

**Tesis de Maestría  
PEDECIBA Biología  
Subárea Neurociencia**

**¿Modulación de la eficacia sináptica dependiente del estado comportamental? Estudio electrofisiológico *in vitro* en una región críticamente implicada en el control de la vigilia y el sueño REM.**

**Héctor Kunizawa**

**Orientador: Dr. Michel Borde**

**Laboratorio de ejecución: Neurofisiología Celular y Sináptica**

**Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina**

**Montevideo, Uruguay**

**Tribunal**

**Presidente: Dr. Raul Russo**

**Vocales: Dr. Pablo Torterolo**

**Dr. Omar Macadar**

Financiación: PEDECIBA, ANII FCE2009\_3115, CSIC UdelaR

## Resumen.

La unión mesopontina del tronco encefálico de la rata contiene una red neural considerada como necesaria y suficiente para la ejecución de ciertos componentes del sueño de movimientos oculares rápidos (S-REM). Esta red involucra los núcleos tegmentales laterodorsal y pedúnculo pontino (LDT-PPT), y su proyección sináptica a un sector de la formación reticulada pontina rostral (PnO). El PnO recibe inervación colinérgica, promotora de S-REM, y monoaminérgica, cuya activación es capaz de inducir un estado similar al de vigilia. Recientemente, la inervación GABAérgica del PnO ha cobrado relevancia entre los mecanismos de control del S-REM. Nuestra hipótesis sostiene que la activación de la aferencia colinérgica al PnO, asociada a la generación de S-REM, es capaz de promover la modulación específica de las entradas sinápticas que reciben las neuronas de este sector de la formación reticulada pontina además de provocar cambios de sus propiedades intrínsecas. Para poner a prueba esta hipótesis se seleccionó la entrada GABAérgica procedente del LDT-PPT, parte integral de la red mesopontina, y se utilizaron técnicas electrofisiológicas, farmacológicas y de marcaje para caracterizar *in vitro*: 1) **las propiedades electrofisiológicas básicas de las neuronas del PnO que reciben contactos monosinápticos del LDT-PPT**, 2) **los contactos sinápticos GABAérgicos entre neuronas del LDT-PPT y del PnO en la rodaja de la unión ponto-mesencefálica utilizada** y 3) la modulación de la eficacia de estos contactos provocada por la aplicación yuxtacelular de agonistas colinérgicos.

En esta tesis mostramos que las neuronas del PnO, independientemente de su fenotipo electrofisiológicos, reciben inervación GABAérgica procedente del LDT-PPT cuya eficacia está sujeta a control colinérgico (fenómeno plástico heterosináptico). Este control involucra la participación de receptores presinápticos tanto muscarínicos - cuya activación exclusiva provoca inhibición presináptica- como nicotínicos - responsables de la facilitación presináptica del contacto-. En el 50% de las neuronas estudiadas (23 de 46) la modulación colinérgica resultó de la co-activación de ambos tipos de receptores.

Nuestros hallazgos colocan a los contactos sinápticos que integran la red mesopontina implicada en el control del S-REM, en el escenario de los mecanismos neurales que subyacen a este estado comportamental. La modulación colinérgica de contactos sinápticos GABAérgicos sobre las neuronas del PnO sugiere la participación de fenómenos de reconfiguración circuital en el control ejercido por esta red neural.

## Abreviaturas.

<b>Ác. Qui.:</b> ácido quinurénico.	<b>IPSC:</b> Inhibitory Post Sinaptic Current.
<b>Ach:</b> Acetilcolina	<b>I<sub>T</sub>:</b> Corriente de calcio transitoria o de tipo T
<b>Aq:</b> Acueducto de Silvio	<b>K-S:</b> Kolmogoroff-Smirnov
<b>Bac:</b> Baclofen.	<b>LDT:</b> Laterodorsal TegmentalNucleus
<b>CB1:</b> Receptor cannabinoide de tipo 1	<b>LTS:</b> Low Threshold Spike
<b>CCh:</b> Carbacol	<b>M2:</b> Receptor muscarínico subtipo 2
<b>ChAT:</b> Colin-Acetil Transferasa	<b>M4:</b> Receptor muscarínico subtipo 4
<b>CPG:</b> Central pattern generators	<b>NMV:</b> Núcleo Motor del V par
<b>CV:</b> Coeficiente Variación.	<b>No-LTS:</b> No Low threshold Spike
<b>DIC-IR:</b> Differential interference contrast, Infrared	<b>OE:</b> Objetivo específico.
<b>DSI:</b> Depolarization-induced Suppression of Inhibition.	<b>PGO:</b> Ponto-Genículo-Occipital
<b>DSPc:</b> Depresión Sináptica Persistente.	<b>PnO:</b> Pontine Reticular Nucleus, oral part
<b>EPSC:</b> Excitatory Post Sinaptic Current	<b>PPR:</b> Paired Pulse Ratio
<b>FRP:</b> Formación Reticulada Pontina.	<b>PPT:</b> Pedunculopontine Tegmental Nucleus
<b>FSPc:</b> Facilitación Sináptica Persistente.	<b>PTX:</b> Picrotoxina
<b>Glu.:</b> glutamato	<b>REM:</b> Rapid Eye Movement.
<b>I<sub>A</sub>:</b> Corriente de potasio de tipo I <sub>A</sub> .	<b>SNC:</b> Sistema Nervioso Central
<b>I<sub>h</sub>:</b> Corriente de potasio de tipo I <sub>h</sub> .	<b>5-HT:</b> serotonina.

# Contenido

Resumen.	1
Abreviaturas.	2
<b>1. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>4</b>
1.1. S-REM: fenomenología y mecanismos neurales básicos.	6
1.1.1. Papel de la unión ponto-mesencefálica en el control del S-REM.	7
1.1.2. Papel de la inervación colinérgica de la FRP en la generación del S-REM.	11
1.1.3.S-REM: modelos cualitativos relativos a su regulación y mecanismos.	13
1.2. Modulación colinérgica de la eficacia sináptica en la red mesopontina.	16
<b>2. HIPÓTESIS y OBJETIVOS.</b>	<b>19</b>
3.1. Aspectos metodológicos generales.	21
3.1.1. Obtención de la rodaja, registro y estimulación.	21
3.1.2. Estímulo eléctrico.	22
3.1.3. Registro intracelular.	24
3.2. Caracterización de las propiedades electrofisiológicas básicas de las neuronas del PnO.	25
3.2.1. Caracterización electrofisiológica.	25
3.2.2. Marcaje intracelular.	26
3.3. Marcaje retrógrado e inmunohistoquímica.	27
3.4. Soluciones.	28
3.5. Análisis de las corrientes sinápticas.	29
3.6. Tratamiento estadístico de los datos.	33
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>34</b>
4.1. Caracterización de las neuronas del PnO.	34
4.1.1. Caracterización electrofisiológica.	34
4.1.2. Caracterización morfológica.	40
4.2. Estudio de la conectividad entre el LDT-PPT y el PnO en la rodaja de la unión ponto-mesencefálica.	41
4.2.1. Evidencias Morfológicas.	41
4.2.2. Evidencias funcionales.	43
4.2.2.1. Respuestas de neuronas del LDT-PPT a la estimulación eléctrica del PnO. Activación antidrómica de neuronas del LDT-PPT.	44
4.2.2.2. Respuestas de las neuronas del PnO a la activación farmacológica de neuronas del LDT-PPT.	45

4.2.2.3. Respuestas de las neuronas del PnO a la estimulación eléctrica de LDT-PPT.	47
4.2.3. Características identitarias del IPSC provocado por la estimulación eléctrica del LDT-PPT.	51
4.2.3.1. Características electrofisiológicas.	52
4.2.3.2. La entrada GABAérgica no involucra receptores GABAB y carece de “Depolarization-Induced Suppression of Inhibition” (DSI).	55
4.2.3.3. Naturaleza inhibitoria de la acción GABAérgica sobre las neuronas del PnO.	60
4.3. Modulación colinérgica de las entradas GABAérgicas a las neuronas del PnO procedentes del LDT-PPT.	64
4.3.1. Efectos de la aplicación local de colinomiméticos sobre la eficacia sináptica.	64
4.3.2. Mecanismos de la modulación de la eficacia del contacto GABAérgico inducida por colinomiméticos.	69
<b>5. DISCUSION</b>	<b>81</b>
5.1. Indemnidad anatómica y funcional de la red mesopontina en la rodaja de la unión ponto-mesencefálica.	81
5.2. Características de la entrada GABAérgica a las neuronas del PnO procedente del LDT-PPT.	84
<b>6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.</b>	<b>95</b>
<b>7. REFERENCIAS.</b>	<b>98</b>

## 1. INTRODUCCIÓN.

El estudio de las estrategias neurales para la organización del comportamiento en vertebrados es uno de los mayores desafíos para la Neurociencia. El avance del conocimiento en este campo depende de manera crítica de la utilización de modelos experimentales adecuados que admitan múltiples niveles de análisis (p.ej: comportamental, circuital, celular, sináptico, molecular) así como del uso de técnicas variadas, corrientemente utilizadas en diversas disciplinas. En este sentido, los invertebrados se han constituido en modelos experimentales valiosos que han aportado muy significativamente al conocimiento de las bases neurales del comportamiento (Kandel, 1966). La posibilidad de analizar comportamientos relativamente simples, bien definidos, organizados por sistemas neurales paucicelulares y suficientemente robustos para ser reproducidos en condiciones experimentales que admitan la utilización de enfoques reduccionistas, se cuentan dentro de las ventajas comparativas más significativas de los invertebrados como modelos experimentales.

Del análisis realizado en invertebrados y extendido a una variedad de especies han surgido conceptos generales relevantes que han sido postulados como principios organizativos generales del sistema nervioso (Getting, 1989). En estos principios organizativos generales es posible reconocer diferentes **arreglos circuitales básicos** como la excitación mutua o recurrente, la inhibición recíproca y la inhibición lateral que operan a diversos niveles del Sistema Nervioso Central (SNC).

De la integración de estos arreglos básicos emergen diseños neurales más complejos, los que pueden encuadrarse en **un nivel intermedio de organización**. En este nivel es posible destacar el diseño de neurona o sistema comando (Bullock, 1979, revisado en Eaton et al, 2001), que propone que la activación de una neurona (o circuito) es condición necesaria y “suficiente” (cuando menos para el grupo de Núñez, ver Núñez et al., 1997, 1998, 2002) para la generación de un comportamiento y se ha constituido en una referencia conceptual para el campo de la neuroetología (Eaton & DiDomenico, 1985; DiDomenico & Eaton, 1988; Borde et al., 2004). También en este nivel queda comprendido el diseño de centros generadores de configuraciones témporo-espaciales (Central pattern generators CPGs; Lydic, 1989; Grillner & Wallén 1985; Falgairolle et al., 2006; Dickinson, 2006), circuitos capaces de producir salidas rítmicas sin necesidad de una entrada temporalmente organizada. Los CPG han sido

descritos, entre otros en el control de la respiración y la locomoción (Bertrand et al., 2012; Mellen et al., 2012).

