



Universidad Nacional Autónoma de  
México

Facultad de Ciencias

Caracterización electrofisiológica de las  
neuronas GABAérgicas del núcleo dorsal del  
Rafé de rata

T E S I S

Que para obtener el título de:

Bióloga

Presenta:

Teresa Antonia Meléndez Victoria

Director de Tesis:

Dr. Salvador Leonardo Hernández López

Ciudad Universitaria, D.F. 2015





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



## **Agradecimientos**

“El arte del maestro es despertar  
el placer de la expresión y el  
conocimiento”

A. Einstein

Dra. Fabiola Hernández V. gracias por su apoyo, enseñanza y dedicación como maestra, científica y amiga, dentro y fuera del laboratorio.

Dra. Julieta Garduño T. gracias por su apoyo, enseñanza e instrucción en el laboratorio, así como por su constante orientación.

Toñita (Sra. Antonia R. Rojas T.) gracias por todo su apoyo en los días de experimento y también en los días de no experimento.

Alline Becerril M. gracias por el apoyo en el laboratorio con las técnicas de inmuno; también agradezco a Ivan Ramos M. y Diana Elinos C. por la búsqueda en la resolución de los líos.

Gabriel Ceron Gutiérrez gracias por los programas y por el apoyo para el análisis de los resultados.

Al Taller de Filosofía e Historia de la Ciencia, Facultad de Ciencias, UNAM. Gracias a M. Alicia Villela González, a Ana R. Barahona Echeverría, a Edna M. Suárez Díaz, a Erica Torrens Rojas y a Gisela T. Mateos G. por su apoyo durante la realización del taller y en la búsqueda de la tesis.

Este proyecto fue apoyado por la División de Investigación de la Facultad de Medicina No. 017-2012 y la Dirección de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)-UNAM IN212313.

## Dedicatoria

“Hay grandes hombres que hacen  
a los demás sentirse pequeños.  
Pero la grandeza es hacer que  
todos se sientan grandes”

C. Dickens

A mis padres, Eva y Sergio, por su apoyo incondicional en todo momento, por mostrarme que nunca es tarde para aprender e intentar nuevas cosas y que es más importante levantarse que sentirse caído.

A mis hermanos Rosixochitl y Tonatiuh, que en todo momento han estado presentes brindándome su sinceridad y apoyo, coloreando, combinando y contrastando mi mundo, siempre impulsándolo.



<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1. Núcleo dorsal del raquí .....	1
1.1.1. Anatomía del NDR .....	2
1.1.2. Aferencias al NDR .....	3
1.1.3. Eferencias del NDR .....	5
1.2. Neuronas 5-HTérgicas del NDR .....	7
1.3. Neuronas GABAérgicas .....	8
1.3.1. Neuronas GABAérgicas del NDR .....	11
1.4. Relación fisiológica entre las neuronas GABAérgicas y 5-HTérgicas del NDR .....	13
<b>2. Justificación .....</b>	<b>15</b>
<b>3. Hipótesis .....</b>	<b>16</b>
<b>4. Objetivos .....</b>	<b>16</b>
<b>5. Metodología .....</b>	<b>17</b>
5.1. Obtención de rebanadas de cerebro .....	17
5.2. Registros electrofisiológicos .....	17
5.3. Inmunohistoquímica .....	19
5.4. Análisis de datos .....	20
<b>6. Resultados .....</b>	<b>21</b>
6.1. Registros en el NDR .....	21
6.2. Características electrofisiológicas .....	21
6.2.1. Las células GABAérgicas son electrofisiológicamente diferentes a las células 5-HTérgicas en el NDR .....	30
6.2.2. Los tres tipos de células GABAérgicas del NDR presentan características electrofisiológicas distintas .....	32
<b>7. Discusión .....</b>	<b>37</b>
7.1 Las células del NDR .....	37
7.2 Las células GABAérgicas del NDR .....	37
7.3 Las células 5-HTérgicas del NDR .....	40
7.4 Importancia fisiológica de la transmisión GABAérgica en el NDR .....	41
<b>8. Conclusiones .....</b>	<b>43</b>
8.1. Perspectivas futuras .....	43
<b>Bibliografía .....</b>	<b>44</b>



## Resumen

El núcleo dorsal del rafe (NDR) posee la mayor cantidad de células 5-HTérgicas en el cerebro y regula importantes procesos fisiológicos como son el ciclo sueño-vigilia, el estado de ánimo, la conducta motora y el apetito, entre otras. Sin embargo, para poder comprender la función que ejerce el NDR en los diversos procesos en que participa, es importante conocer los componentes celulares del núcleo, tales como las células GABAérgicas, las cuales modulan la actividad de las células 5-HTérgicas y ocupan el segundo lugar en cuanto a número de neuronas dentro del núcleo. Las células GABAérgicas no han sido caracterizadas en el NDR, por lo que en el presente trabajo se realizó una clasificación electrofisiológica de éstas. Se utilizaron ratas Wistar macho, de las cuales se extrajeron rebanadas de cerebro que fueron observadas bajo un microscopio. Los registros se efectuaron mediante la técnica de *patch-clamp* en configuración de célula completa. Se encontraron tres tipos electrofisiológicos de células GABAérgicas en el NDR: disparo regular con postdespolarización (DR-PD), disparo regular con frecuencia alta (DR-FA) y células con meseta (Me); las cuales fueron electrofisiológicamente diferentes a las células 5-HTérgicas del NDR. Las células registradas se analizaron mediante una técnica de inmunohistoquímica, en la cual se utilizó un anticuerpo contra las enzimas GAD65 y GAD67 (anti-GAD65/67), para las células con registro electrofisiológico correspondiente a las neuronas GABAérgicas.

## 1. Introducción

### 1.1. Núcleo dorsal del raquí

La primera descripción detallada del núcleo dorsal del raquí (NDR) la realizó Santiago Ramón y Cajal en su trabajo titulado “Texto del sistema nervioso central del hombre y los vertebrados” (1904), en el cual realizó una observación de los núcleos del raquí mediante la técnica de impregnación de plata. Cajal describió cuatro tipos diferentes de neuronas en el NDR: voluminosas, fusiformes, triangulares y estrelladas; asimismo, observó que las dendritas poseen espinas y divergen en conjuntos fuera del núcleo (para revisión ver Michelsen *et al.*, 2007).

Posteriormente, Dahlström y Fuxe (1964) describieron la distribución de las neuronas serotoninérgicas (5-hidroxitriptaminérgicas o 5-HTérgicas) en el NDR, las cuales son el principal grupo neuronal del núcleo (Jacobs y Azmitia, 1992; Bang y Commons, 2012); además, proporcionaron la primera nomenclatura de los núcleos del raquí a partir de su aparición durante el desarrollo del mesencéfalo, la cual consistía en nueve divisiones (B1 a B9), separadas a su vez en dos grupos (superior e inferior) (Jacobs y Azmitia, 1992). Posteriormente, se realizaron otras revisiones de los núcleos con diversos anticuerpos y se redefinieron los nombres y los núcleos (Jacobs y Azmitia, 1992; Michelsen *et al.*, 2007) (Fig. 1.1).

Durante muchos años se consideró al NDR exclusivamente 5-HTérgico; sin embargo, ahora se sabe que este núcleo está constituido por neuronas 5-HTérgicas (30–50%) seguidas de neuronas GABAérgicas ( $\approx$ 25%) (Johnson, 1994); además se ha descrito una gran cantidad de neurotransmisores y péptidos provenientes de otras áreas, tales como la dopamina, el glutamato, el neuropéptido Y, la sustancia P, la galanina, la encefalina, el factor liberador de corticotropina, el polipéptido intestinal vasoactivo, la colecistocinina y el óxido nítrico (Jacobs y Azmitia, 1992).

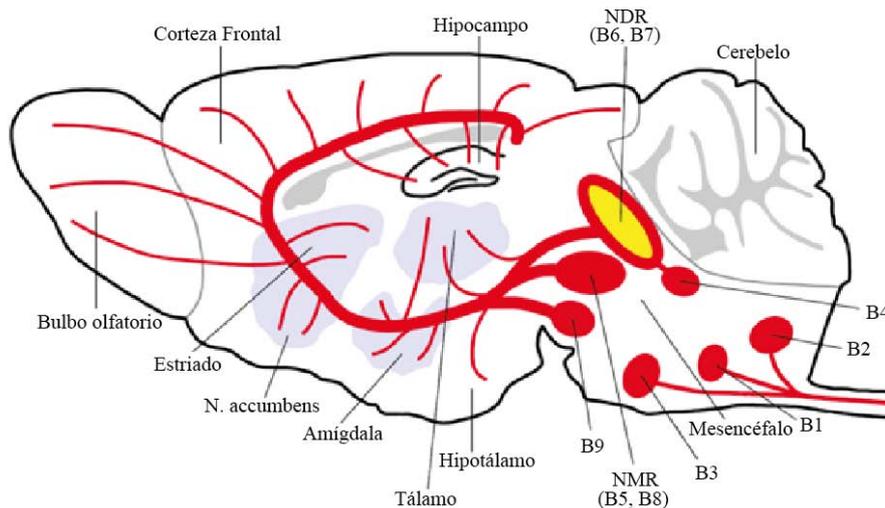


Figura 1.1. Esquema de un corte sagital del cerebro de un roedor. Se observan los núcleos del rafe (B1–B9) y las áreas cerebrales que inervan. El núcleo dorsal del rafe está constituido por los grupos B6 y B7 (amarillo). NDR, núcleo dorsal del rafe. NMR, núcleo medio del rafe (modificado de Lesch y Waider, 2012).

El NDR ha sido relacionado con diversos procesos, incluyendo la actividad motora, el ciclo sueño-vigilia, la ingesta de alimento, el dolor, la atención, la memoria, el estado de ánimo, el comportamiento maternal, la agresión y la respuesta al estrés (Hensler *et al.*, 2006; Monti, 2010; Zhao, 2013). Asimismo, se sabe que el NDR está involucrado en diferentes patologías neuropsiquiátricas tales como la depresión, la ansiedad, la esquizofrenia y los desórdenes obsesivo-compulsivos (Graeff *et al.*, 1996; Carrasco y Van de Kar, 2003; Hensler, 2006; Bang y Commons, 2012). Diversos estudios sugieren que estas patologías están relacionadas con alteraciones de la señalización 5-HTérgica originada en el NDR, lo cual confirma la importancia funcional de este núcleo.

### 1.1.1. Anatomía del NDR

Los núcleos del rafe están constituidos por cúmulos de neuronas localizados cerca de la línea media del tallo cerebral (Dahlström y Fuxe, 1964; ver Michelsen *et al.*, 2007 para revisión). En particular, el NDR se localiza en la parte ventral de la sustancia gris periacueductal mesencefálica (Paxinos y Watson, 1998; Waselus *et al.*, 2011), entre el fascículo longitudinal y el acueducto cerebral (Fig. 1.2).

Debido a que el NDR se extiende de manera rostrocaudal, desde el borde caudal del núcleo oculomotor hasta el núcleo dorsal tegmental, la mayoría de los estudios que describen este núcleo lo dividen en tres regiones: rostral, medial y caudal. Asimismo, existe una topografía dorsoventral donde pueden distinguirse las regiones dorsal, medial y ventral, así como las alas laterales del NDR (Michelsen *et al.*, 2007) (Fig. 1.2). Cada una de estas zonas recibe fibras aferentes y origina fibras eferentes en un patrón topográficamente organizado (Abrams *et al.*, 2004).

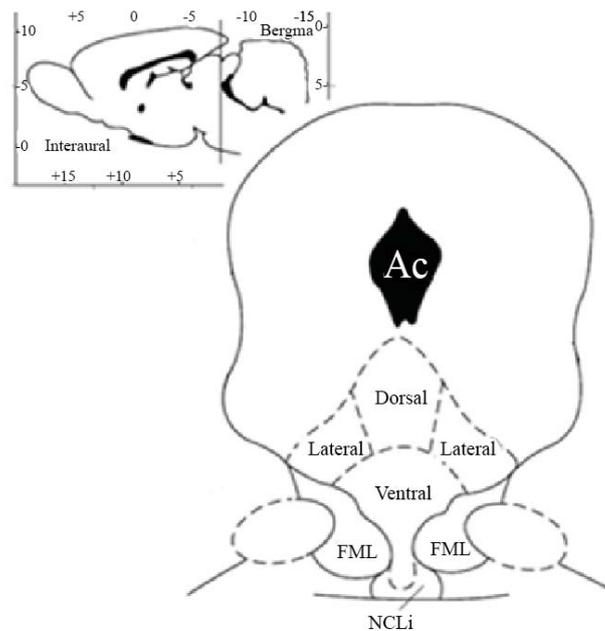


Figura 1.2. Esquema de un corte coronal del cerebro de rata. Se observan tres zonas del núcleo dorsal del rafe: el área dorsal, el área ventral y las áreas laterales. Ac, acueducto (negro). FML, fascículo medio longitudinal. NCLi, núcleo caudado lineal del rafe (modificado de Paxinos y Watson, 1998).

### 1.1.2. Aferencias al NDR

El NDR recibe múltiples aferencias que regulan su actividad y que, junto con sus abundantes proyecciones, explican la diversidad de procesos fisiológicos con los que el núcleo se

encuentra relacionado (Jacobs y Azmitia, 1992). Las aferencias pueden ser clasificadas de acuerdo con sus características neuroquímicas o anatómicas (Jacobs y Azmitia, 1992).

La principal fuente de aferencias a las células 5-HTérgicas proviene de otras neuronas localizadas dentro del propio NDR, así como de otros núcleos del rafé, incluyendo las áreas B9, el núcleo paragigantocelular lateral y el núcleo medio del rafé (Jacobs y Azmitia, 1992). Además, dentro del NDR hay una considerable liberación de 5-HT de origen somatodendrítico (Adell *et al.*, 1993). Neuroquímicamente, las aferencias del NDR contienen aminas, aminoácidos y algunos neuropéptidos.

Las aferencias que contienen aminas derivan de diversos núcleos. Por ejemplo, la mayor parte de las aferencias noradrenérgicas provienen del locus *coeruleus* (Aghajanian y Wang, 1977; Peyron *et al.*, 1996) y del locus *subcoeruleus* (Jacobs y Azmitia, 1992). Existen también aferencias adrenérgicas que provienen de los núcleo hipogloso, perihipogloso y del núcleo del tracto solitario (Aghajanian y Wang, 1977; Sakai *et al.*, 1977; Jacobs y Azmitia, 1992). Por su parte, las aferencias dopaminérgicas provienen de la sustancia *nigra*, el área tegmental ventral (Aghajanian y Wang, 1977; Kalén *et al.*, 1985) y del núcleo hipotalámico (Jacobs y Azmitia, 1992; Peyron *et al.*, 1995).

Las aferencias GABAérgicas que inervan el NDR provienen de diversas estructuras, incluyendo el hipotálamo (lateral, dorsal y ventromedial), el núcleo paragigantocelular, el núcleo central de la amígdala (Peyron *et al.*, 1998), la sustancia gris periacueductal (Jolas y Aghajanian, 1997; Gervasoni *et al.*, 2000), la sustancia *nigra* reticulada, el pálido ventral y el núcleo parabraquial (Kalén *et al.*, 1989; Gervasoni *et al.*, 2000). Por otra parte, las aferencias glutamatérgicas proceden de la habénula lateral (Stern *et al.*, 1981), la corteza prefrontal medial (Hou *et al.*, 2012), la amígdala, varias áreas hipotalámicas, el núcleo parabraquial y el núcleo laterodorsal tegmental (Lee *et al.*, 2003).

Las aferencias colinérgicas provienen del núcleo vestibular superior, a través de la vía del fascículo medio longitudinal (Kalén *et al.*, 1985; Jacobs y Azmitia, 1992), y de los núcleos pedunculopontino y laterodorsal tegmental (Woolf y Butcher, 1989). Además, se han descrito entradas hipotalámicas al NDR que se originan principalmente en el área preóptica y el núcleo hipotalámico lateral (Sakai *et al.*, 1977), constituidas por fibras histaminérgicas y

peptidérgicas (Krieger, 1983). Por último, las entradas de la sustancia gris periacueductal también suministran varios neuropéptidos (Jacobs y Azmitia, 1992).

### 1.1.3. Eferencias del NDR

El NDR envía proyecciones 5-HTérgicas a diversas áreas encefálicas, siendo el principal origen de inervación 5-HTérgica el cerebro anterior (Monti, 2010).

En la parte rostral del rafé dorsal se encuentran neuronas que proyectan al núcleo caudado-putamen, la sustancia *nigra* y la amígdala (Dray *et al.*, 1978; van der Kooy y Hattori, 1980; Imai *et al.*, 1986). La región media del NDR envía proyecciones axónicas a la corteza prefrontal medial y lateral (Hajós *et al.*, 1998; Celada *et al.*, 2001; Puig *et al.*, 2005; Hou, *et al.*, 2012; Bang y Commons, 2012), el núcleo *accumbens* (Bang y Commons, 2012), el hipotálamo, el hipocampo y la amígdala (Köhler y Steinbusch, 1982; Sarter y Markowitsch, 1984; Imai *et al.*, 1986; van Bockstaele *et al.*, 1993; Waselus *et al.*, 2011). La región caudal del NDR contiene neuronas que proyectan a la amígdala, el hipocampo, el locus *coeruleus*, el *septum* y la corteza entorrinal (De Olmos y Heimer, 1980; Köhler y Steinbusch, 1982; Imai *et al.*, 1986; Abrams *et al.*, 2004).

Puesto que las neuronas 5-HTérgicas tienen proyecciones hacia diversas regiones rostrales y caudales, algunos autores han dividido las proyecciones eferentes del NDR en descendentes y ascendentes. Las vías descendentes son cuatro: la bulboespinal, la cerebelar, la propriobulbar y la vía descendente que inerva: el locus *coeruleus*, el núcleo tegmental dorsal, el núcleo del rafé pontino, el cerebelo, la parte inferior del tronco cerebral y la médula espinal (Michelsen, *et al.*, 2007).

Las vías ascendentes son tres: la medial, la dorsal y la ventral (Fig. 1.3), las dos últimas son las proyecciones eferentes más importantes. Los principales objetivos de las vías ascendentes son el cerebro anterior, siendo el núcleo caudado-putamen el que recibe mayor inervación (Michelsen *et al.*, 2007). La vía ascendente dorsal se eleva del NDR medial al rostral e inerva el estriado y el *globus pallidus*; la vía ascendente localizada en el fascículo medio longitudinal ventral recibe fibras de las alas laterales y del subnúcleo ventromedial del NDR (Jacobs y Azmitia, 1992; Michelsen *et al.*, 2007). El principal objetivo de la vía

ascendente medial es la sustancia *nigra*; aunque también inerva el septum, el hipocampo y la corteza cingulada (Azmitia y Henriksen, 1976; Azmitia y Segal, 1978; Jacobs y Azmitia, 1992). La vía ascendente ventral inerva diversas áreas, las principales son los núcleos talámico e hipotalámico, la habénula, el *septum*, la amígdala, la corteza, el bulbo olfatorio, el núcleo interpeduncular y el cuerpo geniculado (Michelsen *et al.*, 2007).

