 2$ nAChRs. The graph in black shows the time course of the sEPSCs frequency. For clarity, the errors were removed from the graph.

Supplementary Figure 4 | **(A)** Time-amplitude histogram showing the time course of the nicotine effect with BAPTA in the recording pipette. The graph in black show the time course of the sEPSCs frequency. For clarity, the errors were removed from the graph. **(B)** Time-amplitude histogram showing the temporal course of the nicotine's effect in the presence of the membrane permeable BAPTA-AM added in the bath solution. The graph in black show the time course of the sEPSCs frequency. For clarity, the errors were removed from the graph.

Supplementary Figure 5 | **(A)** Time-amplitude histogram showing the time course of the nicotine effect in the presence of thapsigargin. The graph in black show the time course of the sEPSCs frequency. For clarity, the errors were removed from the graph. **(B)** Time-amplitude histogram showing the time course of the nicotine effect in the presence of CPA. The graph in black show the time course of the sEPSCs frequency. For clarity, the errors were removed from the graph. **(C)** Time-amplitude histogram showing the time course of the nicotine effect in the presence of cadmium. The graph in black, show the time course of the sEPSCs frequency. For clarity, the errors were removed from the graph.

REFERENCES

- Aparicio-Juárez, A., Duhne, M., Lara-González, E., Ávila-Cascajares, F., Calderón, V., Galarraga, E., et al. (2019). Cortical stimulation relieves parkinsonian pathological activity in vitro. *Eur. J. Neurosci.* 49, 834–848. doi: 10.1111/ejn.13806
- Barrot, M., Sesack, S. R., Georges, F., Pistis, M., Hong, S., and Jhou, T. C. (2012). Braking dopamine systems: a new GABA master structure for mesolimbic and nigrostriatal functions. *J. Neurosci.* 32, 14094–14101. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3370-12.2012
- Bourdy, R., and Barrot, M. (2012). A new control center for dopaminergic systems: pulling the VTA by the tail. *Trends Neurosci.* 35, 681–690. doi: 10.1016/j.tins.2012.06.007
- Carrillo-Reid, L., Hernández-López, S., Tapia, D., Galarraga, E., and Bargas, J. (2011). Dopaminergic modulation of the striatal microcircuit: receptor-specific configuration of cell assemblies. *J. Neurosci.* 31, 14972–14983. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3226-11.2011
- Carrillo-Reid, L., Tecuapetla, F., Tapia, D., Hernández-Cruz, A., Galarraga, E., Drucker-Colin, R., et al. (2008). Encoding network states by striatal cell assemblies. *J. Neurophysiol.* 99, 1435–1450. doi: 10.1152/jn.01131.2007
- Conti, R., Tan, Y. P., and Llano, I. (2004). Action potential-evoked and ryanodine-sensitive spontaneous Ca²⁺ transients at the presynaptic terminal of a developing CNS inhibitory synapse. *J. Neurosci.* 24, 6946–6957. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1397-04.2004
- Dajas-Bailador, F. A., Mogg, A. J., and Wonnacott, S. (2002). Intracellular Ca²⁺ signals evoked by stimulation of nicotinic acetylcholine receptors in SH-SY5Y cells: contribution of voltage-operated Ca²⁺ channels and Ca²⁺ stores. *J. Neurochem.* 81, 606–614. doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.00846.x
- Dani, J. A., and Heinemann, S. (1996). Molecular and cellular aspects of nicotine abuse. *Neuron* 16, 905–908. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80112-9
- Dickinson, J. A., Kew, J. N. C., and Wonnacott, S. (2008). Presynaptic $\alpha 7$ and $\beta 2$ -containing nicotinic acetylcholine receptors modulate excitatory amino acid release from rat prefrontal cortex nerve terminals via distinct cellular mechanisms. *Mol. Pharmacol.* 74, 348–359. doi: 10.1124/mol.108.046623