Otro diseño neural que no difiere conceptualmente del diseño de neurona comando es el de las redes neurales dedicadas (o redes de propósito único). La concepción de redes dedicadas expresa de alguna forma la línea de pensamiento más clásico en la cual cada red neural tiene como cometido una única función. Estas redes han sido postuladas en niveles inferiores en la organización del comportamiento motor (Sparks & Harris-Warrick, 1997; Briggman & Kristan, 2006), donde la activación de la red dedicada resultaría en la expresión de comportamientos bien definidos. Según este diseño, un animal pasaría de un comportamiento a otro por activación de una red neural u otra. Una red neuronal dada posee una arquitectura específica: i.e., está constituida por un grupo de neuronas con propiedades operativas únicas y conectadas entre sí con un patrón específico e inmutable de conexiones.

Sin embargo aun en sistemas sencillos, se han aportado evidencias que indican que la variedad de comportamientos desplegados por una especie no obedece a la activación de un número equivalente de redes de propósito único (Briggman & Kristan, 2006). En efecto, las evidencias que surgen del estudio tanto de sistemas sencillos (Marder, 1988; Getting, 1989) como de sistemas algo más complejos en vertebrados (Calabrese, 1998; Faumont et al., 2005; Lieske & Ramírez, 2006) señalan que una red neural precisa, de arquitectura definida, es capaz de organizar comportamientos sensiblemente diferentes como consecuencia de un fenómeno de reconfiguración funcional (Getting, 1989; Harris-Warrick & Marder, 1991; Hooper, 2004). La reconfiguración de redes admite la existencia de circuitos de arquitectura rígida en sus constituyentes estructurales (neuronas y conectividad), al igual que las redes dedicadas, pero implica la variación del orden y/o modalidad de activación de los elementos que la componen. De esta forma la reconfiguración facilitaría la expresión de diversos modos de operación de una red en respuesta a influencias moduladoras específicas, en general, extrínsecas a la red. Cualquiera sea la reconfiguración, es esperable que los cambios estén mediados por la modulación de las propiedades intrínsecas neuronales y/o de los contactos sinápticos que estas neuronas establecen en el marco de la red neural (Getting, 1989; Harris- Warrick & Marder, 1991).

Esta tesis busca aportar al conocimiento de las estrategias neurales que operan en niveles intermedios de organización del comportamiento en mamíferos. Particularmente, nos propusimos obtener evidencias que indiquen la existencia de fenómenos de reconfiguración en la forma de modulaciones circuitales dependientes

de estado, con énfasis en el nivel sináptico de integración. Para ello, nuestro trabajo se ha desarrollado en un modelo que admite la realización de estudios *in vitro* en rodajas de la rodaja de la unión ponto-mesencefálica. Aun siendo plenamente conscientes de que no es posible reproducir *in vitro* la completitud fenomenológica de estados comportamentales complejos, consideramos a este modelo como la mejor opción para el esclarecimiento de estrategias neurales básicas, celulares y circuitales en la generación de un estado comportamental específico. El modelo consiste en una preparación reducida de SNC de la rata que contiene sectores del tronco encefálico con circuitos neurales considerados como **necesario** (Foutz et al., 1974, 1975; Bon et al., 1980) y **suficiente** (Reinoso-Suárez et al., 2001; 2007; Núñez et al., 1997, 1998, 2002; Yamuy et al. 1993) para la generación del sueño de movimientos oculares rápidos (S-REM de “rapid eye movements”). Sin perjuicio de ello, visto que la activación farmacológica de esta región es capaz de generar S-REM solo en determinadas condiciones experimentales (ver más adelante), algunos autores cuestionan el alcance del concepto de suficiencia referido más arriba (revisado por Luppi et al., 2012).

En términos generales, la estrategia experimental de nuestro trabajo se apoyó en dos pilares fundamentales: i) circunscribir el análisis a una red neural mesopontina cuya activación es postulada como necesaria y que es considerada como suficiente para la generación de S-REM y ii) utilizar el análisis *in vitro* para detectar modulaciones sinápticas de la conectividad en esta red neural ante neurotransmisores que se han asociado con cambios de estado.

### 1.1. S-REM: fenomenología y mecanismos neurales básicos.

El sueño en mamíferos es un proceso biestable, i.e., alterna entre dos estados claramente distinguibles desde el punto de vista fisiológico (para revisión ver, Jones, 1991, 1998; Siegel, 2000; Jones, 2003). Un estado comportamental denominado sueño lento o no-REM, se caracteriza por presentar un electroencefalograma sincronizado (ondas de baja frecuencia y de relativa gran amplitud), una reducción de la temperatura central e hipotonía de la musculatura somática.

El otro estado llamado sueño desincronizado, activo, de movimientos oculares rápidos (S-REM) o paradójico está caracterizado por una constelación de eventos (Fig. 1) entre los que se incluyen:

- electroencefalograma con ondas de baja amplitud y frecuencias relativamente elevadas, similar al de vigilia.



.- reducción marcada del tono de la musculatura somática. El tono es prácticamente nulo en la musculatura antigravitatoria. En este contexto de atonía se observan sin embargo contracciones bruscas de la musculatura (twitches) particularmente a nivel facial y distal de los miembros.

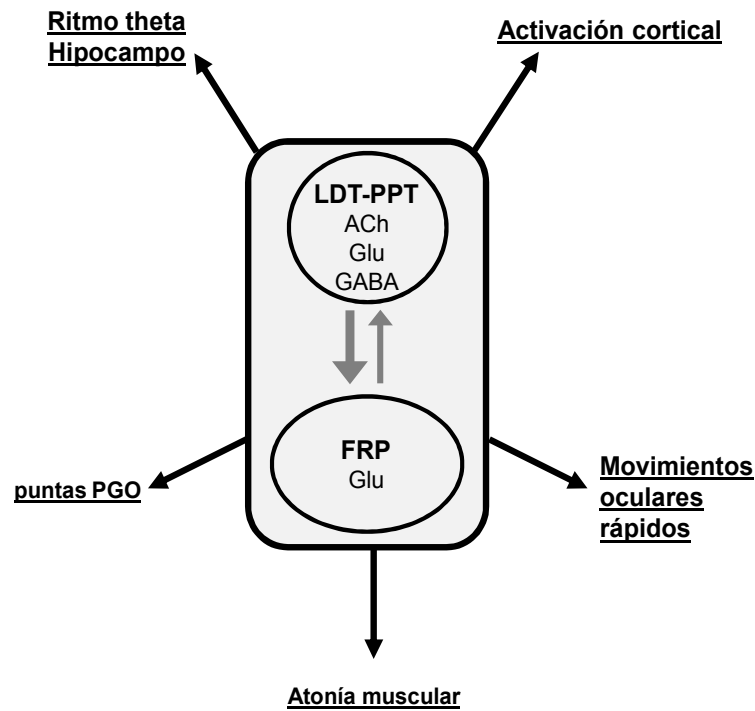
.- episodios de movimientos oculares rápidos

.- fluctuaciones de los ritmos respiratorio y cardíaco.

En primates, felinos y roedores se describen además de manera característica:

.- prominente ritmo theta (4-12 Hz) en el hipocampo, y

.- puntas ponto-genículo-occipitales (PGO) en los registros de actividad de campo en estructuras profundas (puente y genículo lateral) y en el córtex occipital (Chase & Morales, 1990; Steriade & McCarley, 1990; Jones, 1991; Chase & Morales, 2000).



**Figura 1. Red neural mesopontina involucrada críticamente en el control de los componentes cardinales del S-REM.** La interacción entre la formación reticulada pontina (FRP, glutamatérgica) y los núcleos tegmentales laterodorsal y pedunculopontino (LDT-PPT) es responsable de la manifestación de diversos componentes del S-REM. La interacción entre estas estructuras promueve la expresión de: puntas PGO, movimientos rápidos de los ojos, atonía muscular, ritmo theta en el hipocampo y activación cortical. Note que se integra la aferencia GABAérgica y glutamatérgica desde el LDT-PPT a la FRP y que las flechas que vinculan ambas estructuras tienen diferente grosor ilustrando el papel del LDT-PPT como promotor (o comando) de la zona ejecutiva para los diversos componentes del S-REM (FRP). (Tomado y adaptado de Brown et al., 2012).

### 1.1.1. Papel de la unión ponto-mesencefálica en el control del S-REM.

Los estudios pioneros que incluían la sección completa del neuroeje en los años 30 mostraron que luego de la sección caudal al núcleo motor del tercer par craneal (Bremer, 1935) era posible que el gato continuara con vida manifestando algunos comportamientos. Tiempo después se describió que en animales descerebrados los signos de S-REM ocurrían periódicamente con un ritmo ultradiano (Jouvet, 1962). Por tanto, presumiblemente, las estructuras centrales localizadas caudalmente al plano de sección serían suficientes para la generación de algunos componentes del S-REM (principalmente motores). Los resultados obtenidos mediante la realización de secciones totales del neuroeje a otros niveles (Foutz et al., 1974, 1975; Bon et al., 1980) señalan al tronco encefálico como estructura clave en la generación de diversos estados comportamentales y particularmente del S-REM. Los resultados de este tipo de estudios, realizados mayormente en gatos, fueron confirmados mediante el uso de técnicas más refinadas de lesión de porciones restringidas del tronco encefálico (Batini et al., 1959; Jouvet, 1962; Marchiafava et al., 1968; Siegel et al., 1986; Shouse & Siegel, 1992; Siegel, 2000). En conjunto estos hallazgos permitieron definir el papel de regiones mejor delimitadas en la generación de diversos estados comportamentales y consolidaron el concepto de que el S-REM resulta de la actividad de una red contenida mayormente en la unión ponto-mesencefálica.

**En la actualidad existe consenso en torno a que un área restringida del puente rostral (Fig. 2A), ventral y medial al locus coeruleus, localizada en o en la vecindad del PnO; de acuerdo a la terminología utilizada para describir los agrupamientos neuronales de la formación reticulada pontina (Siegel, 2000)-, contiene la red neural responsable de la generación y de la organización del S-REM (Sastre et al., 1981; Sakai, 1988; Webster & Jones, 1988; Baghdoyan, 1997; Siegel, 2000, Brown et al., 2012). Asimismo, se acepta que esta red comprende, además de un sector de la formación reticulada pontina rostral, a su inervación procedente principalmente de los núcleos tegmentales laterodorsal y pedunculopontino (LDT-PPT) (ver Fig. 2 A, B). Como se verá más adelante estos componentes básicos de la red están presentes y son operativos en nuestra preparación reducida de tronco encefálico de la rata. La localización precisa y la denominación específica del área de la formación reticulada considerada como ejecutiva para aspectos cardinales del S-REM varía según el atlas estereotáxico utilizado (Reticular formation en Fig. 2), la especie en la que se hayan obtenido las evidencias experimentales y es aún objeto de debate entre los diversos grupos de**

investigación abocados al estudio del tema (ver para revisión Monti, 2011; Brown et al., 2012).