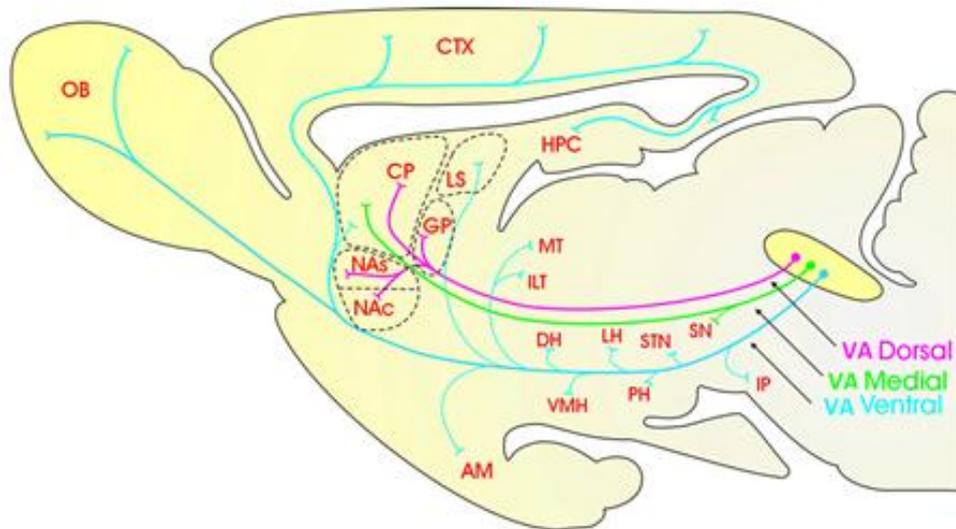


Figura 1.3. Esquema de las tres vías ascendentes (VA) del NDR (dorsal, medial y ventral) y sus principales objetivos. Corteza (CTX), bulbo olfatorio (OB), caudado-putamen (CP), *septum* lateral (LS), *globus pallidus* (GP), núcleo *accumbens* (NAC), *shell* del núcleo *accumbens* (NAS), hipocampo (HPC), tálamo medial (MT), tálamo intralaminar (ILT), hipotálamo dorsal (DH), área lateral hipotalámica (LH), núcleo subtalámico (STN), sustancia *nigra* (SN), amígdala (AM), núcleo hipotalámico ventromedial (VMN), área hipotalámica posterior (PH) y núcleo interpeduncular (IP). Las siglas son referentes al nombre del área en inglés (modificado de Michelsen *et al.*, 2007).

## 1.2. Neuronas 5-HTérgicas del NDR

La 5-HT es un mensajero y regulador neuroquímico. Las neuronas 5-HTérgicas contienen la enzima L-triptofano-5-monooxigenasa, mejor conocida como triptófano hidroxilasa (TPH), la cual hidroxila el aminoácido L-triptofano a 5-hidroxitriptofano (5-HTP, por sus siglas en inglés); existen dos isoformas de la TPH: Tph1 y Tph2, la segunda se expresa exclusivamente en el cerebro (Hensler, 2012). Posteriormente, el 5-HTP es descarboxilado a 5-HT por la L-aminoácido aromático descarboxilasa (AADC, por sus siglas en inglés) (Hensler, 2012). La 5-HT es liberada al espacio extrasináptico mediante un proceso de exocitosis dependiente de calcio.

La acción de la 5-HT en el espacio extracelular es finalizada mediante su recaptura, que se lleva a cabo principalmente en las terminales 5-HTérgicas, mediante el transportador de 5-HT (5-HTT o SERT) (Hensler, 2006; Hensler, 2012). La 5-HT es metabolizada a ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA); el proceso se efectúa a través de la acción de la enzima monoaminooxidasa (MAO) que, por un proceso de oxidación, desplaza el grupo amino para dar 5-hidroxi-indolacetaldehído, el cual es oxidado por la aldehído deshidrogenasa a 5-HIAA (Boadle-Biber, 1993).

Morfológicamente, las células 5-HTérgicas pueden ser: redondas, ovaladas, triangulares, fusiformes, bipolares o multipolares (Diaz-Cintra *et al.*, 1981; Calizo *et al.*, 2011). En el NDR las neuronas 5-HTérgicas se localizan principalmente en la línea media o cerca de ésta, la cual abarca desde el acueducto hasta el área entre el fascículo medio; además, se encuentran agrupadas (Jacobs y Azmitia, 1992).

Las células 5-HTérgicas del NDR han sido ampliamente caracterizadas. Aghajanian y Vandermaelen (1983) las describieron como células con un patrón de disparo regular y lento (1–2 espigas/segundo), las cuales presentan una posthiperpolarización (AHP) lenta (200–800 ms) y con una gran amplitud (10–20 mV). Además, exhiben un potencial de acción de una duración de  $\approx 4.9$  ms (medición tomada en la base), cuya amplitud varía entre 60 y 84 mV (Vandermaelen y Aghajanian, 1983). Otra característica importante es que presentan una inflexión en la parte repolarizante del potencial de acción (Vandermaelen y Aghajanian, 1983; Beck *et al.*, 2004). Las células 5-HTérgicas pueden ser silentes o espontáneamente activas y muestran una resistencia de entrada que puede variar de 150 a 400 M $\Omega$  (Vandermaelen y Aghajanian, 1983; Beck *et al.*, 2004).

### 1.3. Neuronas GABAérgicas

El ácido gamma ( $\gamma$ )-aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio en el cerebro adulto. Es sintetizado por la descarboxilación del glutamato, mediante la catalización de la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD, por sus siglas en inglés), la cual existe en dos isoformas (GAD65 y GAD67) que difieren en sus propiedades cinéticas y catalíticas (Walls *et al.*, 2010; Rowley *et al.*, 2012). La GAD65 se concentra más en los axones, mientras que la GAD67 está más concentrada en los somas y dendritas (Kleppner y Tobin, 2002; Schousboe y Waagepetersen, 2009; Zhao, 2013).

El GABA es degradado por la GABA-Transaminasa (GABA-T), una enzima mitocondrial, a succinato semialdehído (SSA), el cual es oxidado por la succinato semialdehído deshidrogenasa (SSADH) a succinato (Rowley *et al.*, 2012); además, es transportado a través de la membrana de células nerviosas y gliales por transportadores de GABA (GATs, por sus siglas en inglés), localizados en la membrana plasmática.

Existe una gran variedad de neuronas que expresan GABA en el cerebro; éstas se han clasificado de acuerdo con sus características morfológicas, su localización y sus propiedades fisiológicas. La determinación de las neuronas GABAérgicas se ha realizado principalmente en las neuronas de la corteza, donde se han considerado las características electrofisiológicas e inmunohistoquímicas por separado y en conjunto para su clasificación. La característica que interesa en el presente trabajo es la electrofisiológica, por lo que se considerará el tipo de disparo de las células para su clasificación.

Desde el punto de vista electrofisiológico las neuronas GABAérgicas se han clasificado principalmente en neuronas “*fast spiking*” (FS) caracterizadas por una alta frecuencia de disparo, neuronas “*regular spiking*” (RS; o *regular spiking - non pyramidal*, RSNP) que exhiben un tipo de disparo lento y regular de potenciales de acción (Kawaguchi y Kubota, 1997; Cauli *et al.*, 2000; Contreras, 2004; Smith y Perrier, 2006), neuronas “*low threshold*” (LTS) que exhiben una despolarización dependiente de la activación de una corriente de calcio de bajo umbral; y también se considera un conjunto de células que presentan potenciales de acción en ráfagas: “*intrinsically burst*” (IB) y “*fast repetitive bursting*” (FRB) (Foehring *et al.*, 1991; Contreras, 2004). Además, se han registrado otros tipos de células

GABAérgicas, las cuales suelen ser subtipos o variaciones de las anteriores (Kawaguchi y Kubota, 1997; Cauli *et al.*, 2000; Contreras, 2004; Butt *et al.*, 2005; Smith y Perrier, 2006; Ascoli, 2008).

En la corteza cerebral, las células RS responden ante una inyección de corriente despolarizante de 0.4 nA, con disparos repetitivos (Fig. 1.4A) o con un único disparo, presentan acomodación variable y disparan a frecuencias de 200–300 Hz (Contreras, 2004). Estas células se pueden subdividir con base en su grado de adaptación en: adaptadoras rápidas (con frecuencias que decaen a cero en pocas décimas de milisegundos) y adaptadoras lentas (con frecuencias que pueden decaer a la mitad del valor inicial en pocos cientos de milisegundos) (Contreras, 2004). El potencial de acción, de las células RS tiene una duración de  $\approx 1$  ms y presenta una pequeña postdespolarización (ADP, por sus siglas en inglés) justo antes del inicio de la AHP (Contreras, 2004).

Las células LTS generan espigas breves (rango medio de  $0.52 \pm 0.03$  ms; Bacci *et al.*, 2003) y no muestran inactivación. Cuando se aplica un pulso de corriente despolarizante, presentan ráfagas de disparo solamente al inicio del pulso y, si la despolarización se sostiene, cada ráfaga es seguida por un tren de disparos individuales con cortas secuencias de AHP–ADP (Foehring *et al.*, 1991; de la Peña y Geijo-Barrientos, 2000; Contreras, 2004). Las ráfagas iniciales se deben a un potencial de meseta dependiente de una corriente de calcio de bajo umbral de activación (Fig. 1.4B) (Tepper y Bolam, 2004). Las células LTS tienen una resistencia de entrada alta ( $> 600$  M $\Omega$ ) y muchas exhiben actividad espontánea tónica; además, presentan una adaptación pronunciada del disparo (Kawaguchi y Kubota 1993; Tepper *et al.*, 2010). Las neuronas “*low threshold*” poseen además una corriente catiónica activada por hiperpolarización, llamada corriente h (I<sub>h</sub>). En registros de fijación de corriente, cuando se aplica un pulso hiperpolarizante, la I<sub>h</sub> produce un desplazamiento del potencial de membrana hacia valores positivos de tal manera que en algunas células se producen ráfagas de potenciales de acción al terminar el pulso de corriente hiperpolarizante lo cual se denomina comúnmente como disparo al *off* (Benes *et al.*, 2001; Bacci *et al.*, 2003).

Las células FS presentan espigas breves con disparos de una duración de 0.4 a 0.6 ms (Contreras, 2004), y una pronunciada ( $24.3 \pm 0.7$  mV; Bacci *et al.*, 2003) y corta AHP (2–5 ms; Kawaguchi y Kubota 1993) (Fig. 1.4 C). Ante inyecciones de corriente despolarizantes, de 0.3 nA, generan trenes regulares de potenciales de acción, alcanzando frecuencias de hasta

800 Hz y sin presentar acomodación (Contreras, 2004). Pueden presentar o no una pequeña adaptación al disparar los potenciales de acción y exhiben una baja resistencia de entrada (50–150 M $\Omega$ ) (Foehring *et al.*, 1991; Bacci *et al.*, 2003; Contreras, 2004; Tepper y Bolam, 2004; Tepper *et al.*, 2010).

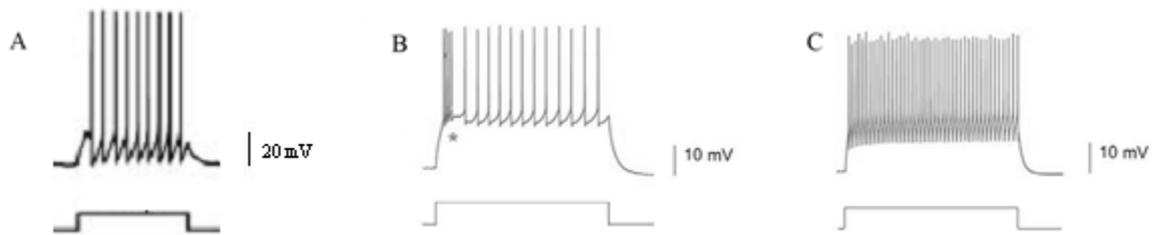


Figura 1.4. Registros electrofisiológicos de los tres tipos principales de neuronas GABAérgicas. A, respuesta de una célula RS, ante la aplicación de un pulso de 20 pA (modificado Smith y Perrier, 2006). B, respuesta de una célula LTS, ante un pulso de 1.0 nA (modificado de Tepper y Bolam, 2005). C, respuesta de una célula FS, ante un pulso de 1.0 nA (modificado de Tepper y Bolam, 2005).

Las células IB disparan en ráfagas repetitivas de 3–5 potenciales de acción, a 200 Hz, ante un pulso de corriente de 0.94 nA, con una pronunciada despolarización y presentan inactivación (Agmon y Connors, 1992; Contreras, 2004). Las células FRB, al igual que las IB, generan ráfagas, pero éstas difieren en que presentan una mayor frecuencia de disparo (200–600 Hz); asimismo, ante inyecciones de corriente despolarizante de 0.3 nA no presentan inactivación, los potenciales de acción son breves (0.6 ms) y presentan una AHP de amplitud pequeña, seguida de una ADP a partir de la cual se da el siguiente disparo (Foehring *et al.*, 1991; Contreras, 2004).

Las características electrofisiológicas se pueden relacionar con características neuroquímicas; sin embargo, algunos estudios se centran principalmente en las características neuroquímicas, y a partir de éstas describen los rasgos electrofisiológicos.

Neuroquímicamente, se han reportado tres principales subtipos de neuronas GABAérgicas neocorticales: el primer grupo está constituido por células que expresan simultáneamente somatostatina, óxido nítrico sintasa y neuropéptido Y (SOM/NOS/NPY) en diferentes combinaciones; los otros dos tipos expresan proteínas de unión a calcio, uno expresa parvalbúmina y el otro calretinina (Tepper y Bolam, 2004). Estos tres tipos de neuronas GABAérgicas se han encontrado en diversas regiones cerebrales, tales como el neocórtico, la médula espinal, la amígdala lateral, la corteza y en el núcleo del tracto solitario (Tepper y Bolam, 2004; Patridge *et al.*, 2009; Sosulina *et al.*, 2010; Vitalis y Rossier, 2010; Wang y Bradley, 2010; Polgar *et al.*, 2011).

Las interneuronas positivas para SOM/NOS/NPY son medianas ( $\approx 9$  a  $25 \mu\text{m}$ ) y electrofisiológicamente son caracterizadas como LTS en la corteza y el neocórtico (Bacci *et al.*, 2003; Tepper y Bolam, 2004). En la corteza también se han descrito como células RS o como “*burst spiking*”, en las capas II/ III y V (Kawaguchi y Kubota 1996; Benes *et al.*, 2001) o simplemente LTS.

Las interneuronas positivas para parvalbúmina (PV) son referidas como interneuronas FS y su soma tiene un tamaño de  $16$  a  $18 \mu\text{m}$  de diámetro. Esta proteína se expresa principalmente en neuronas “*chandelier*” y “*basket-cells*” que se encuentran en la corteza cerebral, el hipocampo y el neocórtico (Fonseca *et al.*, 1993; Cauli *et al.*, 1997; Benes *et al.*, 2001; Tepper y Bolam, 2004; Tepper *et al.*, 2010; Bartos y Elgueta, 2012). Las interneuronas positivas para calretinina (CR) son de tamaño medio ( $12$  a  $20 \mu\text{m}$  de diámetro) y superan en número (3 ó 4:1) a las interneuronas PV y SOM/NOS/NPY en el neocórtico (Contreras, 2004; Tepper *et al.*, 2010).

### **1.3.1. Neuronas GABAérgicas del NDR**

Hasta el momento, no existe una clasificación electrofisiológica de las neuronas GABAérgicas en el NDR pues la mayoría de los estudios anteriores sólo se concentran en las neuronas 5-HTérgicas, describiendo al resto de las neuronas del núcleo simplemente como no 5-HTérgicas (Aghajanian *et al.*, 1978; Kirby *et al.*, 2003; Beck *et al.*, 2004; Monti, 2010; Kelly y Donner, 2011).

Una de las pocas investigaciones que se centra en el estudio de las neuronas GABAérgicas del NDR es la realizada por Gocho *et al.* (2012), quienes utilizaron una generación de ratones *knock-in* de GAD67 conjugada a la proteína verde fluorescente (GFP). Sus resultados muestran que las neuronas con inmuno-reactividad positiva (GFP+) para GABA se encuentran preferentemente en la zona lateral del NDR, mientras que las neuronas con inmuno-reactividad negativa (GFP-) se localizan principalmente en la línea media.

En el NDR, una población significativa de neuronas 5-HTérgicas coexpresan varios neurotransmisores, incluyendo dopamina, GABA, glutamato, óxido nítrico y neuropéptidos (Hioki *et al.*, 2010; Shikanai *et al.*, 2012). Así, en el rafé se han localizado células que muestran inmuno-reactividad positiva tanto para 5-HT como para GABA, las cuales se pueden considerar como un tercer grupo de neuronas en este núcleo (Stamp y Semba, 1995; Shikanai *et al.*, 2012). En total sólo el 4% de las células 5-HTérgicas del rafé expresan GAD, de las cuales la mayor concentración (80–95%) se localiza en los núcleos del rafé *magnus* y del rafé *obscurus* (Stamp y Semba, 1995). Dentro del NDR, la mayor cantidad de neuronas que coexpresan 5-HT y GABA se encuentran en la zona de las alas laterales, constituyendo el 12% de la población celular de esta región (Shikanai *et al.*, 2012). La población 5-HT/GABA presenta un decremento entre las 4 y 8 semanas de edad en ratas (Shikanai *et al.*, 2012).

Las células 5-HT/GABA del rafé presentan una frecuencia de disparo significativamente menor que las neuronas 5-HTérgicas y las GABAérgicas (Tabla 1.1), ante una corriente de 0.3 nA (Shikanai *et al.*, 2012). Debido a las características neuroquímicas y electrofisiológicas propias de las células 5-HT/GAD67 (Tabla 1.1), que difieren con las de los grupos de neuronas GABAérgicas y 5-HTérgicas, se pueden considerar como una población única (Shikanai *et al.*, 2012).

Neuronas	5-HT	5-HT/GAD67	GAD67
Potencial de reposo de la membrana (mV)	-61.82 ± 1.67	-64.91 ± 4.14	-52.13 ± 17.17
Umbral (mV)	-27.36 ± 1.05	-31.06 ± 1.50	-24.06 ± 7.04
Amplitud del potencial de acción (mV)	70.37 ± 2.65	68.94 ± 3.94	45.30 ± 5.59 *
Duración del potencial de acción (ms)	2.22 ± 0.12	1.98 ± 0.24	1.78 ± 0.22
Posthiperpolarización (mV)	-25.66 ± 1.22	-24.14 ± 1.31	-29.00 ± 7.91

Frecuencia de disparo (Hz)	37.42 ± 3.26	12.90 ± 1.77 <sup>#</sup>	87.50 ± 19.62
----------------------------	--------------	---------------------------	---------------

Tabla 1.1. Parámetros electrofisiológicos de las neuronas 5-HT, 5-HT/GAD67 y GAD67 en el NDR de rata. (\*) Diferencia significativa observada en las neuronas GAD67 respecto a los tres grupos estudiados ( $F_{(2,54)}= 4.372$ ; /  $p < 0.05$ ). (<sup>#</sup>) Diferencia significativa observada en las neuronas 5-HT/GAD67 respecto a las neuronas 5-HT y GAD67 ( $F_{(2,54)}= 20.91$ ;  $p < 0.05$ ) (modificado de Shikanai *et al.*, 2012).