- Fowler, C. D., and Kenny, P. J. (2014). Nicotine aversion: neurobiological mechanisms and relevance to tobacco dependence vulnerability. *Neuropharmacology* 76, 533–544. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.09.008
- Fowler, C. D., Tuesta, L., and Kenny, P. J. (2013). Role of $\alpha 5^*$ nicotinic acetylcholine receptors in the effects of acute and chronic nicotine treatment on brain reward function in mice. *Psychopharmacology* 229, 503–513. doi: 10.1007/s00213-013-3235-1
- Galindo-Charles, L., Hernández-López, S., Galarraga, E., Tapia, D., Bargas, J., Garduño, J., et al. (2008). Serotonergic dorsal raphe neurons possess functional postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors. *Synapse* 62, 601–615. doi: 10.1002/syn.20526
- Garduño, J., Galindo-Charles, L., Jimenez-Rodriguez, J., Galarraga, E., Tapia, D., Mihalescu, S., et al. (2012). Presynaptic $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors increase glutamate release and serotonin neuron excitability in the dorsal raphe nucleus. *J. Neurosci.* 32, 15148–15157. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0941-12.2012
- Garduño, J., Hernández-López, S., Rolón, D. C., de la Cruz, L., Hernández-Vázquez, F., Reyes-Vaca, A., et al. (2019). Electrophysiological characterization of glucose sensing neurons in the hypothalamic arcuate nucleus of male rats. *Neurosci. Lett.* 703, 168–176. doi: 10.1016/j.neulet.2019.03.041
- Glover, E. J., Starr, E. M., Chao, Y., Jhou, T. C., and Chandler, L. J. (2019). Inhibition of the rostromedial tegmental nucleus reverses alcohol withdrawal-induced anxiety-like behavior. *Neuropsychopharmacology* 44, 1896–1905. doi: 10.1038/s41386-019-0406-8
- Gonçalves, L., Segó, C., and Metzger, M. (2012). Differential projections from the lateral habenula to the rostromedial tegmental nucleus and ventral tegmental area in the rat. *J. Comp. Neurol.* 520, 1278–1300. doi: 10.1002/cne.22787
- Good, C. H., and Lupica, C. R. (2009). Properties of distinct ventral tegmental area synapses activated via pedunculo-pontine or ventral tegmental area stimulation in vitro. *J. Physiol.* 587(Pt 6), 1233–1247. doi: 10.1113/jphysiol.2008.164194
- Gray, R., Rajan, A. S., Radcliffe, K. A., Yakehiro, M., and Dani, J. A. (1996). Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. *Nature* 383, 713–716. doi: 10.1038/383713a0
- Hong, S., Jhou, T. C., Smith, M., Saleem, K. S., and Hikosaka, O. (2011). Negative reward signals from the lateral habenula to dopamine neurons are mediated by rostromedial tegmental nucleus in primates. *J. Neurosci.* 31, 11457–11471. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1384-11.2011
- Hsiao, B., Dweck, D., and Luetje, C. W. (2001). Subunit-dependent modulation of neuronal nicotinic receptors by zinc. *J. Neurosci.* 21, 1848–1856. doi: 10.1523/jneurosci.21-06-01848.2001
- Jhou, T. C. (2005). Neural mechanisms of freezing and passive aversive behaviors. *J. Comp. Neurol.* 493, 111–114. doi: 10.1002/cne.20734
- Jhou, T. C., Fields, H. L., Baxter, M. G., Saper, C. B., and Holland, P. C. (2009a). The rostromedial tegmental nucleus (RMTg), a GABAergic afferent to midbrain dopamine neurons, encodes aversive stimuli and inhibits motor responses. *Neuron* 61, 786–800. doi: 10.1016/j.neuron.2009.02.001
- Jhou, T. C., Geisler, R., Marinelli, M., Degarmo, B. A., and Zahm, D. S. (2009b). The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: a structure targeted by the lateral habenula that projects to the ventral tegmental area of Tsai and substantia nigra compacta. *J. Comp. Neurol.* 513, 566–596. doi: 10.1002/cne.21891