Así, y apoyados en variada evidencia farmacológica, electrofisiológica y de anatomía funcional en el gato, este sector de la reticulada ha sido denominado como subcoeruleus (o SubC). Esta área contendría subsectores asociados a la generación de diversos componentes del S-REM (periLC-alfa, Sakai, 1988; área parabraquial, Datta & Hobson, 1994). Según otros (Reinoso-Suárez, et al., 2007) estos sectores estarían bajo el control de una región más rostral y ventral de la formación reticulada (*reticularis pontis oralis ventral*, vRPO) que actuaría como un verdadero punto nodal en la organización del S-REM. En roedores, probablemente debido a dificultades metodológicas derivadas de las reducidas dimensiones de las estructuras del tronco encefálico, los datos no son tan claros. Aun cuando persiste controversia en cuanto a la localización precisa del sitio específico implicado en el control de los diversos componentes del S-REM, existe acuerdo en el papel central de la formación reticulada pontina rostral (Semba, 1990). Evidencias farmacológicas indican que las neuronas (particularmente aquellas implicadas en la atonía muscular) parecen localizarse rostralmente respecto del SubC, ventralmente al agrupamiento colinérgico del LDT-PPT (Fig. 2C). Esta región ha sido denominada como área sublaterodorsal (SLD, Luppi et al., 2012) y se le asigna un papel crítico en el control del S-REM en roedores como estructura cuya activación es necesaria y suficiente para la generación de la atonía característica de este estado comportamental.

En esta tesis se adoptará la denominación de PnO -de acuerdo a atlas de Paxinos (1998)- para designar al sector de la formación reticulada pontina (FRP) (ver Fig.2) críticamente implicado en el control del S-REM. En efecto, como se detallará más adelante se estudiarán las neuronas del sector dorsal del PnO, inmediatamente medial al polo rostral del núcleo motor del V par craneal (Fig. 2 B y C). Sin perjuicio de ello, en el texto también se hará referencia a la FRP para designar genéricamente al sector de la reticulada del tronco encefálico implicado en el control del S-REM independiente de las especificidades funcionales en relación al S-REM, asignadas a diferentes subsectores (con diversas denominaciones) localizados en esta región.

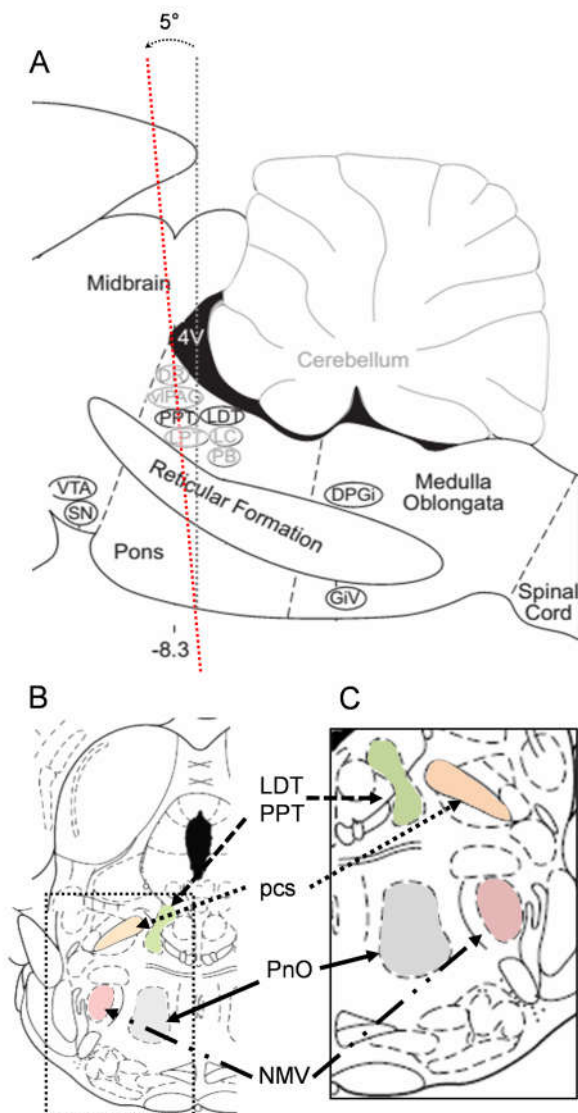
El **PnO** contiene una variedad de neuronas con diferentes fenotipos morfológicos, neuroquímicos y electrofisiológicos (Beitz et al., 1987; Sakai and Koyama, 1996; Lai et al., 1999; Maloney et al., 2000). Registros intracelulares obtenidos tanto *in vivo* como *in vitro* han contribuido a la caracterización de las propiedades electrofisiológicas de las neuronas ubicadas en este sector de la FRP (Greene & Carpenter, 1985; Greene

et al., 1986; Gerber et al., 1989; Greene et al., 1989; Stevens et al., 1992; Stevens et al., 1993; Imon et al., 1996; Núñez et al., 1997; Núñez et al., 1998; Ito et al., 2002; Núñez et al., 2002; Heister et al., 2009, Weng et al., 2014). Estos estudios, han considerado a las neuronas del PnO independientemente de la innervación que reciben (excepto la colinérgica procedente de los núcleos LDT-PPT, Fig. 1). En el marco de nuestra tesis, en contraste, analizaremos exclusivamente aquella subpoblación de neuronas que recibe contactos monosinápticos procedentes de los núcleos LDT-PPT. Los registros electrofisiológicos *in vitro* en la rata han demostrado la existencia de dos tipos neuronales de acuerdo a sus propiedades electrofisiológicas básicas: neuronas con espiga de calcio de bajo umbral (Low Threshold Spike, LTS) y otras que carecen de este tipo de respuesta (No Low Threshold Spike, No-LTS) que representan a la mayoría de las neuronas registradas (Núñez et al., 1997; 1998). Ambos tipos celulares presentan respuestas a pulsos de corriente compatibles con la presencia de corrientes de tipo  $I_A$  e  $I_h$ . Aún cuando el sitio específico de la FRP ejecutivo para los diversos componentes del S-REM es aún objeto de debate, se acepta generalmente que contiene neuronas cuya actividad se incrementa específicamente antes y durante los episodios de S-REM (REM-on) y que estas neuronas serían glutamatérgicas (Clément et al., 2011; Brown et al., 2012).

Los núcleos **LDT y PPT, considerados como unas de las fuentes principales de la innervación colinérgica del SNC** (Kayama & Ogawa, 1987; Steriade et al., 1990; Semba et al., 1992) (Fig. 2), se presentan como agregados de neuronas colinérgicas y no colinérgicas. El incremento del S-REM producido por la estimulación eléctrica (Thakkar et al., 1996) así como la drástica reducción del S-REM observada luego de su destrucción química (Sastre et al., 1981; Webster & Jones, 1988), subrayan la importancia de estas estructuras en la generación de este estado comportamental. Más aún, el complejo LDT-PPT (en adelante LDT-PPT) contiene neuronas que descargan específicamente antes y durante el S-REM (Netick et al., 1977; Shiromani & McGinty, 1986; Shiromani et al., 1987; Sakai, 1988; Sakai et al., 2001; Ito et al., 2002). Si bien la mayoría de las evidencias apuntan a la importancia de las células colinérgicas del LDT-PPT y de su proyección al PnO en la generación del S-REM, estos núcleos tegmentales presentan células glutamatérgicas y GABAérgicas cuya descarga también se correlaciona con el establecimiento del S-REM (REM-on) y de otros estados comportamentales, particularmente la vigilia (W-REM-on, Thakkar et al., 1998; Boucetta et al., 2014). El papel de estas neuronas no-colinérgicas que encuentran al PnO como una de sus estructuras blanco (Semba & Fibiger, 1992;

Semba, 1993; Boissard et al., 2003) en el control del S-REM, queda aún por determinarse.

### 1.1.2. Papel de la innervación colinérgica de la FRP en la generación del S-REM.



**Figura 2. Estructuras del tronco encefálico de la rata implicadas en el control del ciclo de sueño-vigilia. A.** Vista sagital del tronco encefálico ilustrando las principales estructuras a nivel mesencefálico, pontino y bulbar cuya actividad se ha vinculado al control del ciclo sueño y vigilia. Se indica la distancia del bregma -8.3 mm (según Paxinos & Watson, 1998). La línea punteada en rojo representa el nivel aproximado del corte realizado en esta tesis para la obtención de la rodaja de la unión ponto-mesencefálica utilizada. El plano de corte forma un ángulo aproximado de 5° respecto del plano habitualmente utilizado para la confección de los atlas estereotáxicos (línea punteada en negro). (Tomado y adaptado de Brown et al., 2012). A nivel pontino rostral el complejo LDT-PPT (en negro) se destaca por sobre los restantes núcleos implicados en el control del S-REM que no son objeto de análisis en el presente trabajo (en gris claro). **B** y **C.** Composición de cortes coronal del tronco encefálico de la rata del atlas Paxinos & Watson, 1998; el corte 53 corresponde al sector más dorsal (colicular) y el 55 al sector más ventral del corte (B). En C se destacan (sombreadas de varios colores) las estructuras clave a nivel pontino objeto de estudio en la presente tesis (LDT-PPT, verde y PnO, gris) así como aquellas utilizadas como referencias anatómicas (pcs naranja y NMV rojo pálido). (B y C Tomado Paxinos & Watson, 1998). **DR**, núcleo dorsal del rafe; **LC**, locus coeruleus; **LDT**, núcleo tegmental laterodorsal; **PnO**, núcleo pontis oralis; **PPT**, núcleo tegmental pedunculopontino; **vIPAG**, gris periaqueductal ventrolateral; **PB**, núcleo parabraquial.

El papel de la FRP y particularmente de su innervación colinérgica procedente del LDT-PPT, en la generación del S-REM proviene mayormente de evidencias obtenidas *in vivo*. La estimulación del FRP mediante microinyecciones de agonistas colinérgicos muscarínicos o de agentes inhibidores de la anticolinesterasa en gatos genera episodios de S-REM de larga duración (George et al., 1964; Shiromani y McGinty, 1986; Baghdoyan et al., 1987; Baghdoyan et al., 1989; Vanni-Mercier et al., 1989; Shiromani et al., 1992; Yamuy et al., 1993). Consistente con estos hallazgos, neuronas

de la FRP expresan receptores colinérgicos muscarínicos (Baghdoyan et al., 1994; Baghdoyan, 1997; Baghdoyan & Lydic, 1999; Coleman et al., 2004) cuya activación desempeña un papel central en la generación y mantenimiento del S-REM (para revisión ver McCarley, 2007). Aún cuando han sido comparativamente menos estudiados, los receptores nicotínicos en la red mesopontina -o en estructuras relacionadas, p.ej. Locus coeruleus o núcleo medial del Rafé (Fig. 2A)- parecen también estar involucrados en el control de este estado comportamental (Stevens et al., 1993; Gillin et al., 1993; Li et al., 1998; McCarley, 2007, Hernández-López, et al., 2013, ver sin embargo Weng et al., 2014).