#### 1.4. Relación fisiológica entre las neuronas GABAérgicas y 5-HTérgicas del NDR

En los núcleos del rafé, las neuronas GABAérgicas y 5-HTérgicas interactúan entre ellas (Belin *et al.*, 1983; Liu *et al.*, 2000; Broadbelt *et al.*, 2010). Se ha demostrado que las neuronas GABAérgicas suprimen la actividad de un gran número de neuronas 5-HTérgicas (Gallagher y Aghajanian, 1976; Abellán *et al.*, 2000; Allers y Sharp, 2003; Boothman *et al.*, 2006; Bouwknecht *et al.*, 2007).

La interacción entre las neuronas 5-HTérgicas y GABAérgicas, en el NDR, es llevada a cabo mediante una retroalimentación donde la 5-HT excita o inhibe a las neuronas GABAérgicas y el GABA inhibe a las neuronas 5-HTérgicas (Liu *et al.*, 2000). La retroalimentación se efectúa ya que las neuronas GABAérgicas poseen los receptores 5-HTérgicos 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>2C</sub>, mientras que las neuronas 5-HTérgicas poseen los receptores GABAérgicos GABA<sub>A</sub> (Liu *et al.*, 2000; Serrats *et al.*, 2005; Broadbelt *et al.*, 2010) y GABA<sub>B</sub> (Abellán *et al.*, 2000) (Fig. 1.5). La expresión de los receptores ha sido estudiada mediante la aplicación de agonistas y antagonistas selectivos (Becquet *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 2000; Cao *et al.*, 2006; Harsing, 2006; Broadbelt *et al.*, 2010), así como por medio de procedimientos de hibridación *in situ* doble de los ARNm de los receptores y de los anticuerpos GAD y 5-HTT, para células GABAérgicas y 5-HTérgicas respectivamente (Liu *et al.*, 2000; Serrats *et al.*, 2005).

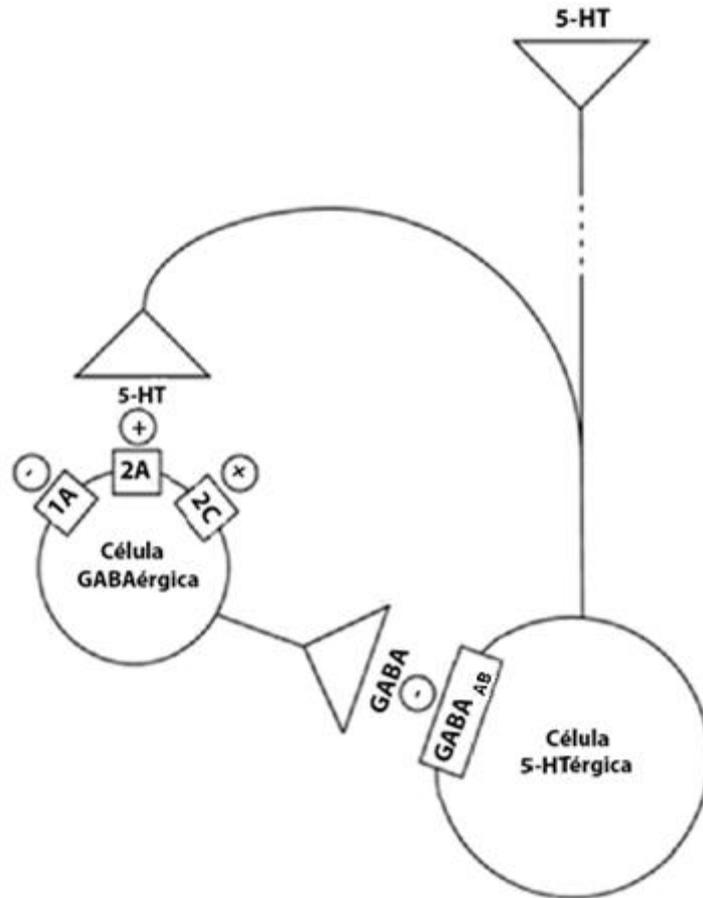


Figura 1.5. Representación esquemática de la propuesta de un circuito de retroalimentación local en el NDR, el cual involucra conexiones recíprocas entre las células 5-HTérgicas y GABAérgicas (modificado de Liu *et al.*, 2000).

El GABA inhibe a las células 5-HTérgicas mediante el receptor GABA<sub>A</sub>. Estudios de microdiálisis muestran que la aplicación de bicuculina en el NDR, un antagonista del receptor GABA<sub>A</sub>, incrementa la liberación de 5-HT en el núcleo (Tao *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2000); además, la estimulación de los receptores GABA<sub>A</sub>, mediante agonistas, reduce la actividad de las neuronas 5-HTérgicas y por lo tanto la liberación de 5-HT (Becquet *et al.*, 1990; Tao *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2000; Cao *et al.*, 2006; Broadbelt *et al.*, 2010).

Las células 5-HTérgicas excitan a las neuronas GABAérgicas mediante los receptores 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>2C</sub>. Estudios electrofisiológicos han mostrado que la aplicación de 5-HT, en el NDR ventral, incrementa la frecuencia de las corrientes postsinápticas inhibitorias (IPSC) en

células 5-HTérgicas (Liu *et al.*, 2000); además, se ha reportado que el incremento de las IPSC, generadas por la administración de 5-HT, es bloqueado por antagonistas selectivos de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>2C</sub> (Liu *et al.*, 2000). La activación local de neuronas GABAérgicas, mediante agonistas de receptores 5-HT<sub>2</sub>, contribuye a la inhibición de las neuronas 5-HTérgicas (Liu *et al.*, 2000; Celada *et al.*, 2013; Boothman y Sharp, 2005; Boothman *et al.*, 2006). Por otra parte, en experimentos de hibridación *in situ*, se ha reportado que los receptores 5-HT<sub>2C</sub> se localizan principalmente en las neuronas GABAérgicas de las alas laterales del NDR (Serrats *et al.*, 2005).

La interacción entre células 5-HTérgicas y GABAérgicas es constante pues las IPSCs son generadas en neuronas 5-HTérgicas al activar sus receptores GABA<sub>A</sub> por acción de GABA, liberado por las interneuronas GABAérgicas. Éstas a su vez, son excitadas por la 5-HT a través de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>2C</sub> (Liu *et al.*, 2000). Por otra parte, respecto a la inhibición de las células GABAérgicas por la 5-HT, la aplicación de 8-OH-DPAT, un agonista de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, suprime la liberación de [<sup>3</sup>H]GABA en rebanadas de rafé (Liu *et al.*, 2000; Harsing, 2006); además, la aplicación de WAY-100635, un antagonista de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, refuerza el incremento de IPSCs registradas en las neuronas 5-HTérgicas (Liu *et al.*, 2000). En concordancia con estos datos, estudios de biología molecular han demostrado la presencia de ARNm de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> en neuronas GABAérgicas (Serrats *et al.*, 2003). Puesto que los receptores 5-HT<sub>1A</sub> poseen mayor afinidad por la 5-HT que los receptores 5-HT<sub>2A-C</sub> (Saxena *et al.*, 1995), es posible proponer un mecanismo de retroalimentación mediante el cual las neuronas 5-HTérgicas regulan su propio disparo modulando la entrada GABAérgica (Liu *et al.*, 2000) (Fig. 1.5).

## **2. Justificación**

Las neuronas 5-HTérgicas del NDR son de suma importancia en diversos procesos fisiológicos y conductuales. Sin embargo, su acción depende de la interacción que tienen con otras neuronas del mismo núcleo, tales como las neuronas GABAérgicas. Pese a que la modulación de la actividad de las neuronas 5-HTérgicas por GABA ha sido estudiada previamente, no se ha llevado a cabo una caracterización electrofisiológica de las células

GABAérgicas. Como se ha demostrado en otras estructuras cerebrales, los diversos tipos de neuronas GABAérgicas actúan de manera distinta sobre sus células blanco; por tanto, su caracterización dentro del NDR ayudará a comprender la interacción que presentan con las otras neuronas del NDR, optimizando así la comprensión de la fisiología de este núcleo.

### **3. Hipótesis**

Las neuronas GABAérgicas del núcleo dorsal del raqué exhibirán diversas propiedades electrofisiológicas que permitirán clasificarlas en subgrupos, de acuerdo con sus características representativas, y con base en las características de células GABAérgicas reportadas en otras áreas cerebrales.

### **4. Objetivos**

El objetivo general de este trabajo fue caracterizar electrofisiológicamente a las interneuronas GABAérgicas del núcleo dorsal del raqué, así como determinar su naturaleza GABAérgica.

En tanto que los objetivos particulares fueron realizar la clasificación electrofisiológica de las interneuronas GABAérgicas del NDR, utilizando la técnica de *patch-clamp* en la configuración de célula completa, mediante la determinación de los siguientes parámetros: resistencia de entrada, frecuencia de disparo (total, inicial y final), constante de tiempo de las curvas de carga (*Tau*,  $\tau$ ), parámetros del potencial de acción (duración y amplitud) y de su posthiperpolarización (duración, amplitud y *Tau*); así como la realización de curvas de relación corriente-voltaje.

Asimismo, mediante una técnica inmunohistoquímica, usando un anticuerpo contra la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD65/67) se corroboró la naturaleza GABAérgica de las células con registro electrofisiológico GABAérgico.

## 5. Metodología

### 5.1. Obtención de rebanadas de cerebro

Todos los procedimientos fueron llevados a cabo de acuerdo con la norma oficial mexicana de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). Se usaron 29 ratas Wistar macho con una edad de 18 a 20 días postnatales, las cuales se sacrificaron mediante decapitación y consecutivamente se extrajo el cerebro para colocarlo en una solución Ringer ( $\approx 4^{\circ}\text{C}$ ), conteniendo en mM: 125 NaCl, 3 KCl, 25  $\text{NaHCO}_3$ , 1.25  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2  $\text{MgCl}_2$ , 2  $\text{CaCl}_2$ , 25 glucosa; con una osmolaridad de 300 mOsm/L y un pH de 7.3. La solución se mantuvo oxigenada con 95%  $\text{O}_2$ /5%  $\text{CO}_2$ . Mediante el uso de un vibratomo (*Vibratome* 1500 Comp., St. Louis, MO) se obtuvieron cortes coronales del mesencéfalo de 350  $\mu\text{m}$  de grosor. Se seleccionaron las rebanadas que contenían el NDR y se trasladaron a un vaso de precipitados con solución Ringer a temperatura ambiente y con oxigenación (95%  $\text{O}_2$ /5%  $\text{CO}_2$ ), dejando transcurrir de 40 minutos a 1 hora para su posterior registro electrofisiológico. Se usaron de 1 a 4 rebanadas por rata, y una célula por cada rebanada.

### 5.2. Registros electrofisiológicos

Transcurrido el tiempo de estabilización de las rebanadas, se prosiguió con el registro electrofisiológico, para lo cual se tomó una rebanada y se colocó en una cámara de registro (*plexiglass*). La rebanada se perfundió constantemente con la solución Ringer, a un flujo de 3-4 ml/min y a una temperatura de  $\approx 33^{\circ}\text{C}$ . Las neuronas fueron visualizadas utilizando un microscopio dotado con un sistema de video en infrarrojo (BX51WI, *Olympus Instruments, Japan*) y un objetivo de inmersión en agua (60X). Una vez que la rebanada estaba en la cámara, se identificó la zona de trabajo (NDR) y con el objetivo de inmersión se seleccionó una célula para realizar el registro.

Los registros se realizaron mediante la técnica de *patch-clamp*, en configuración de célula completa. Para ello, se utilizaron micropipetas de borosilicato (WPI, Sarasota, FL) con una resistencia de 4-7  $\text{M}\Omega$ , llenadas con una solución interna que consistió en mM: 119 gluconato

de  $K^+$ , 1  $MgCl_2$ , 10 HEPES, 0.5 EGTA, 2  $Na_2$ -ATP, 0.7  $Na_2$ -GTP y biocitina 0.5%, con un pH de 7.2–7.3 ajustado con KOH y una osmolaridad de 290–300 mOsm/L. Se obtuvieron registros mediante las modalidades de fijación de voltaje y fijación de corriente, con un amplificador Multiclamp 700B (*Axon Instruments, Union City, CA*). La señal se filtró a 5kHz y se digitalizó usando una interfase *Digidata 1322A (Axon Instruments)*. Los registros obtenidos se monitorearon y se almacenaron con el programa pClamp 10 para su posterior análisis. Todas las células fueron registradas en el NDR, en las coordenadas bregma -8.00 a -7.30 mm y en las coordenadas interneural de 1.00 a 1.70 mm de acuerdo con el Atlas Paxinos y Watson (1998).

Durante los registros, se aplicaron pulsos cuadrados de corriente o comandos de voltaje hiperpolarizantes y despolarizantes. A partir de los registros obtenidos en fijación de corriente se calculó la frecuencia de disparo total, y las frecuencias de disparo instantáneas obtenidas al inicio y al final de cada pulso de corriente despolarizante. También se obtuvieron las curvas de corriente–voltaje (IV) para cada célula, con las cuales se calculó la resistencia de entrada de las células. Con la sobreposición de las curvas IV, obtenidas en fijación de corriente y de voltaje, se corroboró que el sello de la membrana celular en la pipeta se mantuvo estable durante el registro y que, por lo tanto, la resistencia de las células no varió.

Las curvas intensidad-frecuencia (IF) fueron obtenidas a partir de la actividad generada por la aplicación de pulsos de corriente, incrementando gradualmente la intensidad de -80 a 205 pA con una duración del pulso de 2 s. A las células que mantuvieron una tasa de disparo constante durante los pulsos de corriente se les aplicaron corrientes despolarizantes de hasta 355 pA para determinar su máxima frecuencia de disparo. Las relaciones o curvas corriente-voltaje, para la condición de fijación de corriente, fueron obtenidas a partir de las respuestas de voltaje generadas por la aplicación de pulsos de corriente de -150 a 25 pA, con una duración del pulso de 2 s. Mientras que las relaciones corriente-voltaje, para la condición de fijación de voltaje, se obtuvieron midiendo la amplitud de las corrientes en respuesta a comandos de voltaje aplicados en un rango de -60 a 60 mV y la duración de los comandos de corriente fue de 3 s. Se realizó un análisis de la frecuencia instantánea inicial y final de disparo, la cual se obtuvo ante una inyección de corriente de 115 pA; la frecuencia inicial se obtuvo sacando el inverso del intervalo de tiempo entre los primeros dos potenciales de acción evocados mediante un pulso de corriente despolarizante, análogamente para obtener la frecuencia final se tomaron los dos últimos potenciales de acción. Para obtener el disparo

espontáneo de las células GABAérgicas éstas se registraron en fijación de corriente sin aplicar corriente de mantenimiento (a 0 pA).

Con el objetivo de tener un grupo de comparación, se registraron y analizaron células 5-HTérgicas en el NDR; ya que las características electrofisiológicas de éstas han sido ampliamente estudiadas.

Al terminar el registro, la rebanada se colocó en un papel filtro y se mantuvo dentro de un frasco con paraformaldehído (4%) y ácido pícrico (1%) en PBS (1M), con un pH de 7.4, hasta su posterior procesamiento por inmunohistoquímica.

### **5.3. Inmunohistoquímica**

Se realizó un doble marcado. Primero se utilizó el complejo Cy3-estreptavidina para observar la marca de biocitina, y consecutivamente se usó el anticuerpo anti-GAD65/67 para corroborar la naturaleza GABAérgica de las células. La inmunohistoquímica se realizó mediante la visualización de las rebanadas por medio de microscopía confocal y microscopía de fluorescencia, para corroborar la presencia de la marca en el interior de las neuronas.

Para la realización del proceso de inmunohistoquímica la rebanada se lavó con KPBS y se mantuvo en sacarosa (30%) por media hora. Posteriormente, se incluyó en un cuadro de agar, y una vez solidificado se obtuvieron rebanadas de 40  $\mu\text{m}$  de grosor con un vibratomo. Las rebanadas obtenidas se colocaron en una caja multipozos, que contenía Cy3-estreptavidina, de cuatro a seis horas; para después observarlas en un microscopio de fluorescencia para localizar la célula marcada con biocitina. La rebanada con la célula marcada se incubó en BSA (1%) por media hora e inmediatamente después, se incubó con el anticuerpo anti-GAD65/67 durante dos días. Posteriormente, la rebanada se lavó con PBS/tritón y se incubó con el anticuerpo secundario (*Fluorescein Anti-Rabbit*) por una hora y media. Para finalizar, la rebanada se montó en un portaobjetos para observarla en un microscopio de fluorescencia y, de esta manera, identificar la marca del anticuerpo secundario, para verificar que la célula registrada era GABAérgica. Se tomaron fotografías de las células positivas a GAD65/67 en un microscopio confocal.

#### **5.4. Análisis de datos**

La captura de los datos se realizó en el programa Clampfit 10.2.0.12 (1984-2007, MDS Analytical Technologies) y el análisis de los datos se efectuó con los programas Sigma Plot 12.3 (2011, Systat Software, Inc.) y OriginPro 8 (1991-2007, OriginLab Corporation). Los datos se analizaron mediante la prueba de Mann-Whitney y *Anova* de una vía para estadística no paramétrica. Los resultados se presentaron como el promedio  $\pm$  el error estándar, y tomando una diferencia de  $p < 0.05$  como significativa.

## 6. Resultados

### 6.1. Registros en el NDR

Se clasificaron 68 células (GABAérgicas y 5-HTérgicas); de este total, 50 células (73.53%) estuvieron localizadas a lo largo de la línea media del NDR, desde el acueducto, atravesando las áreas dorsomedial y ventromedial hasta el área que se encuentra entre el fascículo medio longitudinal; mientras que 18 células (26.47%) se localizaron en las zonas laterales del NDR. De las 68 células, 55 células (80.88%) fueron GABAérgicas y 13 células (19.12%) fueron 5-HTérgicas. Del total de células GABAérgicas se registraron 21 células DR-PD (38.18%), 20 células Me (36.36%) y 14 células DR-FA (25.46%). La localización de las células, en el NDR, de cada tipo celular fue de la siguiente forma:

Localización	DR-PD	Me	DR-FA	5-HT
Línea media	13 (61.90%)	18 (90%)	10 (71.43%)	9 (69.23%)
Alas laterales	8 (38.10%)	2 (10%)	4 (28.57%)	4 (30.77%)

Tabla 6.1. Localización de los diferentes tipos de células registradas en el NDR. Células GABAérgicas: DR-PD, disparo regular con postdespolarización. Me, meseta. DR-FA, disparo regular con frecuencia alta. 5-HT, células 5-HTérgicas.

### 6.2. Características electrofisiológicas

Las características electrofisiológicas de las células observadas en el NDR permitieron distinguir tres grupos celulares, los cuales se nombraron de acuerdo a su característica más representativa; se encontraron dos tipos de células que presentaron un patrón de disparo regular. En uno de los tipos celulares, cada potencial de acción era inmediatamente seguido por una postdespolarización (ADP); por lo tanto, se clasificó como “disparo regular con postdespolarización” (DR-PD). El segundo grupo exhibió una frecuencia mayor que los otros grupos GABAérgicos reportados, “disparo regular con frecuencia alta” (DR-FA). El tercer grupo presentó una “meseta” (Me) al inicio del pulso despolarizante.