- Jhou, T. C., Good, C. H., Rowley, C. S., Xu, S.-P., Wang, H., Burnham, N. W., et al. (2013). Cocaine drives aversive conditioning via delayed activation of dopamine-responsive habenular and midbrain pathways. *J. Neurosci.* 33, 7501–7512. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3634-12.2013
- Kaufling, J., and Aston-Jones, G. (2015). Persistent adaptations in afferents to ventral tegmental dopamine neurons after opiate withdrawal. *J. Neurosci.* 35, 10290–10303. doi: 10.1523/jneurosci.0715-15.2015
- Kaufling, J., Veinante, P., Pawlowski, S. A., Freund-Mercier, M. J., and Barrot, M. (2009). Afferents to the GABAergic tail of the ventral tegmental area in the rat. *J. Comp. Neurol.* 513, 597–621. doi: 10.1002/cne.21983
- Kaufling, J., Waltisperger, E., Bourdy, R., Valera, A., Veinante, P., Freund-Mercier, M. J., et al. (2010). Pharmacological recruitment of the GABAergic tail of the ventral tegmental area by acute drug exposure. *Br. J. Pharmacol.* 161, 1677–1691. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00984.x
- Kenny, P. J., and Markou, A. (2006). Nicotine self-administration acutely activates brain reward systems and induces a long-lasting increase in reward sensitivity. *Neuropsychopharmacology* 31, 1203–1211. doi: 10.1038/sj.npp.1300905
- Klink, R., De Kerchove, D., Exaerde, A., Zoli, M., and Changeux, J. P. (2001). Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. *J. Neurosci.* 21, 1452–1463. doi: 10.1523/jneurosci.21-05-01452.2001
- Lahti, L., Haugas, M., Tikker, L., Airavaara, M., Voutilainen, M. H., Anttila, J., et al. (2016). Differentiation and molecular heterogeneity of inhibitory and excitatory neurons associated with midbrain dopaminergic nuclei. *Development* 143, 516–529. doi: 10.1242/dev.129957
- Lara-González, E., Duhne, M., Ávila-Cascajares, F., Cruz, S., and Bargas, J. (2019). Comparison of actions between L-DOPA and different dopamine agonists in Striatal DA-depleted microcircuits in vitro: pre-clinical insights. *Neuroscience* 410, 76–96. doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.04.058
- Lavezzi, H. N., and Zahm, D. S. (2011). The mesopontine rostromedial tegmental nucleus: an integrative modulator of the reward system. *Basal Ganglia* 1, 191–200. doi: 10.1016/j.baga.2011.08.003
- Lecca, S., Melis, M., Luchicchi, A., Ennas, M. G., Castelli, M. P., Muntoni, A. L., et al. (2011). Effects of drugs of abuse on putative rostromedial tegmental neurons, inhibitory afferents to midbrain dopamine cells. *Neuropsychopharmacology* 36, 589–602. doi: 10.1038/npp.2010.190
- Lecca, S., Melis, M., Luchicchi, A., Muntoni, A. L., and Pistis, M. (2012). Inhibitory inputs from rostromedial tegmental neurons regulate spontaneous activity of midbrain dopamine cells and their responses to drugs of abuse. *Neuropsychopharmacology* 37, 1164–1176. doi: 10.1038/npp.2011.302
- Léna, C., and Changeux, J. P. (1997). Role of Ca²⁺ ions in nicotinic facilitation of GABA release in mouse thalamus. *J. Neurosci.* 17, 576–585. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-02-00576.1997
- Li, H., Pullmann, D., Cho, J. Y., Eid, M., and Jhou, T. C. (2019a). Generality and opponency of rostromedial tegmental (RMTg) roles in valence processing. *eLife* 8:e41542. doi: 10.7554/eLife.41542
- Li, H., Vento, P. J., Parrilla-Carrero, J., Pullmann, D., Chao, Y. S., Eid, M., et al. (2019b). Three rostromedial tegmental afferents drive triply dissociable aspects of punishment learning and aversive valence encoding. *Neuron* 104, 987–999.e4. doi: 10.1016/j.neuron.2019.08.040

- Llano, I., González, J., Caputo, C., Lai, F. A., Blayney, L. M., Tan, Y. P., et al. (2000). Presynaptic calcium stores underlie large-amplitude miniature IPSCs and spontaneous calcium transients. *Nat. Neurosci.* 3, 1256–1265. doi: 10.1038/81781