La microaplicación de drogas que reducen la liberación de acetilcolina desde los terminales presinápticos disminuye drásticamente el S-REM (Capece et al., 1997). En el mismo sentido la aplicación de colinomiméticos en el FRP de la rata promueve un incremento del S-REM aunque el efecto es cualitativamente diferente al observado en gatos (Bourgin et al., 1995; Deurveilher et al., 1997; Marks & Birabil, 1998; Kubin, 2001; Mallick et al., 2001; McCarley, 2004). Los registros extracelulares han permitido detectar en esta región neuronas cuya descarga se correlaciona con la aparición del S-REM (REM-on, Siegel, 1978; Boucetta et al., 2014). Recientemente, un conjunto de elegantes experimentos *in vivo* realizados en la rata utilizando técnicas de optogenética (Van Dort et al., 2015) señalan que la inervación colinérgica de las áreas ejecutivas constituye efectivamente un modulador crítico para el S-REM. La activación optogenética selectiva de las neuronas colinérgicas del LDT-PPT durante la fase de sueño no-REM provoca un incremento del número de episodios de S-REM.

Si bien existe acuerdo en el papel inductor o facilitador de S-REM de la aferencia moduladora colinérgica procedente del LDT-PPT, una población significativa de neuronas de estos núcleos tegmentales muestran incrementos de la frecuencia de descarga tanto durante la vigilia como durante el S-REM, algunas de ellas no colinérgicas (ver p.ej. Siegel, 1979; Datta & MacLean, 2007). Los estudios realizados en la rata, arrojaron resultados similares (Boucetta & Jones, 2009; Boucetta et al. 2014). En efecto, en base a registros de unidades del área del LDT-PPT combinado con marcaje yuxtacelular e inmunohistoquímica para identificación del neurotransmisor, estos autores confirmaron que la mayoría de las neuronas colinérgicas mostraron actividad máxima tanto durante la vigilia como durante el S-REM (W-REM-max.) (Boucetta et al. 2014). Un perfil de descarga similar mostró las neuronas no colinérgicas (GABAérgicas y glutamatérgicas). Asimismo, una población de neuronas GABAérgicas mostró descarga máxima durante el S-REM (REM-max.) y

otras glutamatérgicas descargaron exclusivamente durante la vigilia (W-max). Aún cuando no todas las neuronas no-colinérgicas encuentran a la FRP como estructura blanco, estos hallazgos jerarquizan el papel de neuronas no colinérgicas, GABAérgicas y glutamatérgicas, en el control de los diversos componentes del S-REM.

En suma, existe consenso en que el complejo LDT-PPT y su proyección colinérgica a las neuronas del FRP juegan un papel central en la generación y organización del S-REM (ver más adelante) (Fig. 1). Las neuronas de la FRP son blanco además de influencias moduladoras mediadas por serotonina (5-HT) y noradrenalina cuyos efectos asocian la supresión de S-REM y promueven un estado comportamental con las características básicas de la vigilia. Si bien persiste el debate en este sentido, se acepta que el PnO de la formación reticulada pontina oficiaría de conmutador principal o de "conexión nodal" (traducción de "nodal link"; Reinoso-Suárez, 2001) para la generación, organización y mantenimiento del S-REM.

#### 1.1.3.S-REM: modelos cualitativos relativos a su regulación y mecanismos.

Aún cuando los mecanismos circuitales, neuronales y sinápticos son poco conocidos, el cúmulo de evidencias obtenidas fundamentalmente de preparaciones *in vivo*, han permitido elaborar varios modelos con valor heurístico tendientes a explicar tanto la fenomenología del S-REM como la regulación de este estado comportamental (McCarley & Hobson, 1975; Lu et al., 2006; Datta & MacLean, 2007; Fuller et al., 2007; McKenna et al., 2011; Pace-Shot & Hobson, 2012; Brown et al., 2012). En cualquier caso, estos modelos presuponen la existencia de redes neurales dedicadas a la organización de los diversos signos cardinales del S-REM formando parte de un centro generador o de una red distribuida a lo largo del tronco encefálico bajo el control de sectores restringidos de la FRP (Fig. 1). Uno de los modelos más aceptados propone la existencia de un control dual, colinérgico-monaminérgico de efectos opuestos sobre la red mesopontina implicada en la generación y control del S-REM. Este modelo conocido como "modelo de interacción recíproca" da cuenta de una buena cantidad de hallazgos experimentales aunque muestra importantes limitaciones (Luppi et al., 2006; revisado por Brown et al, 2012). Entre ellas, este modelo no toma en cuenta sólida evidencia experimental que sugiere además la participación de aferencias GABAérgicas a las neuronas de la FRP (Xi et al., 2004) procedente de un conjunto ordenado de neuronas a nivel mesopontino y de otras estructuras del tronco (Reinoso-Suarez et al., 2007, Liang & Marks, 2009) y particularmente del complejo LDT-PPT

(Semba, 1993; Boissard et al., 2003). En la actualidad el modelo de interacción recíproca colinérgico-monoaminérgico se encuentra en revisión y algunos autores proponen que el control dual de estas estructuras es ejercido por aferencias glutamatérgicas y GABAérgicas (Luppi et al., 2006). Otros en cambio, (Lu et al., 2006) proponen la interacción GABAérgica mutuamente inhibidora entre sectores promotores del REM (REM on) y áreas cuya actividad disfacilitaría la aparición de estado comportamental (REM off).

En cualquier caso estos modelos suponen el control dual y antagónico (ver modelos propuestos en Brown et al, 2012; McCarley 2004; 2007; Datta & Mclean 2007; Luppi et al, 2012; Reinoso-Suárez et al, 2001) sobre la red mesopontina responsable del S-REM, particularmente de la zona ejecutiva de la FRP, y de alguna manera sugieren la existencia de una red de propósito único cuyo nivel de activación determinaría la probabilidad de aparición de S-REM. En efecto, el concepto que subyace a estos modelos establece que la aparición del S-REM, con sus diversos componentes, resulta de la activación de neuronas glutamatérgicas REM-on localizadas en la FRP (revisado en Luppi et al., 2012) sugiriendo un mecanismo basado en la existencia de una red dedicada para la generación y control de este estado comportamental.

Más recientemente, algunos reportes (Heister et al., 2009; Weng et al., 2013) abordan el análisis de aspectos sinápticos y alcanzan a poner de manifiesto la existencia de fenómenos plásticos heterosinápticos de las sinapsis no colinérgicas (Glutamato, GABA) promovidos por la aplicación local de colinomiméticos (ver más adelante). Sin embargo los resultados de estos reportes, al analizar potenciales sinápticos espontáneos y/o provocados por estimulación cercana a la neurona registrada, no son concluyentes al carecer de información relativa al origen de la inervación estudiada, aspecto que no fue objeto de análisis por parte de estos autores.

En general los modelos cualitativos expuestos más arriba no incorporan la modulación de la eficacia de los contactos sinápticos de la red, particularmente los que reciben las células ejecutivas para el REM de la FRP, como factor determinante de la operativa de los circuitos mesopontinos y, en consecuencia, mecanismo contribuyente a la generación, mantenimiento y control del S-REM. En esta tesis, este aspecto será abordado específicamente indagando acerca de la existencia de fenómenos plásticos heterosinápticos desencadenados por colinomiméticos a nivel de los contactos que establecen neuronas del LDT-PPT con neuronas del PnO.



#### 1.1.4. La inervación GABAérgica del PnO y su papel en la generación y control del S-REM.

Sin perjuicio de lo expresado en la sección anterior en relación al papel de la inervación colinérgica de la FRP en el control del S-REM, varias líneas de evidencia relativamente recientes indican que la inervación GABAérgica de neuronas de la FRP juega, asimismo, un papel relevante (Liang & Marks, 2009; Liang & Marks, 2014; Vanini, 2011; ver también la revisión de Brown et al., 2012). Testimonio de ello, lo constituye la aparición en los últimos años de un importante caudal de publicaciones relativas a la participación del GABA en los circuitos mesopontinos implicados en el control de diversos estados comportamentales (ver p.ej. Gottesman, 2002; Luppi et al., 2006; Torterolo & Vanini, 2010; Reinoso-Suárez et al., 2010, Brown et al., 2012). A continuación, se mencionan las piezas de evidencia, que entendemos, más significativas en este sentido.

1) La inyección de agonistas GABA-A (muscimol) en la FRP es capaz de suprimir el S-REM. Este efecto ocurre tanto durante episodios de S-REM naturales como en los inducidos por la microinyección de carbacol en el NPO (Xi et al., 2004; Grace et al., 2014). Similares resultados fueron obtenidos en la rata (Sandford et al., 2003). La aplicación de muscimol en el núcleo RPO (reticularis pontis oralis) suprime el S-REM en tanto que la inyección de un antagonista específico GABA-A (bicuculina) lo incrementa.

2) Los niveles de GABA en la formación reticulada pontina muestran variaciones dependientes del estado comportamental (revisado por Watson et al., 2011). Los niveles de GABA y ACh detectados por microdiálisis del PnO durante el ciclo sueño-vigilia, indican que la aparición de los episodios de S-REM se asocian a niveles mínimos de GABA y niveles elevados de ACh en tanto que durante el sueño no REM esta relación se invierte (Vanini et al., 2011).

3) La aplicación de un antagonista colinérgico muscarínico (atropina) es capaz de bloquear el S-REM inducido por un antagonista GABAérgico de los receptores de tipo GABA-A (Gabazina) (Marks et al., 2008). Evidencias morfológicas e inmunohistoquímicas obtenidas recientemente (Liang et al., 2014) indican la presencia de receptores GABAérgicos en fibras colinérgicas que se distribuyen en el PnO sugiriendo la interacción ACh-GABA a este nivel, propuesto como probable sustrato de la covariación de los niveles de GABA y ACh durante el ciclo sueño-vigilia (Vanini et al., 2011).

Como se mencionara en la sección anterior y en virtud del papel de la innervación GABAérgica de la FRP en el control del S-REM que ha sido recogido en el modelo de interacción GABAérgica/glutamatérgica (Luppi et al., 2012), **la ACh, podría participar como neuromodulador provocando cambios coordinados y relativamente difusos de las propiedades intrínsecas y de los contactos sinápticos de la red neural mesopontina, promoviendo fenómenos de reconfiguración circuital.** La ACh a nivel mesopontino, en lugar de desempeñar un papel inductor de S-REM, pasaría a desempeñar un papel permisivo para la generación de este estado comportamental, visión coherente con la concepción actual relativa a la transmisión colinérgica en el SNC que le asigna un papel esencialmente neuromodulador (Picciotto et al., 2012).

### 1.2. Modulación colinérgica de la eficacia sináptica en la red mesopontina.

Si bien se ha sugerido la eventual influencia de GABA sobre las terminales colinérgicas a nivel de la FRP (Marks et al., 2009), la posibilidad de que ACh promueva cambios de la eficacia en los contactos GABAérgicos que reciben las neuronas de la FRP ha sido escasamente explorada. En este sentido se destacan los reportes de Heister et al. (2009) y de Weng et al. (2014) que analizan los efectos de agentes colinomiméticos sobre diversos tipos neuronales de la FRP y sobre la actividad sináptica espontánea y la provocada por activación de aferentes GABA/glutamatérgicas de origen indeterminado.