Las células DR-PD (Fig. 6.1) generaron una frecuencia máxima total de disparos de  $8.4 \pm 1.44$  Hz, ante una aplicación de 115 pA. Las neuronas comenzaron a producir disparos ante

inyecciones de corriente de 25 pA (Fig. 6.1A, trazo en rojo) a partir de un potencial de mantenimiento de -70 mV. La mayoría de estas células alcanzó la frecuencia máxima de disparo a partir de inyecciones de corriente de 100 pA. La característica más importante de este grupo fue que las neuronas generaron potenciales de acción que presentaban una ADP entre la fase rápida y la fase lenta de la AHP; esta característica se presentó marcadamente desde los primeros disparos (Fig. 6.1A, flecha). En la Figura 6.1B se observan los registros de las respuestas de corriente de una célula DR-PD ante diferentes comandos de voltaje. En la Figura 6.1C se muestra el potencial de acción de una célula perteneciente a este grupo, presentando una duración de  $3.04 \pm 0.21$  ms, así como una AHP de  $214.30 \pm 21.61$  ms de duración y  $-13.62 \pm 1.59$  mV de amplitud. La relación corriente-voltaje (Fig. 6.1D) se calculó con los datos obtenidos en los protocolos de fijación de voltaje (círculos negros) y fijación de corriente (círculos blancos); el punto donde se tomó el valor de la respuesta aparece marcado con un asterisco (\*) en las Figuras 6.1A y 6.1B. El 61.91% de estas células se encontró a lo largo de la línea media, mientras que el 38.09% se localizó en las alas laterales del NDR. En la Figura 6.1E se observan fotografías de una célula DR-PD, donde se aprecia la marca de biocitina (rojo), la marca contra el anticuerpo GAD65/67 (verde) y una sobreposición de ambas marcas, lo que permite corroborar que la célula registrada fue GABAérgica.

El segundo grupo lo representan las neuronas Me (Fig. 6.2). La frecuencia máxima de disparo fue de  $9.31 \pm 1.21$  Hz, ante una aplicación de 115 pA. A diferencia del grupo anterior, las células pertenecientes a este grupo comenzaron a generar potenciales de acción ante una menor inyección de corriente (10 pA) (Fig. 6.2A, trazo en rojo), lo cual es congruente con que estas células exhibieron una resistencia de entrada mayor al compararlas con las otras neuronas GABAérgicas (Tabla 6.2). Al inicio de la respuesta, ante los pulsos despolarizantes, se presentó una meseta sobre la cual se montó un tren de potenciales de acción (2–4) (Fig. 6.2A, inserto). Al terminar la meseta, los disparos siguieron un patrón regular a lo largo del resto del pulso de corriente. La frecuencia de disparo alcanzó su máximo valor ante inyecciones despolarizantes de 85 pA. Otra de las características distintivas de este grupo fue la presencia del disparo al *off* (potenciales de acción después del corte de algunos pulsos de corriente hiperpolarizante) (Benes *et al.*, 2001; Bacci *et al.*, 2003).

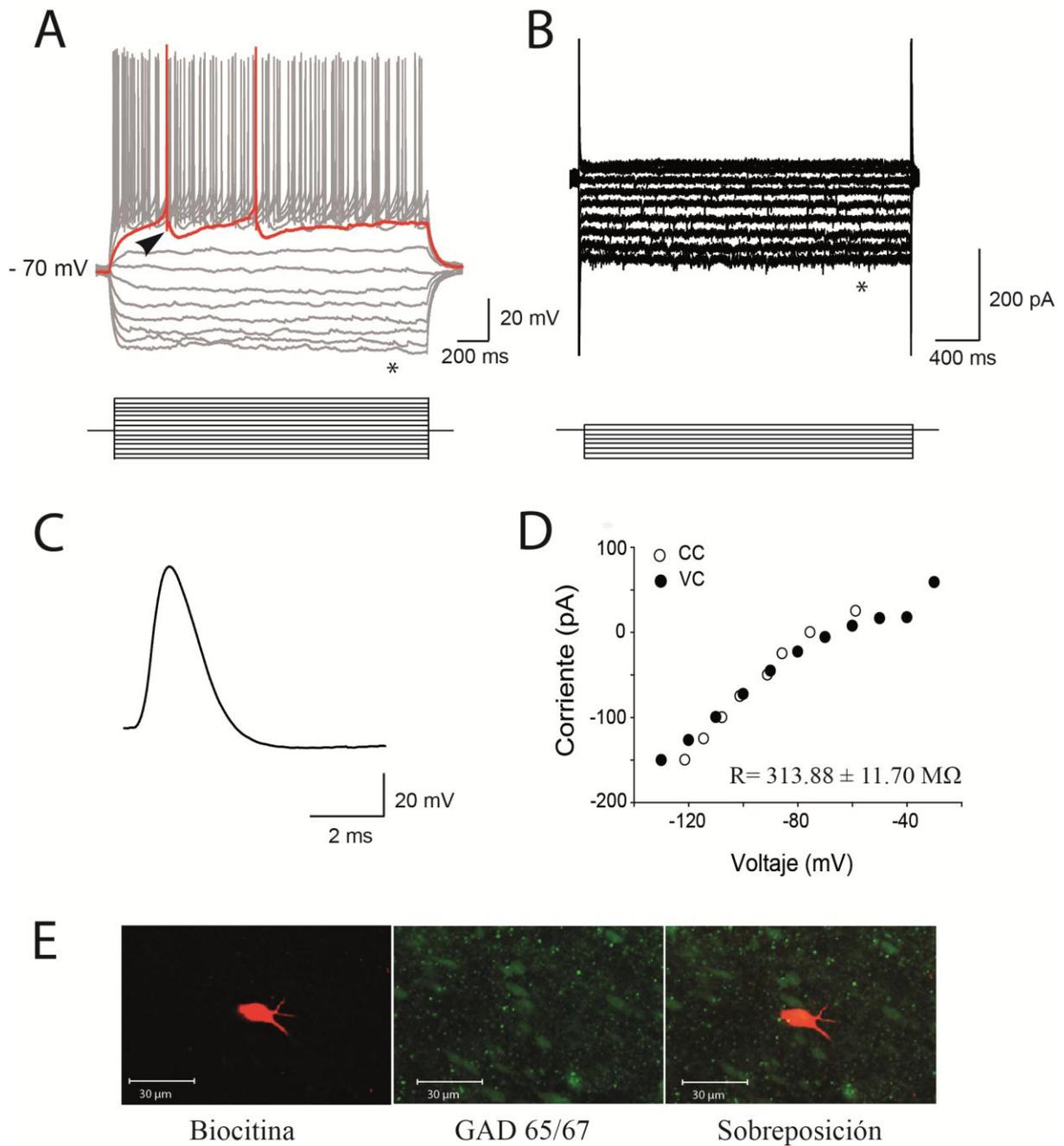


Figura 6.1. Características electrofisiológicas de las neuronas DR-PD (disparo regular con postdespolarización) en el núcleo dorsal del rapé de rata. A, registro representativo del grupo en condiciones de fijación de corriente. En él se observa la generación de los primeros disparos (línea roja), ante una aplicación de 50 pA. La flecha señala la posthiperpolarización y postdespolarización característica de este grupo. B, registro representativo obtenido en condiciones de fijación de voltaje. C, disparo representativo del grupo. D, curva IV. E, fotografía de una célula DR-PD tomada en un microscopio confocal; se observa la marca de biocitina (rojo), la marca contra el anticuerpo GAD65/67 (verde) y la sobreposición de las marcas de biocitina y el anticuerpo.

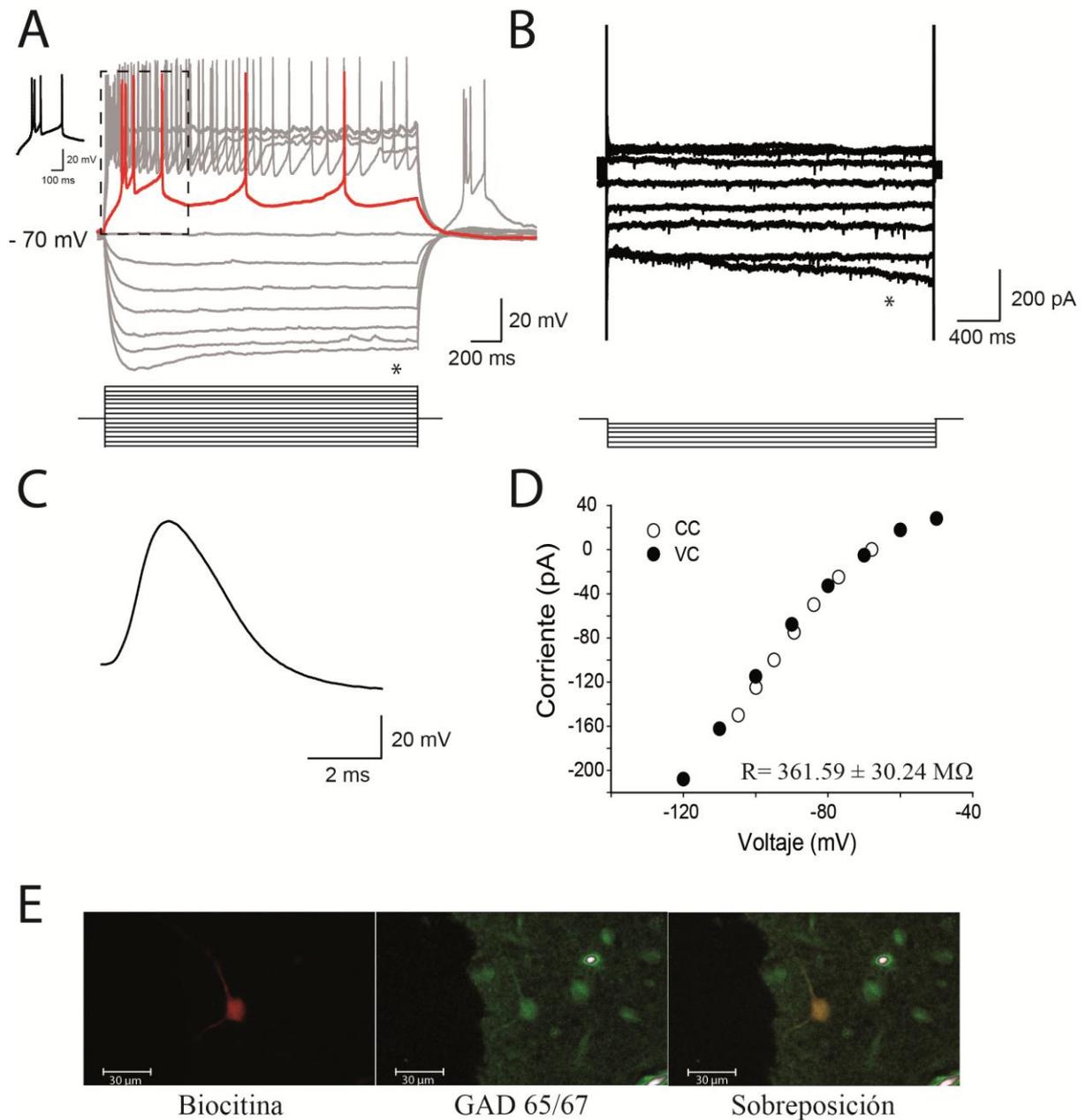


Figura 6.2. Características electrofisiológicas de las neuronas Me (meseta) en el núcleo dorsal del rapé de rata. A, registro representativo del grupo en condiciones de fijación de corriente. En él se observa la generación de los primeros disparos (línea roja), ante una aplicación de 25 pA; inserto a la izquierda una ampliación de la meseta enmarcada en el trazo rojo. Se observa un disparo, del segundo paso hiperpolarizante, al terminar el pulso. B, registro representativo obtenido en condiciones de fijación de voltaje. C, disparo representativo del grupo. D, curva IV. E, fotografía de una célula de Me tomada en un microscopio confocal; se observa la marca de biocitina (rojo), la marca contra el anticuerpo GAD65/67 (verde) y la sobreposición de las marcas de biocitina y el anticuerpo.

La meseta, en el disparo al *off*, presentó características similares a la meseta observada durante la aplicación de los pulsos despolarizantes, incluyendo la cantidad de potenciales. En la Figura 6.2B se observa el registro de las respuestas de corriente de una célula Me ante diferentes comandos de voltaje. El potencial de acción de una célula perteneciente a este grupo se observa en la Figura 6.2C, en donde se aprecia la larga duración de la espiga ( $4.68 \pm 0.34$  ms), siendo el grupo GABAérgico con mayor duración del potencial de acción, medido en la base (Tabla 6.2). Además, este grupo presentó una AHP de  $382.20 \pm 44.70$  ms de duración y  $-15.18 \pm 1.80$  mV de amplitud. La relación corriente–voltaje (Fig. 6.2D) se calculó con los datos obtenidos en los protocolos de fijación de voltaje (círculos negros) y fijación de corriente (círculos blancos) (Figuras 6.2A y 6.2B). El 60% de las células Me generaron una corriente rectificadora entrante de inactivación lenta, posiblemente del tipo  $I_h$  (corriente catiónica activada por hiperpolarización, Biel *et al.*, 2009). El 90% de estas células se encontró a lo largo de la línea media, mientras que el 10% se localizó en las alas laterales del NDR. En la Figura 6.2E se observan fotografías de una célula Me donde se aprecia la marca de biocitina (rojo), la marca contra el anticuerpo GAD65/67 (verde) y una sobreposición de las dos anteriores, lo que permite corroborar que la célula registrada fue GABAérgica.

El tercer grupo lo constituyeron las células DR-FA (Fig. 6.3). Este grupo presentó una frecuencia máxima de disparo de  $20.92 \pm 1.72$  Hz ante una aplicación de 115 pA, la cual fue significativamente mayor que la frecuencia de los otros dos grupos de células GABAérgicas (Tabla 6.2). Al igual que el grupo DR-PD, los primeros disparos los generó ante inyecciones de corriente de 25 pA (Fig. 6.3A, trazo en rojo). Ante el aumento de la corriente despolarizante, se presentó poca o nula adaptación de la frecuencia y se mantuvo el disparo a lo largo del pulso de corriente, sin mostrar acomodación. Los disparos se mantuvieron constantes hasta una inyección de corriente de 355 pA. Un gran porcentaje de estas neuronas (78.57%, Fig. 6.8) exhibió actividad espontánea. En la Figura 6.3B se observa el registro de las respuestas de corriente de una célula DR-FA, ante diferentes comandos de voltaje. El potencial de acción de una neurona perteneciente a este grupo se observa en la Figura 6.3C, en donde se aprecia la duración de la espiga ( $3.94 \pm 0.41$  ms). Este grupo presentó una AHP de  $188.11 \pm 26.97$  ms de duración y  $-15.50 \pm 1.50$  mV de amplitud. La relación corriente–voltaje (Fig. 6.3D) se calculó con los datos obtenidos en los protocolos de fijación de voltaje (círculos negros) y fijación de corriente (círculos blancos) (Figuras 6.3A y 6.3B).

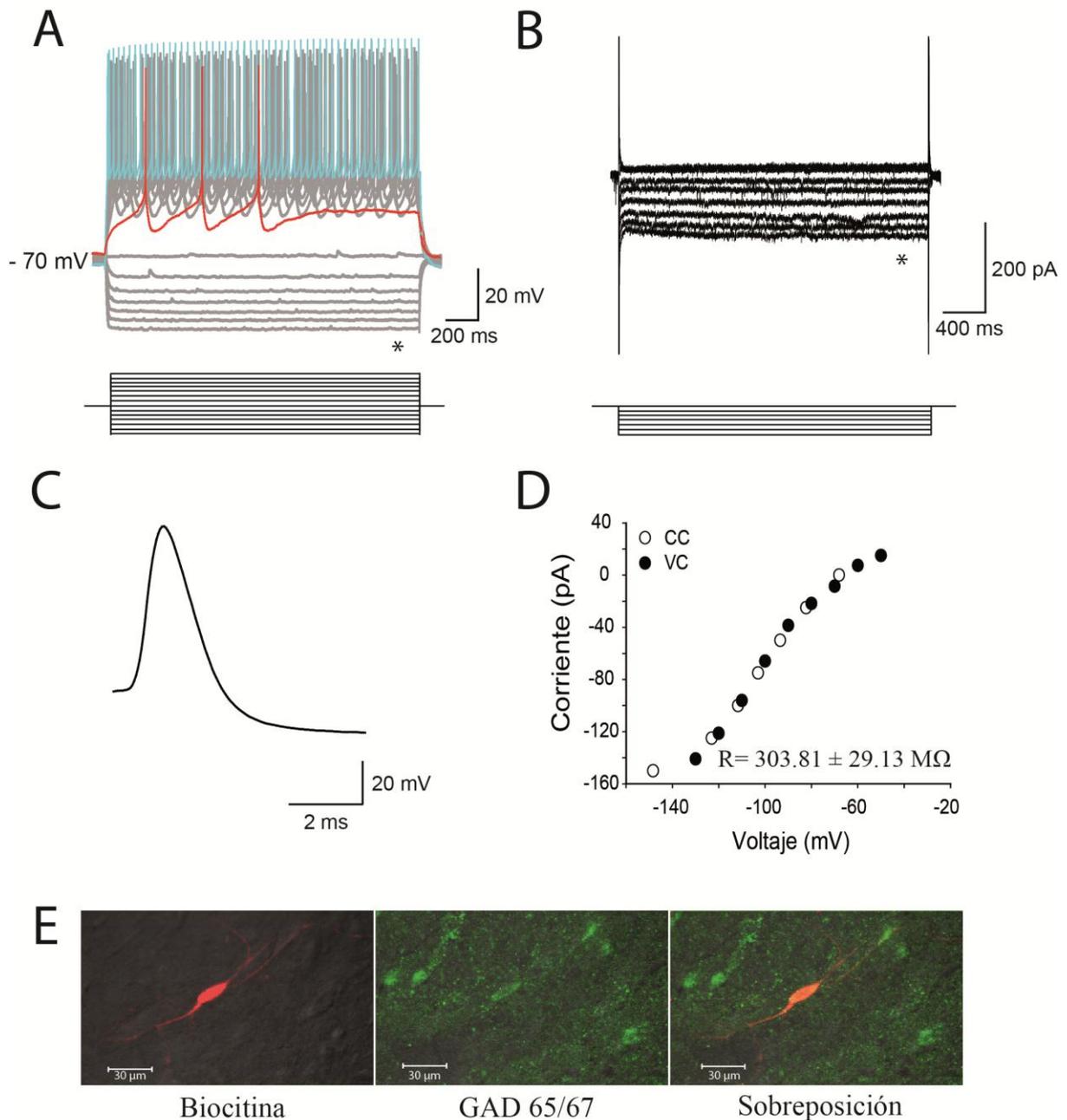


Figura 6.3. Características electrofisiológicas de las neuronas DR-FA (disparo regular con frecuencia alta) en el núcleo dorsal del rafé de rata. A, registro representativo del grupo en condiciones de fijación de corriente. En él se observa la generación de los primeros disparos (línea roja) ante una aplicación de 25 pA, y el último paso despolarizante (línea turquesa) ante una aplicación de 175 pA. B, registro representativo obtenido en condiciones de fijación de voltaje. C, disparo representativo del grupo. D, curva IV. E, fotografía de una célula de DR-FA tomada en un microscopio confocal; se observa la marca de biocitina (rojo), la marca contra el anticuerpo GAD65/67 (verde) y la sobreposición de las marcas de biocitina y el anticuerpo.