- Mansvelder, H. D., Keath, J. R., and McGehee, D. S. (2002). Synaptic mechanisms underlie nicotine-induced excitability of brain reward areas. *Neuron* 33, 905–919. doi: 10.1016/S0896-6273(02)00625-6
- Miller, M. B., and Picciotto, M. R. (2016). “Nicotine pharmacology, abuse, and addiction,” in *Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical*, 2nd Edn, eds D. Pfaff and N. Volkow (New York, NY: Springer), doi: 10.1007/978-1-4939-3474-4_157
- Pérez-Ortega, J., Duhne, M., Lara-González, E., Plata, V., Gasca, D., Galarraga, E., et al. (2016). Pathophysiological signatures of functional connectomics in parkinsonian and dyskinetic striatal microcircuits. *Neurobiol. Dis.* 91, 347–361. doi: 10.1016/j.nbd.2016.02.023
- Perrotti, L. I., Bolaños, C. A., Choi, K.-H., Russo, S. J., Edwards, S., Ulery, P. G., et al. (2005). Δ FosB accumulates in a GABAergic cell population in the posterior tail of the ventral tegmental area after psychostimulant treatment. *Eur. J. Neurosci.* 21, 2817–2824. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04110.x
- Picciotto, M. R., Zoli, M., Rimondini, R., Léna, C., Marubio, L. M., Pich, E. M., et al. (1998). Acetylcholine receptors containing the β 2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature* 391, 173–177. doi: 10.1038/34413
- Pidoplichko, V. I., DeBiasi, M., Williams, J. T., and Dani, J. A. (1997). Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. *Nature* 390, 401–404. doi: 10.1038/37120
- Pontieri, F. E., Tanda, G., Orzi, F., and Di Chiara, G. (1996). Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. *Nature* 382, 255–257. doi: 10.1038/382255a0
- Role, L. W., and Berg, D. K. (1996). Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron* 16, 1077–1085. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80134-8
- Sanchez-Catalan, M., Kaufling, J., Georges, F., Veinante, P., and Barrot, M. (2014). The antero-posterior heterogeneity of the ventral tegmental area. *Neuroscience* 282, 198–216. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.09.025
- Sartor, C. E., Lessov-Schlaggar, C. N., Scherrer, J. F., Buchholz, K. K., Madden, P. A. F., Pergadia, M. L., et al. (2010). Initial response to cigarettes predicts rate of progression to regular smoking: findings from an offspring-of-twins design. *Addict. Behav.* 35, 771–778. doi: 10.1016/j.addbeh.2010.03.004
- Sharma, G., Grybko, M., and Vijayaraghavan, S. (2008). Action potential-independent and nicotinic receptor-mediated concerted release of multiple quanta at hippocampal CA3-mossy fiber synapses. *J. Neurosci.* 28, 2563–2575. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5407-07.2008
- Sharma, G., and Vijayaraghavan, S. (2003). Modulation of presynaptic store calcium induces release of glutamate and postsynaptic firing. *Neuron* 38, 929–939. doi: 10.1016/S0896-6273(03)00322-2
- Shih, P. Y., Engle, S. E., Oh, G., Deshpande, P., Puskar, N. L., Lester, H. A., et al. (2014). Differential expression and function of nicotinic acetylcholine receptors in subdivisions of medial habenula. *J. Neurosci.* 34, 9789–9802. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0476-14.2014
- Shoop, R. D., Chang, K. T., Ellisman, M. H., and Berg, D. K. (2001). Synaptically driven calcium transients via nicotinic receptors on somatic spines. *J. Neurosci.* 21, 771–781. doi: 10.1523/jneurosci.21-03-00771.2001
- Smith, R. J., Vento, P. J., Chao, Y. S., Good, C. H., and Jhou, T. C. (2018). Gene expression and neurochemical characterization of the rostromedial tegmental nucleus (RMTg) in rats and mice. *Brain Struct. Funct.* 224, 219–238. doi: 10.1007/s00429-018-1761-7