La ACh en el SNC es capaz de actuar tanto en receptores muscarínicos como nicotínicos. En términos generales los receptores muscarínicos son metabotrópicos y asocian diversos mecanismos de señalización intracelular asociados a proteínas G; (Picciotto et al., 2012). Asimismo, la localización tanto pre como postsináptica de los receptores muscarínicos da cuenta de una amplia variedad de efectos. Farmacológicamente, y de acuerdo al tipo de proteína G asociada al receptor es posible distinguir 5 tipos de receptores designados como M1 a M5. Los subtipos M1, M3 y M5 asocian proteínas G de la familia Gq/11, están acoplados positivamente a la vía del fosfatidilinositol y son sensibles a diferentes antagonistas específicos que permiten su identificación. Los subtipos M2-M4, en cambio, asocian proteínas G del tipo G i/o y están acoplados negativamente a la adenilatociclasa. Los receptores M1, M3 y M5 suele asociar efectos excitadores en tanto que los M2 y M4 suele provocar efectos inhibidores. A nivel presináptico la activación de receptores del primer grupo suele mediar un efecto de facilitación, en general de corto plazo, de la transmisión

sináptica en tanto que la activación de receptores M2 o M4 se asocia al efecto opuesto (depresión o inhibición presináptica). El efecto inhibitor es el que ha sido mejor caracterizado y en general obedece a la inhibición, mediada por proteína G, de los canales de calcio presinápticos implicados en la liberación de neurotransmisor (Brown, 2010).

Por su parte, los receptores nicotínicos son ionotrópicos y de localización preferentemente presináptica en la propia terminal o a nivel axonal cercano a la terminal presináptica (preterminal). Estos receptores son oligómeros compuestos por 5 subunidades. En la actualidad se distinguen diversos tipos de subunidades que se designan como alfa (9 tipos, 1-9), beta (4 tipos, 1-4), gamma, delta o epsilon. Los diversos subtipos de receptores nicotínicos surgen de la combinación de varias subunidades (hetero-oligómeros) o del ensamblaje de un mismo tipo de subunidad. Los subtipos alfa4-beta2 y alfa7 son los más frecuentes en el SNC (Lukas et al., 1999).

En el SNC, el papel principal de los receptores colinérgicos nicotínicos consiste en la modulación de la transmisión sináptica a través del control de la liberación de neurotransmisor (Wonnacott, 1997). La nicotina (Nic.) ha sido implicada en la facilitación de diversos tipos de contactos sinápticos incluyendo GABAérgicos, glutamatérgicos, colinérgicos, dopaminérgicos y serotoninérgicos (Zhang & Warren, 2002; Zhong et al., 2014). En general el fenómeno de facilitación presináptica resulta de un incremento del calcio citosólico en la terminal como consecuencia de la activación de los receptores nicotínicos. Estos receptores presentan una permeabilidad a calcio relativamente elevada (particularmente los alfa7).

La modulación de la transmisión sináptica provocada por la activación de receptores colinérgicos localizados en terminales no colinérgicas se conoce como modulación heterosináptica. La localización presináptica de los receptores colinérgicos en el SNC, posición estratégica para la modulación específica de circuitos neuronales, sugiere el papel central de la ACh como neuromodulador (Picciotto, 2012).

A nivel de la red mesopontina implicada en el control del S-REM la modulación colinérgica de la eficacia de los contactos sinápticos que la integran ha sido poco estudiada. En neuronas de la FRP en la rata, la aplicación de colinomiméticos (CCh) produce inhibición presináptica de las entradas glutamatérgicas a través de un efecto predominantemente muscarínico (M2) en tanto que no afecta mayormente la transmisión GABAérgica (Heister et al., 2009). En contraste, en neuronas del SLD identificadas como neuronas de proyección descendente y presumiblemente implicadas en la atonía del S-REM, que en presencia de CCh provoca la facilitación de

las entradas glutamatérgicas a través de receptores de tipo M1 y M3 (Weng et al., 2014). En suma estos estudios muestran una importante divergencia en los resultados obtenidos probablemente porque se analizan diferentes sectores de la FRP y en ambos casos no se obtuvo evidencia que indicara el origen de las entradas sinápticas en estudio.

Al margen de los resultados conflictivos reseñados más arriba, los efectos de los agonistas colinérgicos sobre entradas sinápticas GABAérgicas a las neuronas del PnO procedentes del LDT-PPT no han sido explorados aún. La eventualidad de la existencia de fenómenos de modulación heterosináptica de entradas GABAérgicas a las neuronas del PnO es particularmente relevante si se considera el papel de la innervación GABAérgica de la FRP en el control del S-REM y la existencia de neuronas GABAérgicas del LDT-PPT cuya descarga se correlaciona específicamente con el S-REM o con los estados de Vigilia y S-REM. Asimismo, esta posibilidad es coherente con un papel modulador o permisivo de la ACh para la generación del S-REM y pondría de manifiesto fenómenos de reconfiguración circuital dependientes de estado a nivel mesopontino, como probable sustrato neural para la generación y control de este estado comportamental.

## 2. HIPÓTESIS y OBJETIVOS.

La hipótesis central del presente trabajo sostiene que la acción colinérgica a nivel del PnO asociada a episodios de S-REM no solamente incluye la modificación de la actividad de las neuronas (Núñez et al., 1997; Núñez et al., 1998) de este núcleo sino que implica, además, la modulación específica de las entradas sinápticas que estas neuronas reciben. Así, de acuerdo a nuestra hipótesis, la activación de las aferentes colinérgicas al PnO implicadas en la generación del S-REM sería capaz de provocar una profunda modificación de la relación entrada-salida de las neuronas del PnO a través de la modulación de sus propiedades intrínsecas conjuntamente con cambios plásticos dependientes de estado de la eficacia de los contactos sinápticos que estas células reciben.

Aun cuando en el laboratorio de ejecución hemos llevado a cabo una caracterización primaria de la rodaja mesopontina del tronco encefálico de la rata que se ha utilizado para poner a prueba nuestra hipótesis, en una primera etapa trabajamos guiados por los siguientes objetivos específicos (OE) tendientes a profundizar en la caracterización.

**OE1a.-** Se combinaron técnicas morfológicas, electrofisiológicas y farmacológicas para profundizar en la caracterización de las propiedades electrofisiológicas básicas de las neuronas del PnO.

b.- Asimismo se desarrollaron abordajes específicos tendientes a la obtención de evidencias anatómicas y funcionales a favor de la existencia de contactos sinápticos entre neuronas del LDT-PPT y del PnO en la rodaja de la unión ponto-mesencefálica.

**OE2.-** Visto las evidencias experimentales recientes (ver particularmente Vanini et al., 2011, y Boucetta et al., 2014) que jerarquizan el papel de la inervación GABAérgica del FRP en la generación del S-REM, nos abocamos a analizar las propiedades funcionales de las entradas sinápticas GABAérgicas a las neuronas del PnO procedentes del LDT-PPT. Se realizaron maniobras experimentales tendientes a caracterizar tanto las propiedades de las terminales presinápticas como de los receptores postsinápticos involucrados.

**OE3.-** Finalmente, una vez cumplidos los OE anteriores fue posible emprender el análisis de los efectos de la aplicación local de colinomiméticos en el PnO sobre estos contactos sinápticos. Durante esta etapa se analizó los cambios de la eficacia sináptica de los contactos GABAérgicos provocados por la aplicación yuxtacelular de

colinomiméticos y se buscó determinar en qué medida estos cambios pudieran obedecer a mecanismos pre y/o postsinápticos.

### 3. METODOLOGÍA.

#### 3.1. Aspectos metodológicos generales.

##### 3.1.1. Obtención de la rodaja, registro y estimulación.

Los animales se obtuvieron de la Unidad de Reactivos y Biomodelos Experimentación (U.R.B.E.) de la Facultad de Medicina, UdelaR y los procedimientos utilizados fueron oportunamente aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación animal y la Comisión de Experimentación Animal de Facultad de Medicina (Exp. N° 071140-000654-10).

Se utilizaron ratas de cepa Wistar entre P7 y P15. En esta etapa de la vida post-natal la mielinización no ha alcanzado el desarrollo del adulto, aspecto que fue relevante a la hora de optimizar las condiciones de visualización de las neuronas a registrar (ver más adelante).

Las ratas fueron decapitadas con guillotina procediendo luego a realizar una craneotomía ampliada, para acceder y remover rápidamente el tronco encefálico. Durante la disección, el SNC se bañó continuamente con solución de líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) modificado: Sacarosa 213 mM, KCl 2.7 mM, H<sub>2</sub>KO<sub>4</sub>P 1.25 mM, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM, glucosa 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM a 4°C. La sustitución equimolar del ion sodio por sacarosa constituye una de las estrategias que ha sido utilizada para reducir la actividad neuronal de la pieza y con ello la actividad sináptica, buscando reducir los procesos de excitotoxicidad y muerte neuronal (Aghajanian & Rasmussen, 1989).

La pieza obtenida se fijó por su sector cefálico a la platina de un vibrátomo (Vibratome 1000plus, Vibratome) sumergiéndola en LCRA modificado a 4°C. Se realizaron cortes transversales al eje mayor del tronco encefálico, para obtener secciones de 350-450 µm de espesor. Las rodajas la unión ponto-mesencefálica obtenidas conteniendo las estructuras de interés se transfirieron a un recipiente especialmente acondicionado conteniendo una mezcla (50%-50%) de solución de LCRA normal NaCl 126 mM, KCl 5 mM, glucosa 10 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM, Hepes 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 2mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM y LCRA modificado a temperatura ambiente (20 a 22°C). La mezcla de LCRA se reemplazó en forma paulatina hasta alcanzar el 100% de solución LCRA normal, proceso que insumió alrededor de 1 hora. Finalizado el cambio de solución, las rodajas fueron transferidas a la cámara de registro (cámara de inmersión), y se perfundieron en forma continua (1-3 ml/min) con solución LCRA normal a temperatura ambiente. Durante el procedimiento de obtención de la rodaja, así como a lo largo de la sesión de registro, el LCRA fue burbujeado continuamente

con carbógeno (95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>) a los efectos de estabilizar el pH (7.4) y promover la oxigenación. Para esta tesis, se ajustó el procedimiento de obtención de las rodajas con vistas a conservar en una misma rodaja las estructuras clave de la red mesopontina implicada en el control del S-REM (ver más adelante). Para ello, las secciones del tronco encefálico se obtuvieron de manera tal que el plano de corte formó un ángulo de 4-6° con respecto a los cortes coronales (Fig. 2A).