El 71.43% de las células DR-FA se encontró a lo largo de la línea media, mientras que el 28.57% se localizó en las alas laterales del NDR. En la Figura 6.3E se observan fotografías de una célula DR-FA donde se aprecia la marca de biocitina (rojo), la marca contra el anticuerpo GAD65/67 (verde) y una sobreposición de las dos anteriores.

Para caracterizar las células 5-HTérgicas (Fig. 6.4) se usaron los mismos protocolos de registro que en las células GABAérgicas y se analizaron de la misma forma. Las neuronas 5-HTérgicas produjeron potenciales de acción de mayor duración ( $5.40 \pm 0.20$  ms) y una tasa de disparo menor al de todos los grupos de neuronas GABAérgicas ( $4.45 \pm 1.86$  Hz) (Tabla 6.2). Las neuronas 5-HTérgicas comenzaron a generar disparos ante una mayor inyección de corriente que las neuronas GABAérgicas (40 pA) (Fig. 6.4A, trazo en rojo). En la Figura 6.4B se observa el registro de las respuestas de corriente de una célula 5-HTérgica, ante diferentes comandos de voltaje. Además de su alta resistencia de entrada (respecto a las GABAérgicas), otras características importantes de las neuronas 5-HTérgicas fueron la mayor duración de la espiga (Tabla 6.2) y la presencia de una inflexión en la fase repolarizante del potencial de acción (Vandermaelen y Aghajanian, 1983) (Fig. 6.4C). Las neuronas 5-HTérgicas presentaron una AHP de  $291.68 \pm 19.83$  ms de duración y  $-19.35 \pm 0.86$  mV de amplitud. La relación corriente-voltaje (Fig. 6.4D) se calculó con los datos obtenidos en los protocolos de fijación de voltaje (círculos negros) y fijación de corriente (círculos blancos) (Figuras 6.4A y 6.4B). El 69.23% de estas células se encontró a lo largo de la línea media, mientras que el 30.77% se localizó en las alas laterales del NDR, lo que concuerda con lo reportado previamente (Allers y Sharp, 2003). En la Figura 6.4E se muestran fotografías de una célula 5-HTérgica, donde se aprecia la marca de biocitina (rojo), la marca contra TPH (verde) y una sobreposición de las dos anteriores.

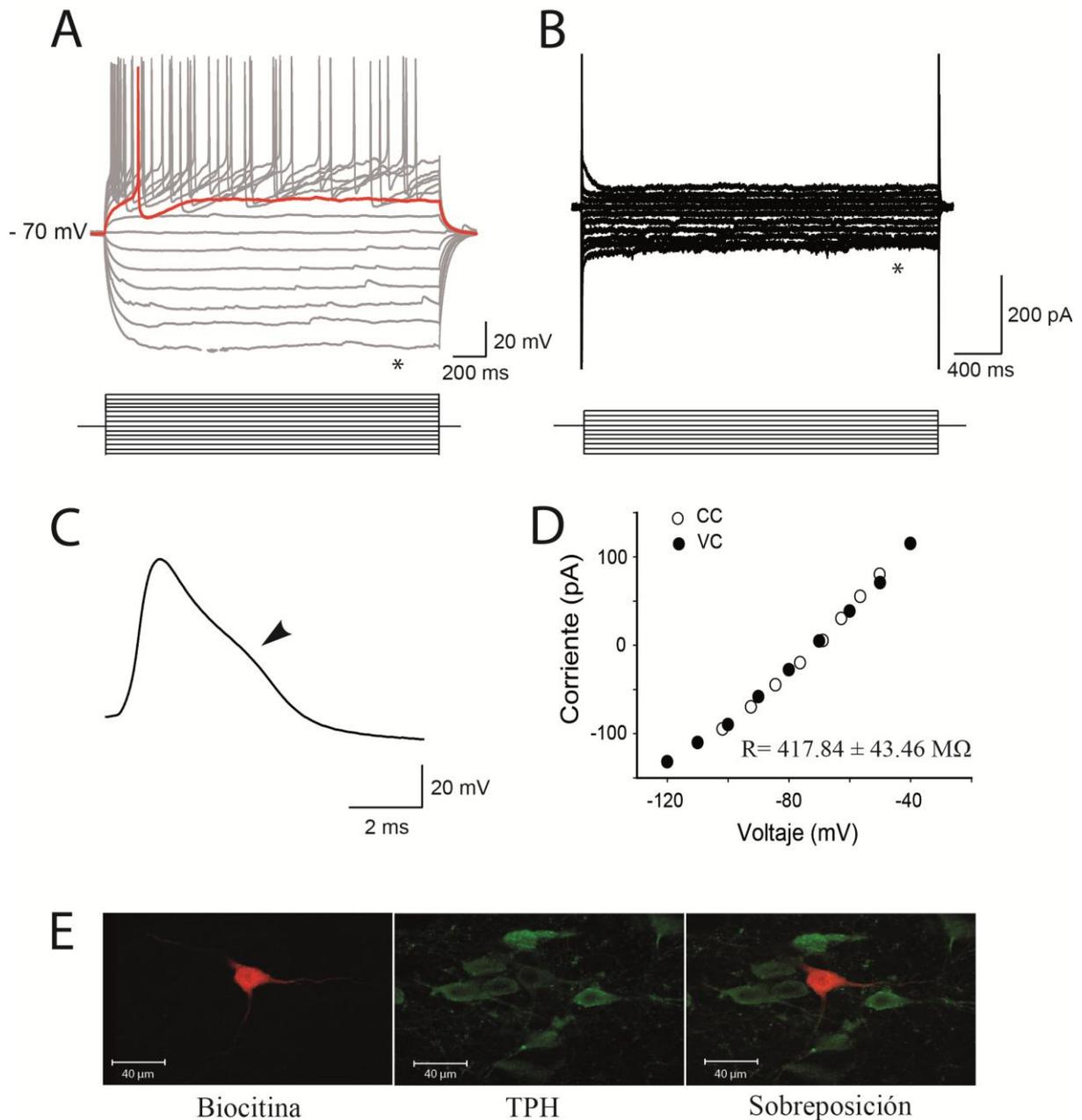


Figura 6.4. Características electrofisiológicas de las neuronas 5-HTérgicas del núcleo dorsal del raqué de rata. A, registro representativo del grupo en condiciones de fijación de corriente. En él se observa la generación de los primeros disparos (línea roja), ante una aplicación de 50 pA. B, registro representativo obtenido en condiciones de fijación de voltaje. C, disparo representativo del grupo, se observa la inflexión en la repolarización del potencial de acción (flecha). D, curva IV. E, fotografía de una célula 5-HTérgica tomada en un microscopio confocal; se observa la marca de biocitina (rojo), la marca contra el anticuerpo TPH (verde) y la sobreposición de las marcas de biocitina y el anticuerpo.

Parámetros electrofisiológicos de las neuronas GABAérgicas y 5-HTérgicas del NDR

Grupos Parámetros	<i>Disparo regular con post- despolarización</i>	<i>Meseta</i>	<i>Disparo regular con frecuencia alta</i>	<i>5-HT</i>
<i>Potencial de reposo (mV)</i>	- 49.9 ± 1.23 (17)	- 50.90 ± 1.54 (15)	- 49.51 ± 1.09 (11)	- 57.60 ± 3.45 (11)
<i>Resistencia de entrada (MΩ)</i>	313.88 ± 11.70 (17)	361.59 ± 30.24 (16)	303.81 ± 29.13 (10)	417.84 ± 43.46 (10)
<i>Umbral del PA (mV)</i>	- 35.94 ± 1.56 (20)	- 38.51 ± 2.04 (16)	- 37.23 ± 0.90 (13)	- 33.75 ± 1.36 (11)
<i>Duración del PA (ms)</i>	3.04 ± 0.21 (20)	4.68 ± 0.34 (16)	3.94 ± 0.41 (12)	5.40 ± 0.20 (11)
<i>Amplitud del PA (mV)</i>	51.62 ± 2.04 (20)	52.25 ± 2.46 (16)	40.63 ± 3.78 * (12)	65.48 ± 3.13 * (11)
<i>Duración de AHP (ms)</i>	214.30 ± 21.61 (19)	322.48 ± 44.70 * (9)	186.79 ± 26.97 (13)	291.68 ± 19.83* (11)
<i>Amplitud de AHP (mV)</i>	- 13.62 ± 1.59 (19)	- 13.30 ± 1.80 (9)	- 15.32 ± 1.50 (13)	- 19.35 ± 0.86 (11)
<i>Frecuencia Total (Hz)</i>	8.4 ± 1.44 (16)	9.31 ± 1.21 (16)	20.92 ± 1.72 * (14)	4.45 ± 1.86 (12)
<i>Frecuencia Inicial (Hz)</i>	31.08 ± 4.94 (15)	87.31 ± 11.66 * (16)	32.29 ± 3.90 (13)	14.23 ± 2.24 * (11)
<i>Frecuencia Final (Hz)</i>	9.61 ± 1.57 (9)	10.10 ± 1.93 (9)	15.95 ± 1.60 * (13)	3.83 ± 0.50 * (11)
<i>Tau (τ) (ms)</i>	31.17 ± 2.82 (18)	37.74 ± 4.34 (15)	30.25 ± 2.88 (12)	61.19 ± 9.55 * (11)
<i>Tau (τ) de la AHP (ms)</i>	0.71 ± 0.18 * (19)	1.19 ± 0.19 (17)	0.91 ± 0.12 (12)	3.43 ± 0.55 * (12)

Tabla 6.2. Parámetros electrofisiológicos de los tres tipos de neuronas GABAérgicas y de las neuronas 5-HTérgicas encontrados en el núcleo dorsal del rafe en rata. Las mediciones de la frecuencia (total, inicial y final) fueron tomadas de las respuestas ante una inyección de corriente despolarizante de 115 pA, para todas las células. (\*) ( $p < 0.05$ ) indica la diferencia

significativa con respecto a los demás grupos; las diferencias individuales se describen en el texto. 5-HT, células serotoninérgicas. AHP, posthiperpolarización (por sus siglas en inglés). PA, potencial de acción. Los números entre paréntesis indican el número de células para cada análisis.

### **6.2.1. Las células GABAérgicas son electrofisiológicamente diferentes a las células 5-HTérgicas en el NDR**

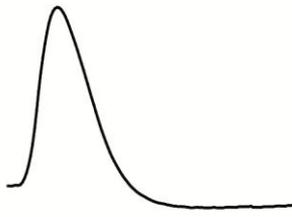
Una de las características más importantes para diferenciar células 5-HTérgicas de células GABAérgicas fue la duración del potencial de acción, ya que las células 5-HTérgicas exhibieron un disparo de mayor duración (Tabla 6.2; Fig. 6.5) que los grupos GABAérgicos DR-PD y DR-FA, aunque la duración no fue estadísticamente diferente con el grupo GABAérgico Me (Prueba de Mann-Whitney,  $Z = -0.63$ ,  $p = 0.526$ ). Asimismo, la amplitud del disparo de las células 5-HTérgicas fue mayor que la amplitud de los tres tipos de células GABAérgicas (Tabla 6.2; Fig. 6.5). Además, las células 5-HTérgicas presentaron una inflexión en la fase repolarizante del disparo que las células GABAérgicas no exhibieron.

Otra diferencia en las características del disparo fue la duración y la amplitud de la AHP. La duración de la AHP de las células 5-HTérgicas fue mayor que la duración de la AHP de los tres grupos de células GABAérgicas; sin embargo, respecto a la amplitud de la AHP, ésta sólo fue mayor con respecto a la de las células DR-PD (Prueba de Mann-Whitney,  $Z = -2.84$ ,  $p = 0.005$ ).

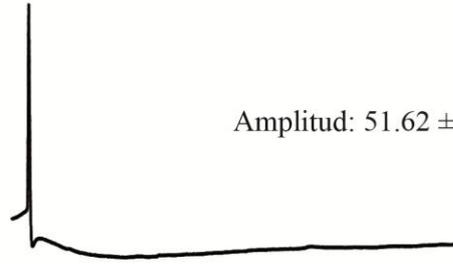
Se realizó un análisis de la frecuencia instantánea inicial y final y de la frecuencia promedio total de disparo, las cuales se obtuvieron a partir de la respuesta a una inyección de corriente de 115 pA (Tabla 6.2). Tanto la frecuencia inicial como la final de las células 5-HTérgicas fue significativamente menor que las de los tres tipos de células GABAérgicas (Tabla 6.2).

Las células 5-HTérgicas presentaron un umbral más hiperpolarizado que las neuronas Me (Prueba de Mann-Whitney,  $Z = 2.195$ ,  $p = 0.028$ ) y DR-FA (Prueba de Mann-Whitney,  $Z = -1.911$ ,  $p = 0.055$ ), pero similar al del grupo DR-PD (Prueba de Mann-Whitney,  $Z = -1.17$ ,  $p = 0.239$ ) (Tabla 6.2).

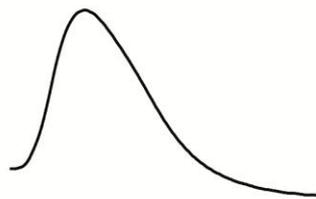
### A. DR-PD



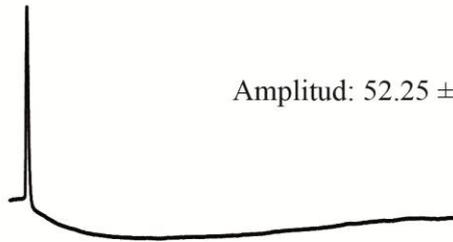
Amplitud:  $51.62 \pm 2.04$  mV



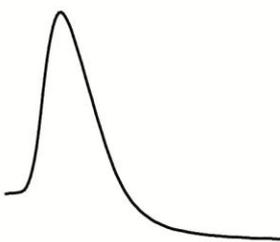
### B. Me



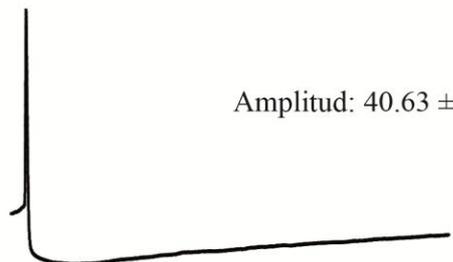
Amplitud:  $52.25 \pm 2.46$  mV



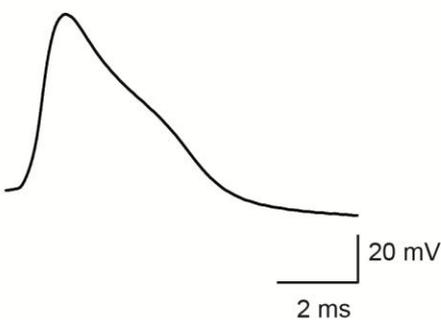
### C. DR-FA



Amplitud:  $40.63 \pm 3.78$  mV



### D. 5-HTérgica



Amplitud:  $65.48 \pm 3.13$  mV

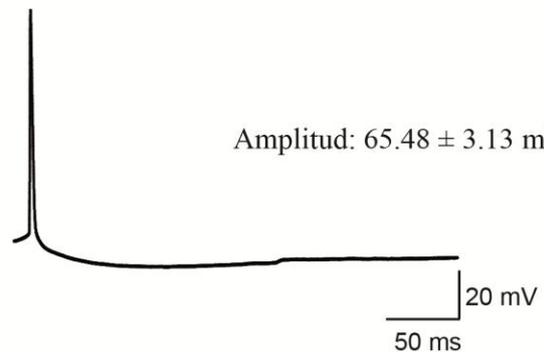


Figura 6.5. Disparo de las células 5-HTérgicas en comparación con los disparos de los tres grupos de células GABAérgicas: DR-PD (disparo regular con postdespolarización), Me (meseta) y DR-FA (disparo regular con frecuencia alta). En el lado izquierdo se observan los disparos en una escala de tiempo de 10 ms y del lado derecho en una escala de 300 ms, para cada grupo de neurona.

Con las curvas IV se calculó la resistencia de entrada de cada grupo de células GABAérgicas y de las células 5-HTérgicas (Tabla 6.2). La resistencia de entrada de las células 5-HTérgicas fue mayor que la resistencia de las células GABAérgicas. Respecto a la constante de decaimiento (*Tau*,  $\tau$ ) (Tabla 6.2), las células 5-HTérgicas presentaron una *Tau* mayor que la de los tres grupos de células GABAérgicas; asimismo, un valor mayor también se encontró en la *Tau* para la AHP (Tabla 6.2). Una curva de carga ( $\tau$ ) mayor de las células 5-HTérgicas sugiere una mayor capacitancia.

### **6.2.2. Los tres tipos de células GABAérgicas del NDR presentan características electrofisiológicas distintas**

El grupo Me mostró una duración del disparo mayor que el de las células DR-PD, pero similar a la de las células DR-FA. Mientras que la amplitud del disparo en las células DR-PD fue similar a la amplitud de las células Me, y la amplitud de ambas fue menor al de las células DR-FA (Tabla 6.2).

También se analizó la duración y la amplitud de la AHP de los disparos (Tabla 6.2). La duración de la AHP de las células Me fue mayor que la duración de la AHP de los grupos DR-PD y DR-FA, siendo los dos últimos estadísticamente similares entre ellos. En la amplitud de la AHP, sólo se encontraron diferencias significativas entre el grupo DR-PD y Me, siendo las neuronas DR-PD las que presentaron una mayor amplitud.

La frecuencia total o frecuencia promedio (Tabla 6.2; Fig. 6.6) reveló que las neuronas del grupo DR-FA mantuvieron una frecuencia de disparo significativamente mayor que los dos grupos restantes, ante inyecciones de corriente por arriba de los 200 pA. En contraste, los grupos Me y DR-PD presentaron una frecuencia máxima de disparo a partir de los 100 pA, que disminuyó conforme se inyectaron pulsos de corriente despolarizante mayores (Fig. 6.6A). Asimismo, al comparar la frecuencia de disparo de todos los grupos de neuronas GABAérgicas, se encontró que las células DR-FA tuvieron casi el doble de frecuencia total que los otros dos tipos, ante una inyección de corriente de 115 pA (Fig. 6.6B). Al comparar los grupos de neuronas Me y DR-PD, se encontró que la frecuencia total fue similar (Tabla 6.2).