- Stamatakis, A. M., and Stuber, G. D. (2012). Activation of lateral habenula inputs to the ventral midbrain promotes behavioral avoidance. *Nat. Neurosci.* 15, 1105–1107. doi: 10.1038/nn.3145
- Tsuneki, H., Klink, R., Léna, C., Korn, H., and Changeux, J. P. (2000). Calcium mobilization elicited by two types of nicotinic acetylcholine receptors in mouse substantia nigra pars compacta. *Eur. J. Neurosci.* 12, 2475–2485. doi: 10.1046/j.1460-9568.2000.00138.x
- Tuesta, L. M., Chen, Z., Duncan, A., Fowler, C. D., Ishikawa, M., Lee, B. R., et al. (2017). GLP-1 acts on habenular avoidance circuits to control nicotine intake. *Nat. Neurosci.* 20, 708–716. doi: 10.1038/nn.4540
- Vento, P. J., Burnham, N. W., Rowley, C. S., and Jhou, T. C. (2017). Learning from One’s mistakes: a dual role for the rostromedial tegmental nucleus in the encoding and expression of punished reward seeking. *Biol. Psychiatry* 81, 1041–1049. doi: 10.1016/j.biopsych.2016.10.018
- Wasserman, D. I., Wang, H. G., Rashid, A. J., Josselyn, S. A., and Yeomans, J. S. (2013). Cholinergic control of morphine-induced locomotion in rostromedial tegmental nucleus versus ventral tegmental area sites. *Eur. J. Neurosci.* 38, 2774–2785. doi: 10.1111/ejn.12279
- Whiting, P., and Lindstrom, J. (1986). Pharmacological properties of immunologically isolated neuronal nicotinic receptors. *J. Neurosci.* 6, 3061–3069. doi: 10.1523/jneurosci.06-10-03061.1986
- Wolfman, S. L., Gill, D. F., Bogdanic, F., Long, K., Al-Hasani, R., McCall, J. G., et al. (2018). Nicotine aversion is mediated by GABAergic interpeduncular nucleus inputs to laterodorsal tegmentum. *Nat. Commun.* 9:2710. doi: 10.1038/s41467-018-04654-2
- Wooltorton, J. R. A., Pidoplichko, V. I., Broide, R. S., and Dani, J. A. (2003). Differential desensitization and distribution of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in midbrain dopamine areas. *J. Neurosci.* 23, 3176–3185. doi: 10.1523/jneurosci.23-08-03176.2003
- Wu, J., George, A. A., Schroeder, K. M., Xu, L., Marxer-Miller, S., Lucero, L., et al. (2004). Electrophysiological, pharmacological, and molecular evidence for α 7-nicotinic acetylcholine receptors in rat midbrain dopamine neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311, 80–91. doi: 10.1124/jpet.104.070417
- Xu-Friedman, M. A., and Regehr, W. G. (2000). Probing fundamental aspects of synaptic transmission with strontium. *J. Neurosci.* 20, 4414–4422. doi: 10.1523/jneurosci.20-12-04414.2000
- Yeomans, J. S. (2012). Muscarinic receptors in brain stem and mesopontine cholinergic arousal functions. *Handb. Exp. Pharmacol.* 208, 243–259. doi: 10.1007/978-3-642-23274-9_11
- Yetnikoff, L., Lavezzi, H. N., Reichard, R. A., and Zahm, D. S. (2014). An update on the connections of the ventral mesencephalic dopaminergic complex. *Neuroscience* 282, 23–48. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.04.010
- Zhong, C., Talmage, D. A., and Role, L. W. (2013). Nicotine elicits prolonged calcium signaling along ventral hippocampal axons. *PLoS One* 8:e82719. doi: 10.1371/journal.pone.0082719
- Zoli, M., Moretti, M., Zanardi, A., McIntosh, J. M., Clementi, F., and Gotti, C. (2002). Identification of the nicotinic receptor subtypes expressed on dopaminergic terminals in the rat striatum. *J. Neurosci.* 22, 8785–8789. doi: 10.1523/jneurosci.22-20-08785.2002
- Zucker, R. S., and Regehr, W. G. (2002). Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* 64, 355–405. doi: 10.1146/annurev.physiol.64.092501.114547

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Castillo-Rolón, Ramírez-Sánchez, Arenas-López, Garduño, Hernández-González, Mihăilescu and Hernández-López. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.