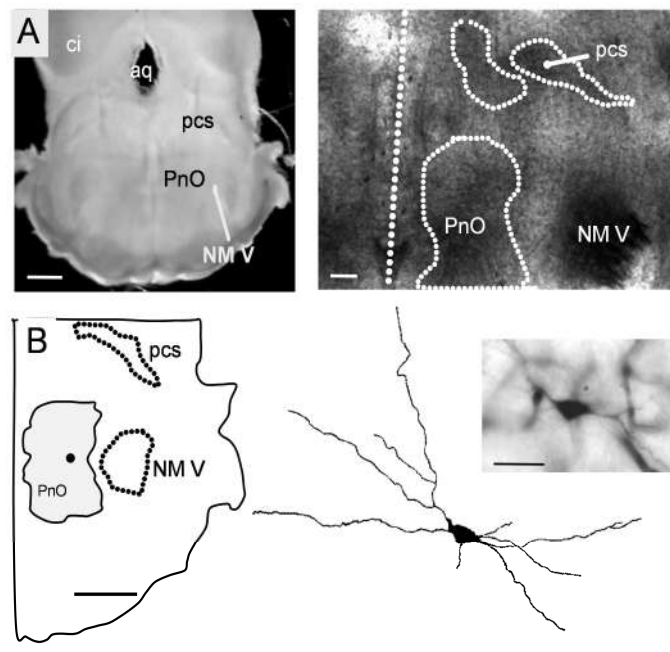
En la Introducción hicimos referencia a que algunos autores (Reinoso-Suárez, et al., 2007) consideran como central a la red mesopontina ubicada en el sector rostral de la FRP situada ventralmente al pcs, medial al sector más rostral del NMV y lateral a la línea media y al núcleo pontino del rafe. Específicamente, como área de trabajo hemos seleccionado el sector más dorsal de lo que autores como Paxinos & Watson (1998) reconocen como PnO. El área delimitada se ilustra en la Fig. 2 C. Dado que la rodaja de la unión ponto-mesencefálica se obtuvo inclinando el plano de corte respecto de la perpendicular al eje mayor del tronco a nivel del sector más rostral del NMV, el sector tegmental de nuestra rodaja se asemeja al sector ventral del corte - 8.72 mm del Bregma del atlas de Paxinos & Watson (1998) en tanto que el sector tectal (y el perfil de la cavidad ventricular) es relativamente más rostral y sería similar al del corte (~ - 8,30 mm del Bregma) del mismo atlas (Fig. 2A). De manera característica en nuestra rodaja se visualiza claramente el pcs que se dispone de manera oblicua de dentro afuera y de dorsal a ventral. La presencia en la rodaja del pcs con las características citadas y del polo rostral del NMV así como el perfil de la cavidad ventricular se consideró como indicación de que tanto el nivel del corte como su inclinación fueron los adecuados para el desarrollo del trabajo.

Una vez finalizada la etapa de incubación y sustitución de soluciones, la rodaja se transfirió a la cámara de registro que se montó en la platina de un microscopio (Nikon, Eclipse FN1) dotado de iluminación infra-roja y óptica para contraste de interferencia diferencial (DIC-IR) con objetivos X4 y X40 (inmersión en agua) para el reconocimiento de las diferentes estructuras de la rodaja y de los cuerpos neuronales. El microscopio dispone de una cámara digital (319CU 3.2M CMOS, Micrometrics) conectada a un ordenador lo cual permitió, mediante la utilización del software Micrometrics LE-v1.0.3, la visualización de las neuronas, la colocación de los electrodos de estimulación y registro y de las micropipetas para aplicación local de sustancias así como la captura y posterior análisis de imágenes.

### 3.1.2. Estímulo eléctrico.



Para la estimulación eléctrica del área del LDT-PPT se utilizó un electrodo metálico bipolar (nichrome, 75 micras) conectado a un estimulador GRASS S88 (Grass Medical Instruments, Quincy Mass USA) a través de una SIU controlada por una señal de tipo TTL (2620 Stimulus Isolator, Tektronik Beaverton Oregon, USA) por medio de la salida



**Figura 3. Características de la rodaja mesopontina. A. Izquierda.** Imagen panorámica de la rodaja en estudio. Por transiluminación es posible distinguir algunas de las estructuras de interés: la porción motora del V par craneano (NM V), el pedúnculo cerebeloso superior (pcs), la porción rostral de la formación reticulada pontina (PnO). Se señalan además el colículo inferior (ci) y el acueducto (aq). Calibración: 500  $\mu$ m. **Derecha.** Fotografía de la preparación en el microscopio con DIC-IR (objetivo 4x). Se distinguen las estructuras clave (PnO, NM V y el pcs) que fueron delimitadas con líneas punteadas y se señala la línea media para referencia (línea recta punteada oblicua). Se incluye además la localización estimada del núcleo tegmental laterodorsal (LDT) próximo al polo medial del pcs. Calibración 200  $\mu$ m. **B.** Esquema del cuadrante ventrolateral de la rodaja en estudio obtenida de un experimento en el que se inyectó una neurona del PnO con neurobiotina. La neurona fue fotografiada luego del revelado (inserto arriba derecha, calibración 20  $\mu$ m) y reconstruida en el dibujo de cámara clara (inserto abajo derecha, calibración 20  $\mu$ m). Note el cuerpo neuronal ligeramente triangular y los campos dendríticos de orientación oblicua extendiéndose uno en dirección dorsal y medial y el otro con orientación lateroventral, en el plano de la rodaja. La localización aproximada de la neurona en el PnO se indica con un círculo negro en el esquema.

digital de la tarjeta de conversión (Digidata 1322). Los parámetros de estimulación fueron controlados por el software (Clampex 8, paquete pClamp, Axon Instruments). A los efectos de activar neuronas del LDT-PPT y/o de sus axones -aún cuando no es posible descartar la activación de otras fibras de pasaje- y obtener resultados comparables entre experimentos, se procuró ubicar el electrodo de estimulación sistemáticamente en una relación topográfica precisa con el extremo medial del pcs. Para cada experimento se ajustó la intensidad del estímulo hasta obtener una

respuesta de amplitud y latencia estable con valores similares a los observados en otros experimentos de modo de trabajar con una población relativamente homogénea de respuestas postsinápticas.

### 3.1.3. Registro intracelular.

Las neuronas del PnO para el estudio se seleccionaron por inspección con el objetivo 40x dentro de un área comprendida entre el NMV (a 250  $\mu\text{m}$  de su límite medial) y 250  $\mu\text{m}$  de la línea media en el eje horizontal. En el eje dorsoventral, el centro del PnO se topografió a una distancia media de 1250  $\mu\text{m}$  del límite ventral de la rodaja quedando ligeramente ventral al centro aproximado del NMV en el mismo corte (Fig. 3 A derecha). Solo se incluyeron en el estudio aquellas neuronas que presentaron respuestas monosinápticas a la estimulación del LDT-PPT (ver más adelante para criterios utilizados). El registro electrofisiológico de las neuronas se realizó mediante electrodos de patch (resistencia 4-8 Mohm) fabricados con un estirador de pipetas (P-87 Sutter Instruments Co.) en su configuración de célula entera (o de whole cell). Se emplearon medios intracelulares con diferentes composiciones con el fin de controlar el potencial electroquímico de ciertos iones de interés, y la optimización la relación señal-ruido de los registros bioeléctricos. Así, para el estudio de la acción GABAérgica, se optó por una solución con alta concentración de  $\text{Cl}^-$  (150 mM, potencial de equilibrio electroquímico calculado  $\sim 3$  mV) ( $\text{MgCl}_2$  4.6mM, HEPES 10mM, EGTA 1 mM,  $\text{CaCl}_2$  0.1 mM, ATP-Na 4 mM, GTP-Na 0.3 mM) de tal manera que en el potencial de reposo (potencial de mantenimiento,  $V_h$  -70 mV) la corriente sináptica GABAérgica fue de entrada y fácilmente detectable. En aquellos experimentos en los que se analizaron corrientes sinápticas glutamatérgicas se empleó un medio intracelular basado en gluconato de  $\text{K}^+$  (Gluconato de  $\text{K}^+$  144mM, EGTA 0,2mM,  $\text{MgCl}_2$  3mM, HEPES 10mM, NaGTP 0,3mM,  $\text{Na}_2\text{ATP}$  4mM).

Los electrodos de patch se posicionaron mediante un micromanipulador hidráulico (Narishige MHW-13) y se conectaron a un amplificador Axoclamp 2B (Axon Instruments), optando por la modalidad de fijación de corriente y/o de voltaje según las necesidades específicas del experimento. Se compensó la resistencia del electrodo (al 100% en condiciones de fijación de corriente) o la resistencia en serie (hasta un 50%) para el registro en condiciones de fijación de voltaje. Los protocolos específicos en ambas modalidades de registro fueron aplicados utilizando el software CLAMPEX 8.0 (pClamp, Axon Instruments). Las señales bioeléctricas registradas se digitizaron

(Digidata 1322A Data Acquisition System, Axon Instruments) para su almacenamiento en un ordenador y su posterior análisis.

### **3.2. Caracterización de las propiedades electrofisiológicas básicas de las neuronas del PnO.**

Una vez seleccionada (según profundidad, tamaño del soma neuronal) la neurona a registrar en el área descrita, de manera sistemática se consignó tanto el tamaño de su soma (dimensiones aproximadas en micras) como su forma antes de proceder a realizar el sello con la pipeta de patch. Para la obtención del registro se procedió de manera estándar (Hamill et al., 1981) en condiciones de fijación de voltaje. Brevemente, se colocó la pipeta sobre el soma neuronal hasta lograr un contacto estrecho con la membrana, se liberó la presión positiva con la que se realizó el descenso del electrodo y se monitorizó el incremento de la resistencia del electrodo hasta la conformación del sello ( $R > 1 \text{ GOhm}$ , condición de "cell attached") al tiempo que se llevó lentamente el potencial de mantenimiento ( $V_h$ ) hasta un valor cercano a  $-70 \text{ mV}$ . Una vez estabilizado el sello se ejerció una leve presión negativa hasta la apertura del mismo evidenciado por el incremento abrupto de la corriente capacitiva y la aparición de una corriente de pérdida durante la aplicación del comando de voltaje ( $10 \text{ mV}$ ,  $20 \text{ ms}$ ). En algunos experimentos (determinación del efecto de GABA sobre la excitabilidad neuronal) el procedimiento se detuvo en la condición de cell attached. Una vez abierto el sello, se llevó a cabo la caracterización electrofisiológica de la neurona (ver más adelante) y se buscó correlacionar estas propiedades con las características del soma neuronal consignadas previamente.