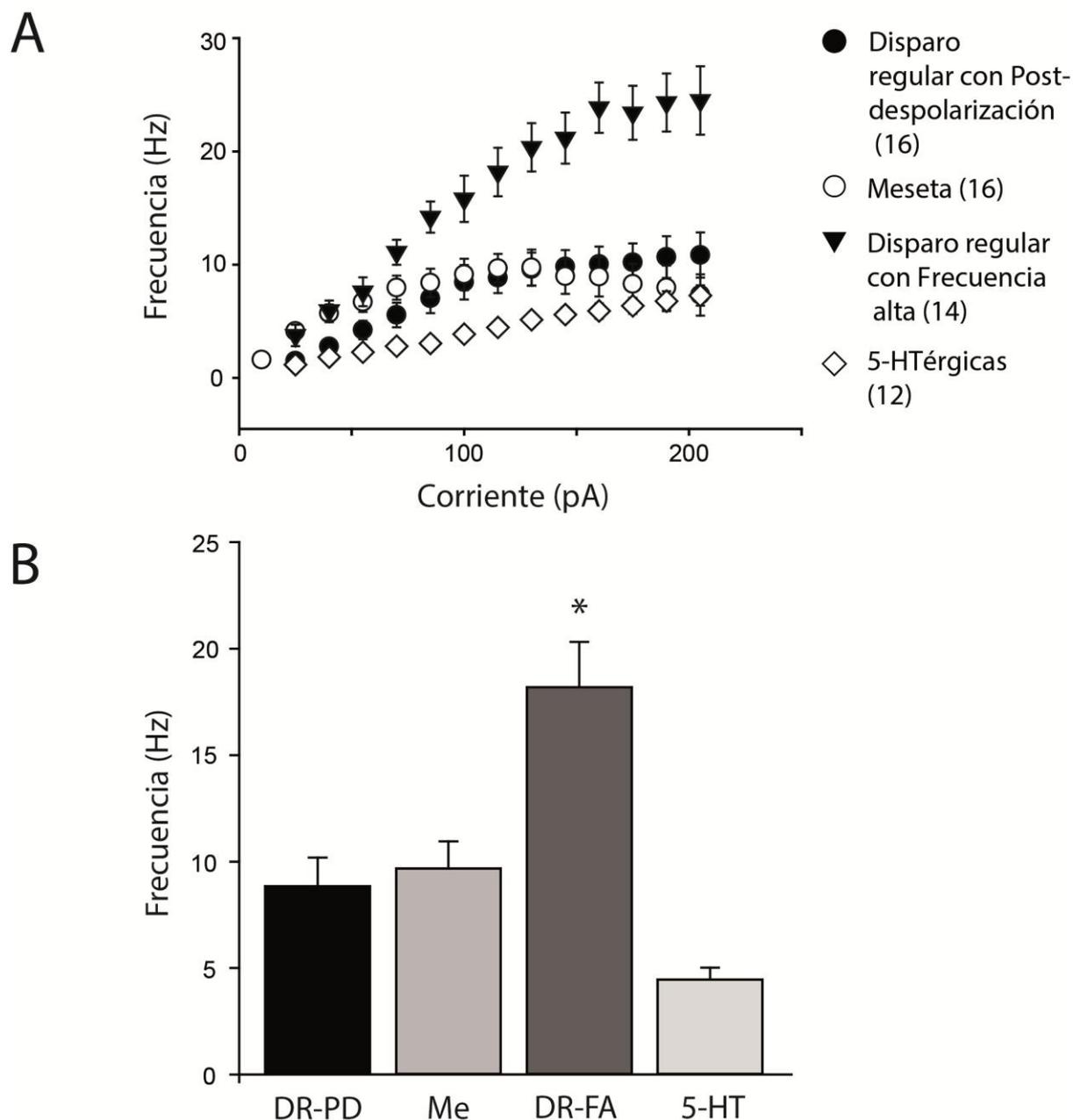


Figura 6.6. Frecuencia total. La obtención de la frecuencia total se realizó mediante la suma de todos los disparos, divididos entre el tiempo (número de eventos / tiempo), para cada pulso de inyección de corriente despolarizante, de 10 a 205 pA. A, gráfica de corriente contra frecuencia; cada punto representa la respuesta en Hz para cada paso de inyección de corriente, para las neuronas 5-HTérgicas (◇) y para los distintos grupos de neurona GABAérgicas: DR-PD (disparo regular con postdespolarización) (●), Me (meseta) (○) y DR-FA (disparo regular con frecuencia alta) (▼). Entre paréntesis se observa el número de células para cada grupo. B, histograma del promedio de la frecuencia para cada grupo ante una inyección de 115 pA.

Los resultados del análisis de la frecuencia inicial de los pasos de inyección de corriente despolarizante mostraron que los grupos DR-PD y DR-FA presentaron un valor menor que el grupo Me (Tabla 6.2; Fig. 6.7B). En el caso de la frecuencia final se observó una mayor variación entre los tipos de células (Tabla 6.2; Fig. 6.7D). Las neuronas DR-FA presentaron una frecuencia final que se mantuvo en aumento constante hasta los 355 pA y fue mayor que la de las células Me y DR-PD. Los otros dos tipos de células GABAérgicas presentaron una frecuencia final menor que la inicial, indicando adaptación del disparo (Fig. 6.7F, inyección de corriente de 115 pA). En la Figura 6.7A, 6.7C y 6.7E se observan las respuestas características de los tres tipos de células GABAérgicas ante una inyección de corriente de 205 pA.

En la Tabla 6.2 se observan los valores, para cada grupo de células GABAérgicas, del umbral, la resistencia de entrada ( $M\Omega$ ) y la constante de tiempo ( $Tau$ ), en cuyos parámetros no se presentaron diferencias entre los grupos. Por otro lado, respecto a la  $Tau$  de la AHP, las células Me fueron similares a las células DR-FA, y ambas presentaron una  $Tau$  de la AHP mayor que la del grupo DR-PD.

Dentro del grupo de las células GABAérgicas, las células DR-FA presentaron una actividad espontánea mayor (78.57%), seguidas por las células DR-PD (57.14%), mientras que el porcentaje menor lo presentaron las células Me (45%) (Tabla 6.2; Fig. 6.8).

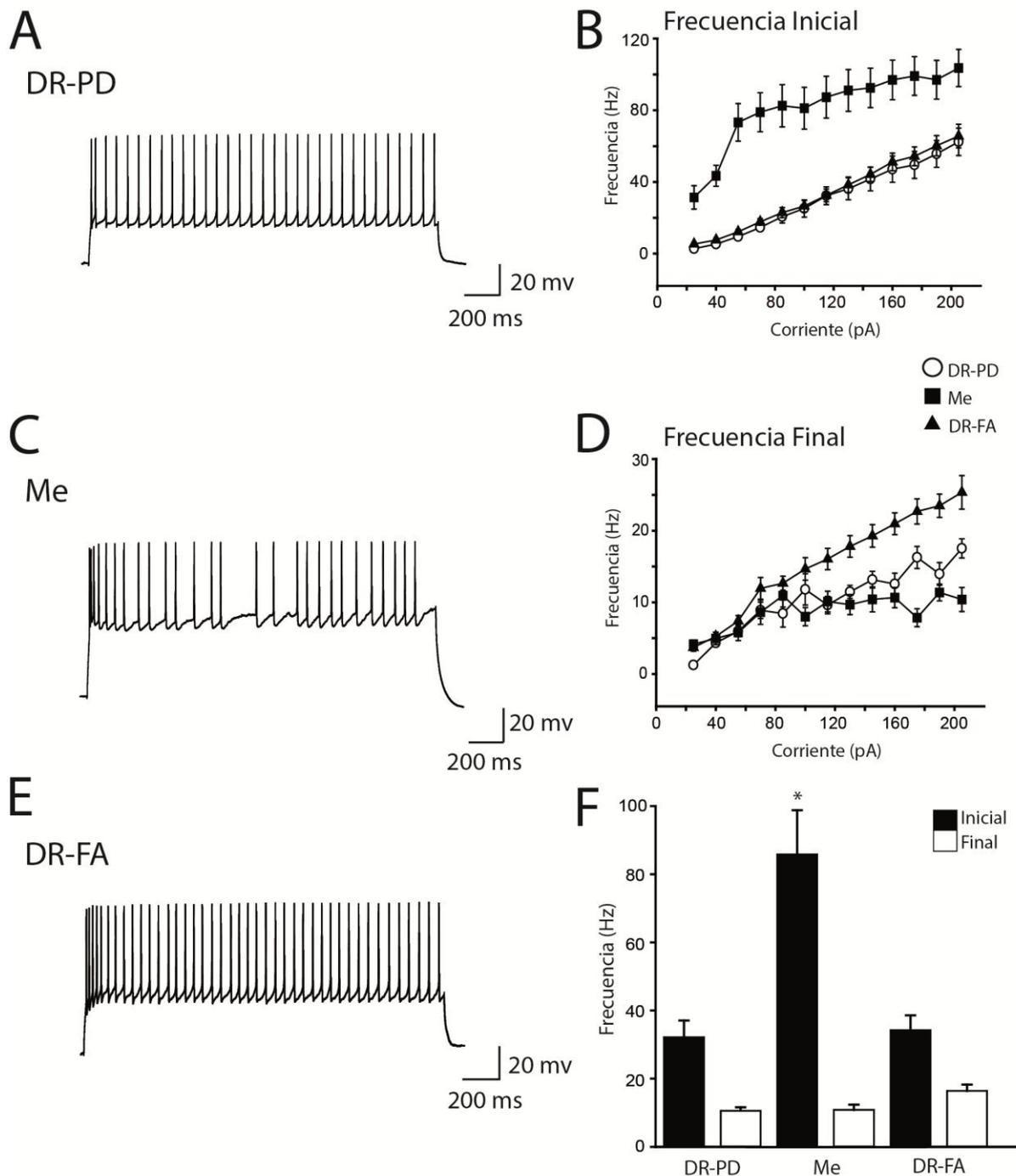


Figura 6.7. Frecuencia inicial y final. La obtención de la frecuencia inicial se obtuvo mediante la diferencia, en tiempo (ms), entre los dos primeros disparos, para cada paso de inyección de corriente despolarizante; análogamente, la frecuencia final se obtuvo mediante la diferencia de los últimos dos disparos. B, frecuencia inicial para los tres grupos de neuronas GABAérgicas. D, frecuencia final para los tres grupos de neuronas GABAérgicas. F, histograma de la frecuencia inicial y la frecuencia final para cada grupo ante una inyección de corriente de 115 pA. Se observan los trazos representativos ante un pulso de inyección de corriente de 205 pA, para cada grupo de neuronas GABAérgicas: DR-PD (disparo regular con postdespolarización) (A), Me (meseta) (C) y DR-FA (disparo regular con frecuencia alta) (E).

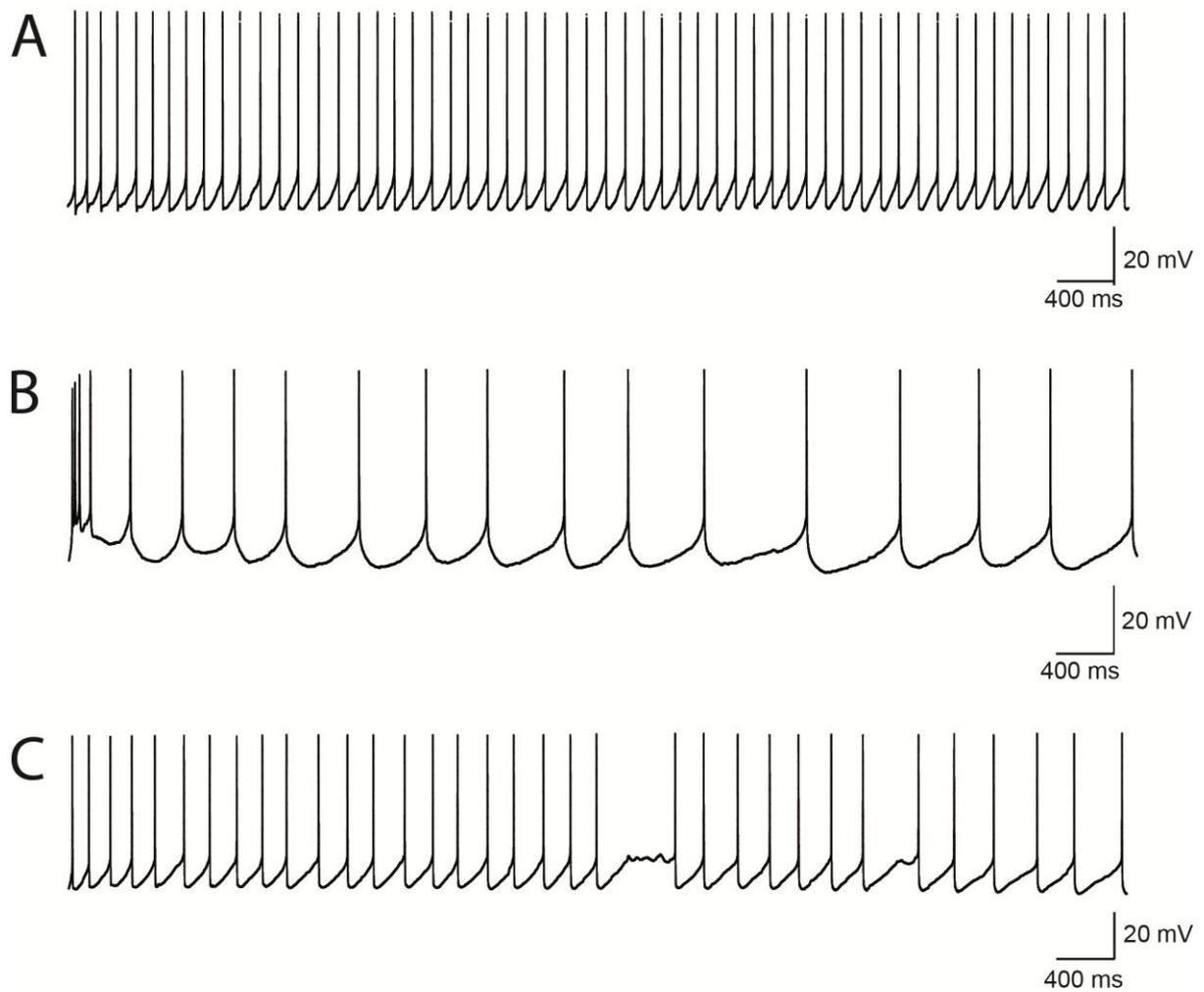


Figura 6.8. Trazos del disparo espontáneo de cada grupo de células GABAérgicas: A, DR-PD (disparo regular con postdespolarización), B, Me (meseta) y C, DR-FA (disparo regular con frecuencia alta).

## **7. Discusión**

En el sistema nervioso central existen varios tipos de neuronas GABAérgicas, las cuales presentan diversas características electrofisiológicas, inmunohistoquímicas y anatómicas. Sin embargo, estas características pueden variar de acuerdo a la distribución de las células en las diferentes regiones del cerebro. En este trabajo, se encontraron tres tipos electrofisiológicos de neuronas GABAérgicas en el NDR, las cuales fueron nombradas de acuerdo con sus características electrofisiológicas más distintivas: células de disparo regular con postdespolarización (DR-PD), células de meseta (Me) y células de disparo regular con frecuencia alta (DR-FA).

### **7.1 Las células del NDR**

El NDR tiene una gran población de células de diversa naturaleza química y eléctrica, siendo las células 5-HTérgicas las más conocidas (Johnson, 1994); sin embargo, éstas no se encuentran solas en los núcleos del rafe, pues las acompañan neuronas que expresan otras sustancias químicas (Jacobs y Azmitia, 1992) y presentan diferentes características electrofisiológicas, tales como las neuronas GABAérgicas que muestran una interacción directa con las células 5-HTérgicas (Liu *et al.*, 2000; Celada *et al.*, 2013; Bothman y Sharp, 2005; Serrats *et al.*, 2005; Boothman *et al.*, 2006). Además, las células GABAérgicas son el segundo grupo en tamaño poblacional e importancia del NDR.

### **7.2 Las células GABAérgicas del NDR**

La búsqueda de las neuronas registradas fue consistente en cada experimento; durante los experimentos se examinó la parte de la línea media y las alas laterales del NDR en busca de células medianas y regulares. La localización de las neuronas GABAérgicas coincidió con pruebas previamente reportadas acerca de la localización del anticuerpo GAD en el NDR, donde las neuronas ovaladas y fusiformes se orientaban verticalmente y se localizaban principalmente en la línea media del NDR, encontrándose las células fusiformes primordialmente entre el fascículo medio longitudinal y las células ovaladas en la parte dorsal del núcleo (Nanopoulos, *et al.*, 1982).

Los tres tipos de células GABAérgicas se localizaron en todo el NDR, donde el 74.55% de las células GABAérgicas registradas se localizó a lo largo de la línea media, principalmente en rebanadas rostrales, y el resto (25.45%) se registró en la zona de las alas laterales.

Las neuronas GABAérgicas encontradas en el NDR comparten características semejantes entre sí, tales como una baja resistencia de entrada y una duración breve del potencial de acción al compararlas con las células 5-HTérgicas en este núcleo, lo cual ya se ha reportado previamente (Beck *et al.*, 2004; Marinelli *et al.*, 2004). Las células caracterizadas electrofisiológicamente fueron identificadas como GABAérgicas por la inmunoreactividad del anticuerpo contra GAD65/67.

En el presente trabajo, los tres tipos de células GABAérgicas observadas fueron fácilmente distinguibles entre sí, pues presentaron características que permitieron diferenciarlas. En el caso de las células Me (36.36% de las células GABAérgicas registradas), la meseta despolarizante, la corriente h y la duración prolongada del potencial de acción permitieron distinguirlas de los dos tipos de células con disparo regular. Por su parte, las neuronas con disparo regular se distinguieron en dos grupos, uno que presentó la postdepolarización (DR-PD; 38.19% de las células GABAérgicas registradas) y el otro grupo presentó una frecuencia de disparo mayor que los otros grupos GABAérgicos registrados (DR-FA; 25.45% de las células GABAérgicas registradas). Electrofisiológicamente, las neuronas registradas se pueden correlacionar con células GABAérgicas de otras zonas del sistema nervioso, tales como la corteza, el neocórtex, la médula espinal, la amígdala lateral, el hipocampo o el núcleo del tracto solitario.

Las células Me exhibieron características electrofisiológicas similares a las características electrofisiológicas de las células “*low threshold*” (LTS), encontradas en la corteza cerebral y el neocórtex. Al igual que las LTS, las células Me presentaron mesetas despolarizantes de bajo umbral de activación y ráfagas de disparo sólo al inicio del pulso despolarizante, seguidas de un disparo regular durante el resto del pulso y presentaron adaptación del disparo (Benes *et al.*, 2001; Tepper *et al.*, 2010). Se ha reportado que las células LTS presentan actividad espontánea tónica (Tepper y Bolam, 2004; Tepper *et al.*, 2010) y en el presente trabajo se observó actividad espontánea en el 45% de las células Me. Además, el 60% de las células Me presentaron una corriente rectificadora entrante (IH) y disparo al *off* ante pulsos de corriente hiperpolarizante, lo que también ha sido reportado en las células LTS (Benes *et al.*, 2001; Tepper *et al.*, 2010).