#### **3.2.1. Caracterización electrofisiológica.**

A los efectos de la identificación de los diversos tipos neuronales, una vez obtenido el registro intracelular estable (aproximadamente 5 minutos luego de la apertura del sello) y compensada la resistencia del electrodo se procedió a consignar el valor de  $V_m$  y a aplicar protocolos específicos para estimar la resistencia de entrada de la neurona ( $R_e$ ). De manera rutinaria, la  $R_e$  se evaluó mediante una serie de pulsos de corriente hiperpolarizantes y despolarizantes (fijación de corriente). En Clampfit (pClamp 8) se midieron  $I_m$  (corriente inyectada) y el  $V_m$  resultante para cada pulso, mediante cursores colocados en el instante correspondiente al máximo de respuesta para el pulso máximo hiperpolarizante (típicamente a  $50\text{-}70 \text{ ms}$  del inicio del pulso). Los valores obtenidos se graficaron (gráfico  $V$  vs  $I$ ) y la  $R_e$  se estimó por ajuste de una

recta a los puntos del sector lineal del gráfico (típicamente entre 0 y -60 mV). En otras ocasiones, en condiciones de fijación de voltaje, se empleó una rampa de voltaje (520 ms, -90 a -50 mV) y se midió la corriente durante la rampa. En estos casos, el gráfico (I vs V) se obtuvo representando el trazado de corriente contra el correspondiente trazado de voltaje durante la aplicación de la rampa, se ajustó una recta a los puntos representados y se estimó la  $R_{in}$  según los parámetros de la recta ajustada ( $1/\text{pendiente}$ ). Este método permitió monitorizar los cambios de la  $R_{in}$  concomitantemente con los cambios en las corrientes sinápticas provocados por la aplicación local de agonistas colinérgicos.

Se analizaron las propiedades electrofisiológicas activas más sobresalientes de las neuronas registradas utilizando protocolos específicamente diseñados. Se recurrió tanto a condiciones de fijación de corriente como de voltaje, para poner de manifiesto conductancias de membrana características de los diversos tipos neuronales presentes en las neuronas del PnO ( $I_A$ ,  $I_h$ ,  $I_T$ ) e identificadas en estudios previos como representativas del fenotipo electrofisiológico de las neuronas de este sector de la FRP (Greene et al., 1986; Gerber et al., 1989; Stevens et al., 1992; Núñez et al., 1997; Núñez et al., 1998; Núñez et al., 2002; Heister et al., 2009, Weng et al., 2014). Los registros se analizaron utilizando el programa Clampfit 9, parte del paquete de software de pClamp (Axon Instruments, Inc.). Las características específicas de los protocolos utilizados para poner de manifiesto cada tipo de corriente de membrana se describen con la presentación de los resultados correspondientes.

### 3.2.2. Marcaje intracelular.

En una serie experimental se procedió al marcaje intracelular de las neuronas registradas con vistas al establecimiento de su citomorfología general (soma y prolongaciones) y su correlación con los hallazgos electrofisiológicos.

Para ello, los electrodos de patch utilizados para los registros intracelulares se llenaron con solución intracelular basada en gluconato conteniendo neurobiotina (2%) lo que permitió la caracterización electrofisiológica de la neurona y demás maniobras experimentales durante la difusión del colorante en el medio intracelular. En todos los casos se estimó como necesario que transcurrieran al menos 15 minutos de registro estable para asumir la tinción adecuada de la neurona (Mobbs et al. 1994). Una vez finalizado el experimento se retiró el electrodo de registro a la vez que se ejerció una leve presión positiva, intentando preservar la integridad neuronal. La rodaja permaneció en la cámara por un período no menor a 4 horas esperando una adecuada

difusión del colorante en la célula marcada y luego se fijó durante una noche (overnight ~8 horas) en paraformaldehído al 4% en buffer fosfato (0.1 M). Finalizada la fijación se pasó a una solución de buffer fosfato (PBS, pH 7,3) hasta el posterior procesamiento para observación. En cada rodaja se marcó únicamente una neurona del PnO, para facilitar su identificación y la adecuada correlación con los hallazgos electrofisiológicos.

Para el revelado, se utilizó Vectastain ABC System (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) empleando el procedimiento descrito originalmente por Kita & Armstrong (1991). Después de varios lavados con PBS, la rodaja fue tratada con Triton-X100 (0,4% en PBS) durante 1 a 2 horas y después se incubó en VECTASTAIN® ABC reactivo en PBS durante 2 horas. Después de varios lavados con PBS, se hicieron reaccionar con diaminobencidina (DAB 0,05%) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,003%) en PBS para visualizar la neurona inyectada.

Las preparaciones histológicas se observaron con microscopia óptica (Nikon Optiphot), documentando mediante fotografía digital (Kodak MDS120). Las neuronas marcadas se fotografiaron y dado que ocuparon más de un plano focal se procedió a su reconstrucción mediante el uso de un dispositivo de cámara clara acoplado a un microscopio Olympus BX60.

### **3.3. Marcaje retrógrado e inmunohistoquímica.**

La presencia de neuronas del LDT-PPT conectadas con elementos neurales del PnO en la rodaja de la unión ponto-mesencefálica se exploró mediante la aplicación por iontoforesis de marcador retrógrado en el PnO. Para ello, una pipeta conteniendo solución de neurobiotina al 2% (Lapper & Bolam, 1991) en acetato de potasio (4 M) posicionó en el centro aproximado del núcleo y se aplicaron pulsos de corriente de polaridad alternante de hasta 5 µA de amplitud y 500 ms de duración a una frecuencia ~ 0.8 Hz durante 30 min. Finalizada la inyección de neurobiotina se aguardó un mínimo de 4 horas (usualmente cerca de 8 hs) antes de proceder a la fijación de la preparación. El revelado se realizó con un protocolo similar al utilizado para la inyección intracelular excepto cuando el marcaje se combinó con inmunohistoquímica para colina acetiltransferasa (ChAT) (ver luego). En estos casos las rodajas se crioprotegieron y se obtuvieron cortes de 30 µm con criostato (Reichert-Jung).

En los casos que se realizó una doble inmunotinción las secciones fueron procesadas para neurobiotina y para ChAT. Los cortes se lavaron varias veces en PBST (0,1 M PBS con 0,3% Triton X-100); para luego incubarse con anticuerpo contra

ChAT (Chemicon, CA; dilución 1: 2000) en solución PBST durante la noche. Al siguiente día, las secciones se lavaron en PBST durante 30 minutos; luego se incubaron 90 min en PBST que contenía anti-IgG de conejo biotinilado (Vector Laboratories, Burlingame, CA; diluido a 1: 300) seguido por incubación en el complejo ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA; diluido a 1: 200) durante 90 min. La reacción de color se llevó a cabo incubando las secciones en 50 mM de tampón Tris (pH 7,5) que contiene 0,02% 3,3V-diaminobenzidina (DAB) y 0,015% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 15 -30 min. Después de la reacción DAB, las secciones se lavaron en PBST varias veces y montadas para su observación en microscopio. Las secciones fueron examinadas usando un microscopio Olympus BX60 (Olympus Optical, Tokio, Japón). Las fotomicrográficas se obtuvieron por medio de una cámara digital conectada al microscopio y conectado a un microordenador con Photoshop software (Adobe Systems, San Jose, CA).

Alternativamente para ChAT y neurobiotina se empleó la doble detección por métodos de inmunofluorescencia. En el caso de ChAT, luego de la exposición al anticuerpo primario, las secciones se incubaron en Alexa Fluor 488 burro IgG anti-cabra (Molecular Probes) 1:200. Para neurobiotina se incubaron durante 1,5 h con estreptavidina-Alexa Fluor 568 (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc., West Grove, PA, EE.UU.) diluido 1: 2000.

Cabe aclarar que la aplicación del marcador retrógrado y la fijación de la rodaja se realizó en nuestro laboratorio en tanto que el procesamiento del tejido para la detección de neurobiotina y ChAT se desarrolló en colaboración con el Dr. Jack Yamuy, procedimiento que se llevó a cabo en elVA Greater Los Angeles Healthcare System, Los Angeles; UCLA School of Medicine, Los Angeles, CA USA con el apoyo técnico de Sharon Sampogna.

#### **3.4. Soluciones.**

En varios experimentos se utilizó la aplicación yuxtacelular de soluciones de agonistas para diversos tipos de receptores. Para ello se utilizó un sistema de inyección de microvolúmenes por presión (picospritzer III, Parker Instrumentation). Usualmente los volúmenes inyectados no excedieron los 30 pl estimados empleando el diámetro de la gota en el aire ante pulsos de presión de entre 50 - 150 ms de duración y presiones inferiores a los 30 psi. Se utilizaron pipetas de patch conteniendo las soluciones de agonistas disueltas en solución salina; NaCl 0.9%. Bajo control visual las pipetas se posicionaron a distancias que oscilaron entre 50 y 100 µm de la

neurona registrada. Las concentraciones de agonista utilizadas en la solución de llenado de la pipeta se ajustaron de tal manera de lograr concentraciones de 3 a 5 veces el EC50 del agonista considerado a nivel de la neurona en estudio. La estimación de estas concentraciones se realizó según las ecuaciones de difusión simple corregidas según las características del tejido nervioso (Stone, 1985). Para el análisis de la modulación de la entrada sináptica GABAérgica a las neuronas del PnO se utilizaron soluciones de ACh (1 mM), carbamilcolina (Carbacol, CCh 1 mM), Muscarina (10  $\mu$ M) y Nicotina (Nic., 20  $\mu$ M) (concentraciones en la pipeta de inyección). En los experimentos orientados a la determinación del efecto de GABA sobre las neuronas del PnO se utilizó una solución de GABA (1 mM), o Muscimol (100  $\mu$ M) concentración en la pipeta de inyección.

Para la estimulación farmacológica del LDT-PPT en la búsqueda de evidencias adicionales a favor de la proyección y conexión sináptica del LDT-PPT sobre las neuronas del PnO se utilizó CCh (1 mM) o Glutamato (Glu., 10 mM). En estos casos, dado que el objetivo consistió en la activación de un elevado número de neuronas, la pipeta se colocó de acuerdo a un criterio topográfico en las cercanías del polo medial del pcs en el LDT-PPT y se utilizaron volúmenes mayores a los descritos más arriba.

En los experimentos iniciales orientados a la determinación de los efectos de agonistas colinérgicos sobre la eficacia de los contactos GABAérgicos sobre las neuronas del PnO se aplicó CCh en bolo ("Fast application" Müller et al., 1988) agregando un volumen de solución de CCh de 30 a 90  $\mu$ l directamente en la cámara de registro logrando una concentración final de 10 a 30  $\mu$ M.

En todos los casos, los antagonistas para diversos tipos de receptores se aplicaron en la solución de perfusión en las siguientes concentraciones: Receptores glutamatérgicos ácido quinurénico 5 mM. Receptores GABAérgicos picrotoxina (100  $\mu$ M) para GABA-A. Receptores colinérgicos muscarínicos atropina (1-5  $\mu$ M). La aplicación yuxtacelular del agonista GABA-B, Baclofen (500  $\mu$ M), fue utilizado para detectar la presencia de estos receptores.