Las células DR-PD presentaron una postdespolarización al término de la espiga y antes de presentarse la posthiperpolarización, lo cual es una característica de las células “*regular spiking – non pyramidal*” descritas en la corteza cerebral; sin embargo, para poder correlacionar apropiadamente a este tipo celular es necesario un análisis inmunohistoquímico y morfológico. Las células DR-FA presentaron características similares a las células “*fast spiking*”, es decir, exhibieron un potencial de acción de corta duración y una gran amplitud de la AHP, con una duración menor que la AHP de los otros dos tipos de células GABAérgicas; también exhibieron poca adaptación y nula acomodación. Sin embargo, las DR-FA no alcanzaron tasas de disparo tan altas como las que se han descrito para las células FS (Bacci *et al.*, 2003; Luo *et al.*, 2013); ante pulsos de corriente despolarizantes de 350 pA, las neuronas DR-FA alcanzaron frecuencias de 36.62 Hz, por lo cual no se les correlaciona directamente en la categoría con las células FS, cuyas frecuencias de disparo llegan a ser mayores a 400 Hz. Para poder correlacionar con más certeza a las células DR-FA con las neuronas FS es necesario realizar registros de las células con pulsos despolarizantes arriba de los 355 pA (valor máximo usado durante los experimentos); pues los hertzios alcanzados en el trabajo concuerdan con datos observados en Bacci *et al.* (2003) donde se observa que ante los primeros pulsos despolarizantes las células FS no presentan una frecuencia alta, reportando una frecuencia de  $167.2 \pm 8.5$  Hz ante una aplicación de un pulso de 800 pA (Bacci *et al.*, 2003).

Las correlaciones entre las células registradas en el NDR y las células GABAérgicas reportadas en otras regiones del cerebro no pueden efectuarse totalmente, pues es necesario que las células se examinen morfológicamente y mediante pruebas de inmunohistoquímica, contra proteínas que se conocen distintivas de los diferentes tipos de células GABAérgicas (Benes *et al.*, 2001; Contreras, 2004; Tepper y Bolam, 2004; Tepper, *et al.*, 2010); pues la caracterización celular se efectúa relacionando las características electrofisiológicas con la expresión de neuromoduladores y la anatomía de las neuronas. Por otro lado, un punto que obstaculiza una correlación directa entre las células GABAérgicas del NDR y de otras áreas cerebrales son los diversos aspectos experimentales, pues hay variación respecto a la especie y edad de los modelos animales, así como en las técnicas empleadas para generar y analizar los registros electrofisiológicos.

Los parámetros registrados en el trabajo concuerdan con las características descritas para las neuronas GABAérgicas en otras partes del sistema nervioso. Sin embargo, no todas las

características fueron similares, destacando algunas por su mayor duración o amplitud. En el presente estudio, la duración de los potenciales de acción fue mayor en todos los tipos de células registradas, en comparación con la literatura. La variación en la duración del disparo podría deberse a una característica exclusiva de las células GABAérgicas del NDR, lo que permitiría diferenciarlas con mayor certeza del resto de neuronas GABAérgicas del sistema nervioso; aunque los datos podrían deberse a la temperatura usada durante los registros, pues en los diversos artículos ésta varía, reportándose que se usa desde temperatura ambiente hasta  $\approx 33^{\circ}\text{C}$ .

### **7.3 Las células 5-HTérgicas del NDR**

En el presente trabajo se registraron células 5-HTérgicas como grupo de comparación, debido a que se encuentran ampliamente caracterizadas en el NDR, lo cual facilitó la primera división de las células dentro del núcleo. La mayoría de las neuronas 5-HTérgicas (69.23%) se registraron a lo largo de la línea media del NDR, lo cual concuerda con lo que se ha reportado previamente (Jacobs y Azmitia, 1992; Allers y Sharp, 2003); mientras que el 30.77% de células 5-HTérgicas se localizaron en las alas laterales, hacia la zona caudal.

Las neuronas 5-HTérgicas del NDR registradas en este trabajo presentaron parámetros electrofisiológicos que coinciden con reportes previos (Vandermaelen y Aghajanian, 1983). Los más importantes son la inflexión en la parte repolarizante del potencial de acción, el patrón de disparo lento y regular, además de la gran duración del potencial de acción y la AHP. Las células 5-HTérgicas exhibieron una curva de carga ( $\tau$ ) mayor que la de las células GABAérgicas; esto indica una mayor capacitancia de su membrana, lo cual es congruente con algunos reportes que sugieren que estas neuronas son más grandes que las células no 5-HTérgicas del NDR. Otra explicación es que las células 5-HTérgicas, a diferencia de las células GABAérgicas del NDR, contienen una gran cantidad de espinas dendríticas (Kirby *et al.*, 2003) lo cual aumenta su área membranal.

Las células 5-HTérgicas presentaron una resistencia de entrada mayor a la de las neuronas GABAérgicas, lo cual ya ha sido reportado previamente en neuronas no-5-HT en el NDR (Galindo-Charles *et al.*, 2008). Este hecho obedece a una variación en las conductancias intrínsecas que expresa cada grupo de neuronas dentro del NDR. La resistencia de entrada refleja la densidad de los canales iónicos y el tamaño celular (Shikanai *et al.*, 2012), lo que

puede explicar la razón de que las células GABAérgicas presentaran resistencias tan similares entre los tres tipos, y diferentes a la resistencia de las células 5-HTérgicas.

#### **7.4 Importancia fisiológica de la transmisión GABAérgica en el NDR**

El GABA ejerce un efecto inhibitorio tónico sobre las neuronas 5-HTérgicas del NDR, activando receptores tipo GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> (Bowery *et al.*, 1987; Abellán *et al.*, 2000; Gervasoni *et al.*, 2000). Se sabe que mientras que las células 5-HTérgicas expresan principalmente receptores GABA<sub>A</sub>, las neuronas GABAérgicas contienen receptores a 5-HT de los tipos 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>2C</sub>, (Liu *et al.*, 2000; Serrats *et al.*, 2005; Broadbelt *et al.*, 2010).

Los receptores 5-HT<sub>1A</sub> tienen mayor afinidad por la 5-HT que los receptores 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>2C</sub> (Saxena, 1995). La activación de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> tiene un efecto inhibitorio ya que produce una corriente de potasio rectificadora entrante lo cual causa un decremento en la resistencia de la membrana celular e hiperpolarización (Penington *et al.*, 1993). Por otra parte, los receptores 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>2C</sub> están acoplados a una proteína G<sub>q</sub> que activa a la enzima fosfolipasa C (PLC) produciendo liberación de calcio de pozas intracelulares (Hoyer *et al.*, 1994; Urban *et al.*, 2007) lo cual resulta generalmente en un efecto excitatorio.

Mediante este mecanismo, las neuronas 5-HTérgicas regulan su propio disparo modulando la entrada GABAérgica para inhibirse, principalmente; mientras que, a su vez, la 5-HT modula a las propias células 5-HTérgicas. Cuando las neuronas 5-HTérgicas empiezan a disparar, las bajas concentraciones de 5-HT ambiental activan preferentemente a los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, localizados en las neuronas GABAérgicas inhibiendo su disparo. Esto produce un decremento del tono GABAérgico inhibitorio sobre las neuronas 5-HTérgicas y por tanto un incremento en su tasa de disparo. Sin embargo, a medida que aumentan las concentraciones de 5-HT, se activan los receptores 5-HT<sub>2A-C</sub> incrementando la actividad de las neuronas GABAérgicas, las cuales inhiben el disparo de las neuronas 5-HTérgicas. De esta manera se mantiene un balance de la liberación de 5-HT en las diversas áreas del cerebro inervadas por el NDR.

Este balance es muy importante porque se ha demostrado que las alteraciones de los sistemas 5-HTérgicos se relacionan con diversos aspectos fisiológicos, conductuales y patológicos tales como el ciclo sueño-vigilia, la actividad locomotora, la depresión y la

ansiedad, entre otros (Lucki, 1998; Seth *et al.*, 2002). En apoyo a esta idea, la transmisión GABAérgica ha sido implicada tanto en la fisiopatología como en las terapias para tratar la ansiedad y la depresión asociadas a los trastornos del sueño (Krystal *et al.*, 2002; Jindal y Thase, 2004). Más aún, datos experimentales demuestran que los niveles de GABA extracelular en el NDR incrementan durante el sueño de ondas lentas y aún más dramáticamente durante la etapa de sueño paradójico (Nitz y Siegel, 1997; Gervasoni *et al.*, 2000).

Por otra parte, trabajos de optogenética en modelos de ansiedad en animales, han mostrado que un incremento en la actividad de la vía corteza prefrontal – rafe produce un incremento en la actividad de las neuronas GABAérgicas del NDR y que esto produce estrés social y aislamiento en los animales (Challis *et al.*, 2014). Posiblemente debido a un decremento de los niveles de 5-HT en diversas áreas límbicas que son blanco de ciertas poblaciones de neuronas del NDR. Este tipo de estrés o ansiedad se reduce mediante el tratamiento con antidepresivos que inhiben la recaptura de 5-HT. Esto nos permite suponer que las interneuronas GABAérgicas del NDR se encuentran posicionadas para controlar la salida 5-HTérgica de este núcleo, lo cual subsecuentemente va a regular los procesos afectivos.

Las interneuronas GABAérgicas controlan el flujo de información en diversos núcleos del sistema nervioso central. Actualmente se piensa que juegan un papel importante determinando el tiempo (*timing*) del disparo celular, sincronizando la actividad de las redes neuronales y participando en la generación de ritmos corticales. Asimismo, ayudan a mantener un balance entre la excitación y la inhibición necesaria para la transferencia de información al mismo tiempo que previenen una propagación incontrolada de la actividad excitatoria (Markram *et al.*, 2004; Trevelyan *et al.*, 2006; Klausberger y Somogyi, 2008; Haider y McCormick, 2009). La precisión de estas funciones depende de la existencia de una variedad de subtipos de interneuronas; por lo tanto, estudiar su diversidad resulta crucial para entender la forma en que procesan la información (Ascoli *et al.*, 2008). El presente trabajo representa el primer esfuerzo en este sentido, realizado en el NDR.

## **8. Conclusiones**

La principal aportación de este trabajo fue lograr una clasificación electrofisiológica de los tipos de neuronas GABAérgicas del NDR. Como resultado de este estudio se encontraron tres tipos de neuronas GABAérgicas fácilmente distinguibles entre sí con base en características electrofisiológicas tales como la frecuencia de disparo, la morfología del potencial de acción y la constante de tiempo; además de presentar características electrofisiológicas distintas a las neuronas 5-HTérgicas del NDR.

### **8.1. Perspectivas futuras**

Del trabajo derivan diversas perspectivas de las células GABAérgicas en el NDR, lo cual ayudaría a conocer mejor las funciones del núcleo. Un punto a realizar es profundizar en la caracterización electrofisiológica e inmunológica de las neuronas GABAérgicas utilizando anticuerpos contra diferentes tipos de proteínas que expresan dichas neuronas en otras áreas del cerebro (parvalbúmina, calretinina, somatostatina, etc.). También es importante conocer qué subregión del NDR y de sus células 5-HTérgicas es inervada por los diferentes tipos de neuronas GABAérgicas, para lo cual se requerirán estudios anatómicos. Además, es importante estudiar la distribución de los diversos tipos de células GABAérgicas, registrando a diferentes niveles a lo largo del NDR, para ver si algún tipo de célula se expresa con más o con menos frecuencia dependiendo de su localización en el sentido rostro-caudal.

Posteriormente, se podrían hacer registros de pares de células para estudiar la dinámica de inhibición que ejerce cada subtipo de célula GABAérgica sobre las neuronas 5-HTérgicas. Por ejemplo, aplicando un tren de estímulos despolarizantes a un cierto tipo de célula GABAérgica y registrando la respuesta en una neurona 5-HTérgica podría verse la dinámica del mecanismo inhibitorio de cada célula, así como su duración (Gupta *et al.*, 2000). Este arreglo experimental también nos permitiría ver cuales células GABAérgicas participan en la inhibición por retroalimentación negativa o positiva.

## Bibliografía

- Abellán MT, Adell A, Honrubia MA, Mengod G and Artigas F (2000). GABAB-RI receptors in serotonergic neurons: effects of baclofen on 5-HT output in rat brain. *Neuroreport*. 11(5), 941 – 945.
- Abellán MT, Jolas T, Aghajanian GK and Artigas F. (2000). Dual control of dorsal raphe serotonergic neurons by GABA(B) receptors. *Electrophysiological and microdialysis studies*. *Synapse*. 36(1), 21 – 34.
- Abrams JK, Johnson PL, Hollis JH and Lowry CA. (2004). Anatomic and functional topography of the dorsal raphe nucleus. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1018, 46 – 57.
- Adell A, Celada P, Abellán MT and Artigas F. (2002). Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. *Brain research. Brain research reviews*. 39(2-3), 154 – 180.
- Adell A, Carceller A and Artigas F. (1993). In vivo brain dialysis study of the somatodendritic release of serotonin in the Raphe nuclei of the rat: effects of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralinb. *Journal of neurochemistry*. 60(5), 1673 – 1681.
- Aghajanian GK and Wang RY. (1977). Habenular and other midbrain raphe afferents demonstrated by a modified retrograde tracing technique. *Brain Research*. 122(2), 229 – 242.
- Aghajanian GK, Wang RY and Baraban J. (1978). Serotonergic and non-serotonergic neurons of the dorsal raphe: reciprocal changes in firing induced by peripheral nerve stimulation. *Brain Research*. 153(1), 169 – 175.
- Agmon A and Connors BW. (1992). Correlation between intrinsic firing patterns and thalamocortical synaptic responses of neurons in mouse barrel cortex. *The Journal of neuroscience*. 12(1), 319 – 329.
- Allers KA and Sharp T. (2003). Neurochemical and anatomical identification of fast- and slow-firing neurones in the rat dorsal raphe nucleus using juxtacellular labelling methods in vivo. *Neuroscience*. 122(1), 193 – 204.
- Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, Burkhalter A, Buzsáki G, Cauli B, DeFelipe J, Fairén A, Feldmeyer D, Fishell G, Fregnac Y, Freud TF, Gardner D, Gardner EP, Goldberg JH, Helmstaedter M, Hestrin S, Karube F, Kisvárdy ZF, Lambollez B, Lewis DA, Marin O, Markram H,

- Muñoz A, Packer A, Petersen CC, Rockland KS, Rossier J, Rudy B, Somogyi P, Staiter JF, Tamas G, Thomson AM, Toledo-Rodriguez, Wang Y, West DC and Yuste R. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nature reviews. Neuroscience.* 9(7), 557 – 568.
- Azmitia EC and Henriksen SJ. (1976). A modification of the Falck-Hillarp technique for 5-HT fluorescence employing hypertonic formaldehyde perfusion. *The journal of histochemistry and cytochemistry.* 24(12), 1286 – 1288.
- Azmitia EC and Segal M. (1978). An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *The Journal of comparative neurology.* 179(3), 641 – 667.
- Bacci A, Rudolph U, Huguenard JR and Prince DA. (2003). Major differences in inhibitory synaptic transmission onto two neocortical interneurons subclasses. *The Journal of Neurosciencie.* 23(29), 9664 – 9674.
- Bang SJ and Commons KG. (2012). Forebrain GABAergic projections from the dorsal raphe nucleus identified by using GAD67-GFP Knock-in mice. *The Journal of Comparative Neurology.* 520(18), 4157 – 4167.
- Bartos M and Elgueta C. (2012). Functional characteristics of parvalbumin- and cholecystokinin-expressing basket cells. *The Journal of physiology.* 590(4), 669 – 681.
- Beck SG, Pan YZ, Akanwa AC and Kirby LG. (2004). Median and dorsal raphe neurons are not electrophysiologically identical. *Journal of neurophysiology.* 91(2), 994 – 1005.
- Becquet D, Faudon M and Hery F. (1990). The role of serotonin release and autoreceptors in the dorsalis raphe nucleus in the control of serotonin release in the cat caudate nucleus. *Neuroscience.* 39(3), 639 – 647.
- Belin MF, Nanopoulos D, Didier M, Aguera M, Steinbusch H, Verhofstad A, Maitre M and Pujol JF. (1983). Immunohistochemical evidence for the presence of gamma-aminobutyric acid and serotonin in one nerve cell. A study on the raphe nuclei of the rat using antibodies to glutamate decarboxylase and serotonin. *Brain research.* 275(2), 329 – 339.
- Benes FM and Berretta S. (2001). GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology.* 25(1), 1 – 27.
- Benes FM, Vincent SL and Todtenkopf M. (2001). The Density of pyramidal and nonpyramidal neurons in anterior cingulate cortex of schizophrenic and bipolar subjects. *Biological psychiatry.* 50(6), 395 – 406.
- Boadle-Biber MC. (1993). Regulation of serotonin synthesis. *Progress in biophysics and molecular biology.* 60(1), 1 – 15.

- Boothman L, Raley J, Denk F, Hirani E and Sharp T. (2006). In vivo evidence that 5-HT<sub>2C</sub> receptors inhibit 5-HT neuronal activity via a GABAergic mechanism. *British journal of pharmacology*. 149(7), 861 – 869.
- Boothman LJ and Sharp T. (2005). A role for midbrain raphe gamma aminobutyric acid neurons in 5-hydroxytryptamine feedback control. *Neuroreport*. 16(9), 891 – 896.
- Bouwknicht JA, Spiga F, Staub DR, Hale MW, Shekhar A and Lowry CA. (2007). Differential effects of exposure to low-light or high-light open-field on anxiety-related behaviors: relationship to c-Fos expression in serotonergic and non-serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus. *Brain research bulletin*. 72(1), 32 – 43.
- Bowery NG, Hudson AL and Price GW. (1987). GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience*. 20(2), 365 – 385.
- Broadbelt KG, Paterson DS, Rivera KD, Trachtenberg FL and Kinney HC. (2010). Neuroanatomic relationships between the GABAergic and serotonergic systems in the developing human medulla. *Autonomic neuroscience*. 154(1-2), 30 – 41.
- Butt SJ, Fuccillo M, Nery S, Noctor S, Kriegstein A, Corbin JG and Fichell G. (2005). The temporal and spatial origins of cortical interneurons predict their physiological subtype. *Neuron*. 48(4), 591 – 604.
- Calizo LH, Akanwa A, Ma X, Pan Y-z, Lemos JC, Craige C, Heemstra LA and Beck SG. (2011). Raphe serotonin neurons are not homogeneous: electrophysiological, morphological and neurochemical evidence. *Neuropharmacology*. 61(3), 524 – 543.
- Cao Y, Matsuyama K, Fujito Y and Aoki M. (2006). Involvement of medullary GABAergic and serotonergic raphe neurons in respiratory control: electrophysiological and immunohistochemical studies in rats. *Neuroscience research*. 56(3), 322 – 331.
- Carrasco GA and Van de Kar LD. (2003). Neuroendocrine pharmacology of stress. *European Journal of Pharmacology*. 463(1-3), 235 – 272.
- Cauli B, Audinat E, Lambollez B, Angulo MC, Ropert N, Tsuzuki K, Hestrin S and Rossier J. (1997). Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *The Journal of Neuroscience*. 17(10), 3894 – 3906.
- Cauli B, Porter JT, Tsuzuki K, Lambollez B, Rossier J, Quenet B and Audinat E. (2000). Classification of fusiform neocortical interneurons based on unsupervised clustering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97(11), 6144 – 6149.
- Celada P, Puig MV and Artigas F. (2013). Serotonin modulation of cortical neurons and networks. *Frontiers in integrative neuroscience*. [electronic resource]. 7:25. doi: 10.3389/fnint.2013.00025. eCollection 2013.

- Celada P, Puig MV, Casanovas JM, Guillazo G and Artigas F. (2001). Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: Involvement of serotonin-1A, GABA(A), and glutamate receptors. *The Journal of neuroscience*. 21(24), 9917 – 9929.
- Challis C, Beck SG and Berton O. (2014). Optogenetic modulation of descending prefrontocortical inputs to the dorsal raphe bidirectionally bias socioaffective choices after social defeat. *Frontiers in behavioral neuroscience* [electronic resource]. 8:43. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00043. eCollection 2014.
- Contreras D. (2004). Electrophysiological classes of neocortical neurons. *Neural networks*. 17(5-6), 633 – 646.
- de la Peña E and Geijo-Barrientos E. (2000). Participation of low-threshold calcium spikes in excitatory synaptic transmission in guinea pig medial frontal cortex. *European Journal of Neuroscience*. 12(5), 1679 – 1686.
- De Olmos J and Heimer L. (1980). Double and triple labeling of neurons with fluorescent substances; the study of collateral pathways in the ascending raphe system. *Neuroscience letters*. 19(1), 7 – 12.
- Diaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T, Resnick O and Morgane PJ. (1981). Nucleus raphe dorsalis: a morphometric Golgi study in rats of three age groups. *Brain Research*. 207(1), 1 – 16.
- Dray A, Davies J, Oakley NR, Tongroach P and Vellucci S. (1978). The dorsal and medial raphe projections to the substantia nigra in the rat: electrophysiological, biochemical and behavioural observations. *Brain research*. 151(3), 431 – 442.
- Foehring RC, Lorenzon MN, Herron P and Wilson CJ. (1991). Correlation of physiologically and morphologically identified neuronal types in human association cortex in vitro. *Journal of Neurophysiology*. 66(6), 1825 – 1837.
- Fonseca M, Soriano E, Ferrer I, Martinez A and Tuñón T. (1993). Chandelier cell axons identified by parvalbumin-immunoreactivity in the normal human temporal cortex and in Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 55(4), 1107 – 1116.
- Galindo-Charles L, Hernandez-Lopez S, Galarraga E, Tapia D, Bargas J, Garduño J, Frías-Dominguez C, Drucker-Colin R and Mihailescu S. (2008). Serotonergic dorsal raphe neurons possess functional postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors. *Synapse*. 62(8), 601 – 615.
- Gallager DW and Aghajanian GK. (1976). Effects of antipsychotic drugs on the firing of dorsal raphe cells. II. Reversal by picrotoxin. *European journal of pharmacology*. 39(2), 357 – 364.

- Gervasoni D, Peyron C, Rampon C, Barbagli B, Chouvet G, Urbain N, Fort P and Luppi PH. (2000). Role and origin of the GABAergic innervation of dorsal raphe serotonergic neurons. *The Journal of Neuroscience*. 20(11), 4217 – 4225.
- Gocho Y, Sakai A, Yanagawa Y, Suzuki H and Saitow F. (2012). Electrophysiological and pharmacological properties of GABAergic cells in the dorsal raphe nucleus. *The journal of physiological sciences*. 63(2), 147 – 154.
- Graeff FG, Guimarães FS, De Andrade TG and Deakin JF. (1996). Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 54(1), 129 – 141.
- Haider B and McCormick DA. (2009). Rapid neocortical dynamics: cellular and network mechanisms. *Neuron*. 62(2), 171 – 189.
- Hajós M, Richards CD, Székely AD and Sharp T. (1998). An electrophysiological and neuroanatomical study of the medial prefrontal cortical projection to the midbrain raphe nuclei in the rat. *Neuroscience*. 87(1), 95 – 108.
- Harsing LG Jr. (2006). The pharmacology of the neurochemical transmission in the midbrain raphe nuclei of the rat. *Current neuropharmacology*. 4(4), 313 – 339.
- Hensler JG. (2006). Serotonergic modulation of the limbic system. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 30(2), 203 – 214.
- Hensler JG. (2012). Serotonin. Brady ST (editor-in-chief), Siegel GJ (editor-in-chief emeritus), Albers W, Price DL (editors). In *Basic neurochemistry: principles of molecular, cellular and medical neurobiology*. Eighth edition. 300 – 322. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, c2012
- Hioki H, Nakamura H, Ma YF, Konno M, Hayakawa T, Nakamura KC, Fujiyama F and Kaneko T. (2010). Vesicular glutamate transporters 3-expressing nonserotonergic projection neurons constitute a subregion in the rat midbrain raphe nuclei. *The Journal of comparative neurology*. 518(5), 668 – 686.
- Hou C, Xue L, Feng J, Zhang I, Wang Y, Chen L, Wang T, Zhang QJ and Liu J. (2012). Unilateral lesion of the nigrostriatal pathway decreases the response of GABA interneurons in the dorsal raphe nucleus to 5-HT(1A) receptor stimulation in the rat. *Neurochemistry International*. 61(8), 1344 – 1356.
- Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR and Humphrey PP. (1994). International union of pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacological reviews*. 46 (2), 157 – 203.

- Imai H, Steindler DA and Kitai ST. (1986). The organization of divergent axonal projections from the midbrain raphe nuclei in the rat. *The Journal of comparative neurology*. 243(3), 363 – 380.
- Jacobs BL and Azmitia EC. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiological reviews*. 72(1), 165 – 229.
- Jindal RD and Thase ME. (2004). Treatment of insomnia associated with clinical depression. *Sleep medicine reviews*. 8(1), 19 – 30.
- Jolas T and Aghajanian GK. (1997). Opioids suppress spontaneous and NMDA-induced inhibitory postsynaptic currents in the dorsal raphe nucleus of the rat in vitro. *Brain research*. 755(2), 229 – 245.
- Johnson MD. (1994). Electrophysiological and histochemical properties of postnatal rat serotoninergic neurons in dissociated cell culture. *Neuroscience*. 63(3), 775 – 787.
- Kalén P, Karlson M and Winklund L. (1985). Possible excitatory amino acid afferents to nucleus raphe dorsalis of the rat investigated with retrograde wheat germ agglutinin and D-[3H] aspartate tracing. *Brain Research*. 360(1-2), 285 – 297.
- Kalén P, Strecker RE, Rosengren E and Björklund A. (1989). Regulation of striatal serotonin release by the lateral habenula-dorsal raphe pathway in the rat as demonstrated by in vivo microdialysis: role of excitatory amino acids and GABA. *Brain research*. 492(1-2), 187 – 202.
- Kawaguchi Y and Kubota Y. (1993). Correlation of physiological subgroupings of nonpyramidal cells with parvalbumin- and calbindin<sub>D28k</sub>-immunoreactive neurons in layer V of rat frontal cortex. *Journal of Neurophysiology*. 70(1), 387 – 396.
- Kawaguchi Y and Kubota Y. (1996). Physiological and morphological identification of somatostatin- or vasoactive intestinal polypeptide-containing cells among GABAergic cell subtypes in rat frontal cortex. *The Journal of Neuroscience*. 16(8), 2701 – 2715.
- Kawaguchi Y and Kubota Y. (1997). GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cerebral Cortex*. 7(6), 476 – 486.
- Kelly KJ, Donner NC, Hale MW and Lowry CA. (2011). Swim stress activates serotonergic and nonserotonergic neurons in specific subdivisions of the rat dorsal raphe nucleus in a temperature-dependent manner. *Neuroscience*. 197, 251 – 268.
- Kirby LG, Pernar L, Valentino RJ and Beck SG. (2003). Distinguishing characteristics of serotonin and no-serotonin-containing cells in the dorsal raphe nucleus: electrophysiological and immunohistochemical studies. *Neuroscience*. 116(3), 669 – 683.

- Kleppner SR and Tobin AJ. (2002). GABA. In Ramachandran VS (editor-in-chief), Encyclopedia of the human brain. Vol. 2. 353 – 367. San Diego, California: Academic, c2002
- Klausberger T and Somogyi P. (2008). Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science*. 321(5885), 53 – 57.
- Köhler C and Steinbuch H. (1982). Identification of serotonin and non-serotonin-containing neurons of the mid-brain raphe projecting to the entorhinal area and the hippocampal formation. A combined immunohistochemical and fluorescent retrograde tracing study in the rat brain. *Neuroscience*. 7(4), 951 – 975.
- Krieger DT. (1983). Brain peptides: what, where, and why?. *Science*. 222(4627), 975 – 985.
- Krystal JH, Sanacora G, Blumberg H, Anand A, Charney DS, Marek G, Epperson CN, Goddard A and Mason GF. (2002). Glutamate and GABA systems as targets for novel antidepressant and mood-stabilizing treatments. *Molecular psychiatry*. 7(Suppl 1): S71 – S80.
- Kubota Y and Kawaguchi Y. (2000). Dependence of GABAergic synaptic areas on the interneuron type and target size. *The Journal of neuroscience*. 20(1), 375 – 386.
- Lee HS, Kim MA, Valentino RJ and Waterhouse BD. (2003). Glutamatergic afferent projections to the dorsal raphe nucleus of the rat. *Brain Research*. 963(1-2), 57 – 71.
- Lesch KP and Waider J. (2012). Serotonin in the modulation of neural plasticity and networks: implications for neurodevelopmental disorders. *Neuron*. 76(1), 175 – 191.
- Liu R, Jolas T and Aghajanian G. (2000). Serotonin 5-HT<sub>2</sub> receptors activate local GABA inhibitory inputs to serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus. *Brain research*. 874(1), 35 – 45.
- Lucki I. (1998). The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biological psychiatry*. 44(3), 151 – 162.
- Luo R, Janssen MJ, Partridge JG and Vicini S. (2013). Direct and GABA-mediated indirect effects of nicotinic Ach receptor agonists on striatal neurones. *The Journal of physiology*. 591(Pt 1), 203 – 217.
- Marinelli S, Schnell SA, Hack SP, Chistie MJ, Wessendorf MW and Vaughan CW. (2004). Serotonergic and nonserotonergic dorsal raphe neurons are pharmacologically and electrophysiologically heterogeneous. *Journal of neurophysiology*. 92(6), 3532 – 3537.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G and Wu C. (2004). Interneuron in the neocortical inhibitory system. *Nature reviews. Neuroscience*. 5(10), 793 – 807.

- Michelsen KA, Schmitz C and Steinbusch HW. ( 2007). The dorsal raphe nucleus - from silver stainings to a role in depression. *Brain Research Reviews*. 55(2), 329 – 342.
- Monti JM. (2010). The structure of the dorsal raphe nucleus and its relevance to the regulation of sleep and wakefulness. *Sleep medicine reviews*. 14(5), 307 – 317.
- Monti JM. (2010). The role of dorsal raphe nucleus serotonergic and non-serotonergic neurons, and of their receptors, in regulating waking and rapid eye movement (REM) sleep. *Sleep medicine reviews*. 14(5), 319 – 327.
- Nanopoulos D, Belin MF, Maitre M, Vincendon G and Pujol JF. (1982). Immunocytochemical evidence for the existence of GABAergic neurons in the nucleus raphe dorsalis. Possible existence of neurons containing serotonin and GABA. *Brain research*. 232(2), 375 – 389.
- Nitz D and Siegel J. (1997). GABA release in the dorsal raphe nucleus: role in the control of REM sleep. *The American journal of physiology*. 273(1 Pt 2), R451 – R455.
- NOM-062-ZOO-1999. Diario Oficial. Especificaciones técnicas para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. México: Norma Oficial Mexicana; 2001
- Patridge JG, Janssen MJ, Chou DY, Abe K, Zukowska Z and Vicini S. (2009). Excitatory and inhibitory synapses in neuropeptide Y-expressing striatal interneurons. *Journal of neurophysiology*. 102(5), 3038 – 3045.
- Paxinos G and Watson C. (1998). The rat brain. In stereotaxic coordinates. Academic Press. Fourth edition. San Diego, California, USA. P. 48 – 53.
- Penington NJ, Kelly JS and Fox AP. (1993). Whole-cell recordings of inwardly rectifying K<sup>+</sup> currents activated by 5-HT<sub>1A</sub> receptors on dorsal raphe neurones of the adult rat. *The Journal of physiology*. 469, 387 – 405.
- Peyron C, Luppi PH, Fort P, Rampon C and Jouvet M. (1996). Lower brainstem catecholamine afferents to the rat dorsal raphe nucleus. *The Journal of comparative neurology*. 364(3), 402 – 413.
- Peyron C, Luppi PH, Kitahama K, Hermann DM and Jouvet M. (1995). Origin of the dopaminergic innervation of the rat dorsal raphe nucleus. *Neuroreport*. 6(18), 2527 – 2531.
- Peyron C, Petit JM, Rampon C, Jouvet M and Luppi PH. (1998). Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. *Neuroscience*. 82(2), 443 – 468.
- Polgar E, Sardella TC, Watanabe M and Todd AJ. (2011). Quantitative study of NPY-expressing GABAergic neurons and axons in rat spinal dorsal horn. *The Journal of Comparative Neurology*. 519(6), 1007 – 1023.

- Puig MV, Artigas F and Celada P. (2005). Modulation of the activity of pyramidal neurons in rat prefrontal cortex by raphe stimulation in vivo: involvement of serotonin and GABA. *Cerebral cortex*. 15(1), 1 – 14.
- Rowley NM, Madsen KK, Schousboe A and White H. (2012). Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. *Neurochemistry international*. 61(4), 546 – 558.
- Sakai K, Salvvert D, Touret M and Jouvet M. (1977). Afferent connections of the nucleus raphe dorsalis in the cat as visualized by the horseradich peroxidase technique. *Brain Research*. 137(1), 11 – 35.
- Sarter M and Markowitsch HJ. (1984). Collateral innervations of the medial and lateral prefrontal cortex by amygdaloid, thalamic, and brain-stem neurons. *The Journal of comparative neurology*. 224 (3), 445 – 460.
- Saxena PR. (1995). Serotonin receptors: subtypes, functional responses and therapeutic relevance. *Pharmacology and therapeutics*. 66(2), 339 – 368.
- Schousboe A and Waagepetersen HS. (2009). Gamma-Aminobutyric Acid (GABA). In Squire LR (editor-in-chief), *Encyclopedia of neuroscience*. Vol. 4. 511 – 515. Boston, Massachusetts: Elsevier, [2009].
- Serrats J, Artigas F, Mengod G and Cortés R. (2003). GABAB receptor mRNA in the raphe nuclei: co-expression with serotonin transporter and glutamic acid decarboxylase. *Journal of neurochemistry*. 84(4), 743 – 752.
- Serrats J, Mengod G and Cortés R. (2005). Expression of serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptors in GABAergic cells of the anterior raphe nuclei. *Journal of chemical neuroanatomy*. 29(2), 83 – 91.
- Seth P, Cheeta S, Tucci S and File SE. (2002). Nicotinic-serotonergic interactions in brain and behaviour. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 71(4), 795 – 805.
- Shikanai H, Yoshida T, Konno K, Yamasaki M, Izumi T, Ohmura Y, Watanabe M and Yoshioka M. (2012). Distinct neurochemical and functional properties of GAD67-containing 5-HT neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *The Journal of Neuroscience*. 32(41), 14415 – 14426.
- Smith M and Perrier JF. (2006). Intrinsic properties shape the firing pattern of central horn interneurons from the spinal cord of the adult turtle. *Journal of neurophysiology*. 96(5), 2670 – 2677.
- Sosulina L, Graebenitz S and Pape HC. (2010). GABAergic interneurons in the mouse lateral amygdala: a classification study. *Journal of Neurophysiology*. 104(2), 617 – 626.
- Stamp JA and Semba K. (1995). Extent of colocalization of serotonin and GABA in the neurons of the rat raphe nuclei. *Brain research*. 677(1), 39 – 49.

- Stern WC, Johnson A, Bronzino JD and Morgane PJ. (1981). Neuropharmacology of the afferent projections from the lateral habenula and substantia nigra to the anterior raphe in the rat. *Neuropharmacology*. 20(10), 979 – 989.
- Tao R, Ma Z and Auerbach SB. (1996). Differential regulation of 5-hydroxytryptamine release by GABAA and GABAB receptors in midbrain raphe nuclei and forebrain of rats. *British journal of pharmacology*. 119(7), 1375 – 1384.
- Tepper JM and Bolam JP. (2004). Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Current opinion in neurobiology*. 14(6), 685 – 692.
- Tepper JM, Koós T and Wilson CJ. (2004) GABAergic microcircuits in the neostriatum. *Trends in Neurosciences*. 27(11), 662 – 669.
- Tepper JM, Tecuapetla F, Koós T and Ibáñez-Sandoval O. (2010). Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons. *Frontiers in neuroanatomy [electronic resource]*. 150. doi: 10.3389/fnana.2010.00150. eCollection 2010.
- Trevelyan AJ, Sussillo D, Watson BO and Yuste R. (2006). Modular propagation of epileptiform activity: evidence for an inhibitory veto in neocortex. *The Journal of neuroscience*. 26(48), 12447 – 12455.
- Urban JD, Clarke WP, von Zastrow M, Nichols DE, Kobilka B, Weinstein H, Javitch JA, Roth BL, Christopoulos A, Sexton PM, Miller KJ, Spedding M and Mailman RB. (2007). Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 320(1), 1 – 13.
- van Bockstaele EJ, Biswas A and Pickel VM. (1993). Topography of serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus that send axon collaterals to the rat prefrontal cortex and nucleus accumbens. *Brain Research*. 624(1-2), 188 – 198.
- van der Kooy D and Hattori T. (1980). Dorsal raphe cells with collateral projections to the caudate-putamen and substantia nigra: a fluorescent retrograde double labeling study in the rat. *Brain research*. 186(1), 1 – 7.
- Vandermaelen CP and Aghajanian GK. (1983). Electrophysiological and pharmacological characterization of serotonergic dorsal raphe neurons recorded extracellularly and intracellularly in rat brain slices. *Brain Research*. 289(1-2), 109 – 119.
- Vitalis T and Rossier J. (2010). New insights into cortical interneurons development and classification: Contribution of developmental studies. *Developmental neurobiology*. 71(1), 34 – 44.
- Walls AB, Nilsen LH, Eyjolfsson EM, Vestergaard HT, Hansen SL, Schousboe A, Sonnewald U and Waagepetersen HS. (2010). GAD65 is essential for synthesis of GABA destined for tonic inhibition regulating epileptiform activity. *Journal of Neurochemistry*. 115(6), 1398 – 1408.

- Wang M and Bradley RM. (2010). Properties of GABAergic neurons in the rostral solitary tract nucleus in mice. *Journal of neurophysiology*. 103(6), 3205 – 3218.
- Wasselus M, Valentino RJ and Van Bockstaele EJ. (2011). Collateralized dorsal raphe nucleus projections: a mechanism for the integration of diverse functions during stress. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 41(4), 266 – 280.
- Woolf NJ and Butcher LL. (1989). Cholinergic system in the rat brain: IV. Descending projections of the pontomesencephalic tegmentum. *Brain research bulletin*. 23(6), 519 – 540.
- Zhao C, Eisinger B and Gammie SC. (2013). Characterization of GABAergic neurons in the mouse lateral septum: a double fluorescence in situ hybridization and immunohistochemical study using tyramide signal amplification. *PloS one* [electronic resource]. 8(8):e73750. doi: 10.1371/journal.pone.0073750. eCollection 2013 .