### **3.5. Análisis de las corrientes sinápticas.**

Las respuestas sinápticas fueron analizadas con el software Clampfit 9. Salvo en el caso del estudio de corrientes sinápticas espontáneas, las medidas se realizaron en promedios de 20 respuestas consecutivas a estímulos aplicados a una frecuencia de 0.16 Hz. Aún cuando en algunos experimentos las respuestas se registraron en condiciones de fijación de corriente, en la mayoría de los casos se analizaron en

condiciones de fijación de voltaje ( $V_h$  -70mV). Las respuestas sinápticas presumiblemente glutamatérgicas se registraron en presencia de (picrotoxina 100  $\mu$ M) en tanto que las GABAérgicas se aislaron por perfusión de ácido quinurénico (5 mM), bloqueante inespecífico de receptores ionotrópicos para Glu.. En algunos experimentos, la naturaleza glutamatérgica o GABAérgica de las respuestas sinápticas en estudio se confirmó por perfusión de los bloqueantes específicos para los receptores correspondientes.

En esta tesis las corrientes sinápticas GABAérgicas provocadas por estimulación del LDT-PPT se estudiaron en profundidad y se evaluaron sistemáticamente una serie de parámetros que permitieron determinar las características identitarias de las respuestas sinápticas en estudio así como evaluar sus modificaciones en respuesta a las diversas manipulaciones realizadas. Como se mencionara más arriba, las corrientes GABAérgicas se estudiaron adecuando el potencial de equilibrio electroquímico del ion cloro de tal manera de que en el  $V_h$  de -70 mV las corrientes sinápticas fueron de entrada. Los parámetros caracterizados sistemáticamente fueron:

1. **Amplitud al pico del IPSC.** Medida desde una línea de base de la corriente de mantenimiento hasta el pico máximo de la corriente entrante. Para el estudio de los mecanismos implicados en los cambios plásticos analizados en esta tesis, la amplitud al pico de los IPSCs se midió en repuestas individuales obtenidas en una situación experimental determinada y se calculó la media y desvío estándar (d.s.) de la amplitud de pico para calcular seguidamente el coeficiente de variación de la amplitud de las respuestas (d.s./media).
2. **Latencia.** La latencia de la respuesta sináptica, particularmente durante el análisis de respuestas individuales, se midió utilizando el programa Stimfit (<https://github.com/neurodroid/stimfit>). El programa detecta automáticamente el comienzo de la respuesta sináptica (pie) como la intersección de la línea de base y una línea recta que pasa por dos puntos en los cuales la corriente equivale al 20 y 80% del pico de corriente máxima (Jonas et al., 1993). La determinación de la latencia de repuestas individuales permitió estimar su variabilidad ante diversos patrones de estimulación, parámetro utilizado en la determinación del carácter monosináptico de la conexión. Rutinariamente la latencia al pie de la respuesta sináptica se midió además sobre el promedio de repuestas con el programa Clampfit (pClamp 9).
3. **Tau on y tau off.** El curso temporal de la corriente sináptica, tanto en sinapsis centrales glutamatérgicas (Jonas, 2000) como GABAérgicas (Mody & Pearce,



2004) depende de un conjunto de factores tanto pre como postsinápticos (Eyre et al., 2012), y es considerado una de las características distintivas de un contacto sináptico dado. Por ello la fase de ascenso al pico como la de relajación a la corriente de mantenimiento en respuestas promedio se ajustaron a una única exponencial (ver Fig. 12), según la función:

$$f(t) = \sum_{i=1}^n A_i e^{-t/\tau_i} + C$$

4. **PPR** (del inglés: **Paired Pulse Ratio**). Se evaluó el comportamiento de los IPSC ante protocolos de pulsos pareados (intervalo 100 a 150ms). Se calculó el PPR según la fórmula:  $R2/R1$ , donde  $R1$  y  $R2$  corresponden a la eficacia sináptica (amplitud de pico promedio incluyendo los fallos) del 1º IPSC y 2º IPSC, respectivamente. El valor del PPR de un contacto sináptico no solo indica algunas de las propiedades funcionales del contacto (particularmente a nivel presináptico) sino que además, modificaciones del PPR durante los cambios de la eficacia sináptica provocados por agonistas colinérgicos pueden orientar hacia la participación de mecanismos presinápticos en estos fenómenos plásticos (Kamiya & Zucker, 1994).

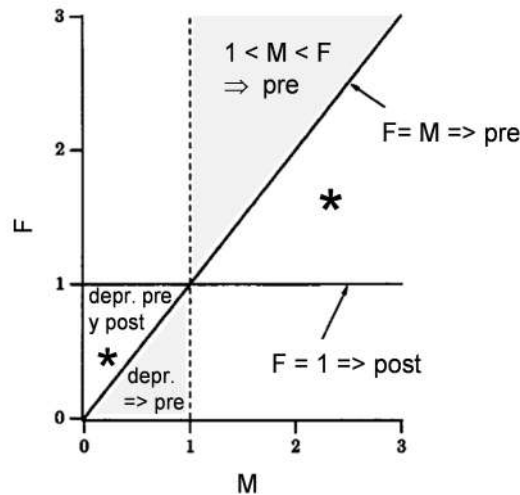
La determinación del carácter monosináptico de las respuestas GABAérgicas provocadas por la estimulación del LDT-PPT constituyó un aspecto relevante que fue abordado específicamente en las etapas iniciales del desarrollo de nuestro trabajo (Ver capítulo de resultados correspondientes al OE1). En este abordaje, la evaluación de la variabilidad de la latencia durante series de estímulos de alta frecuencia (< 50 Hz) así como la bondad del ajuste a una única exponencial de las fases de ascenso y de relajación de las corrientes sinápticas provocadas por estímulos del LDT-PPT constituyeron criterios determinantes.

Para el análisis de los mecanismos involucrados en los cambios de la eficacia sináptica provocados por los agonistas colinérgicos, además de los cambios asociados en el PPR, se aplicó el análisis de la relación de los cambios de la amplitud media provocados por el agonista y los cambios asociados del coeficiente de variación de las respuestas postsinápticas (Faber & Korn, 1991; Fernández de Sevilla et al., 2002). Este análisis constituye un abordaje indirecto para indagar acerca del mecanismo prevalente en un cambio específico de la eficacia sináptica provocado por alguna maniobra experimental. La interpretación de los resultados de este análisis, asume que la liberación de neurotransmisor por parte de la aferencia sináptica en estudio es cuantal y que las amplitudes de las respuestas provocadas por una serie

suficientemente grande de estímulos presenta una distribución binomial. En este marco, la amplitud media del IPSC provocado por la estimulación del LDT-PPT puede expresarse como el producto  $IPSC = q.n.p$ , donde “**q**” es el tamaño del cuanto -que depende de la cantidad de neurotransmisor y del número de receptores postsinápticos activados-, “**n**” el número de sitios activos o sitios de liberación, “**p**” es la probabilidad de liberación de un cuanto en cada sitio activo. Las modificaciones en la amplitud del IPSC pueden ser debidas a cambios en cualquiera de estos parámetros. Asumiendo que **p** es similar para cada sitio activo y que **n** es relativamente pequeño, es posible demostrar que la probabilidad de liberación de neurotransmisor determina el coeficiente de variación (CV) de la amplitud de las respuestas (Faber & Korn, 1991);  $CV = d.s./media = [(1 - p)/np]^{1/2}$ , donde d.s. corresponde al desvío estándar y  $M = n.p.q$  a la media de la respuesta sináptica. Así, el CV se hace independiente del tamaño cuantal, parámetro que suele ser difícil de determinar en la mayoría de las sinapsis centrales. Así a mayor probabilidad de liberación, menor es el CV (o  $CV^2$ ) de las respuestas obtenidas. La evaluación del mecanismo implicado en un cambio de la eficacia sináptica provocado por una determinada maniobra experimental se facilita con la construcción del gráfico **F** vs **M** (Fig. 4), donde **F** corresponde al cociente de  $CV^2_{Control} / CV^2_{maniobra}$  y **M** al cociente de la amplitud media del IPSC obtenido luego de realizada la maniobra sobre la amplitud media control:  $M = IPSC_{maniobra}/IPSC_{control}$

Este gráfico, aún cuando asume propiedades del contacto sináptico en estudio que no son fácilmente demostrables (número de sitios de liberación, número de aferentes activadas por el estímulo, homogeneidad de la probabilidad de liberación en todos los sitios de liberación, p.ej.) ha sido utilizado para obtener una orientación relativamente confiable (ver sin embargo más adelante) respecto del sitio, pre o postsináptico, donde operarían las modificaciones responsables del cambio de la eficacia del contacto (Faber & Korn, 1991). En términos generales, si los puntos experimentales se distribuyen a lo largo de la línea horizontal que pasa por el punto  $F=1$  el mecanismo responsable del cambio de eficacia sería exclusivamente postsináptico ya que no se produjeron cambios del CV y por lo tanto ni de **p** ni de **n** (Fig. 4). Alternativamente si los puntos se distribuyen por la diagonal que pasa por el origen (línea de identidad,  $F=M$ ) o en el área situada por encima (en el caso de potenciación) o por debajo de ella (depresión) sombreada en la Fig. 4, es altamente probable que el mecanismo responsable del fenómeno plástico sea de origen presináptico. En el área comprendida entre la línea de identidad ( $F=M$ ) y la horizontal de  $F=1$  los mecanismos implicados en el fenómeno plástico podrían ser mixtos (áreas indicadas por asterisco en la Fig. 4). En

la situación experimental de múltiples entradas activadas con electrodos extracelulares como en nuestro caso en las que no es posible asumir la homogeneidad de  $p$  y en la que la probabilidad de falla de la activación de aferentes es diferente de 0, exige suma cautela en la interpretación de la distribución de los puntos experimentales pudiendo existir importante solapamiento entre las diferentes áreas (Faber & Korn, 1991).



**Figura 4. Aplicación del método del coeficiente de variación de la respuesta postsináptica para la determinación del mecanismo (pre y/o postsináptico) que subyace al cambio de la eficacia un contacto sináptico.** Se representan el cambio del coeficiente de variación de la amplitud de la respuesta postsináptica (F) vs el factor de modificación de la amplitud de la respuesta postsináptica (M) que acompañan el desarrollo de un fenómeno plástico en un contacto sináptico. Valores de  $M > 1$  indican potenciación (incremento de la eficacia sináptica) y de  $M < 1$  señalan depresión (reducción de la eficacia sináptica). La distribución de puntos experimentales en la diagonal ( $F=M$ ) y en las áreas sombreadas indican un mecanismo presináptico prevalente. Los puntos en la línea horizontal ( $F=1$ ) señalan un mecanismo exclusivamente postsináptico. Puntos experimentales en las áreas señaladas por asteriscos sugieren la coexistencia de mecanismos pre y postsinápticos. (Modificado de Faber & Korn, 1991).

### 3.6. Tratamiento estadístico de los datos.

Salvo que se indique específicamente, los valores se presentan como la media  $\pm$  error estándar de la media. La significación estadística de las diferencias en las propiedades analizadas o en las modificaciones provocadas por una determinada maniobra experimental o manipulación se evaluaron con el test de t pareado ( $p < 0.05$ ). En los casos que la población de datos no se ajustó a una distribución normal se empleó el prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, test no paramétrico que compara la mediana de dos muestras. El test no paramétrico de Kolmogórov-Smirnov (test K-S), se empleó para determinar el ajuste de dos distribuciones de probabilidad entre sí.

## 4. RESULTADOS

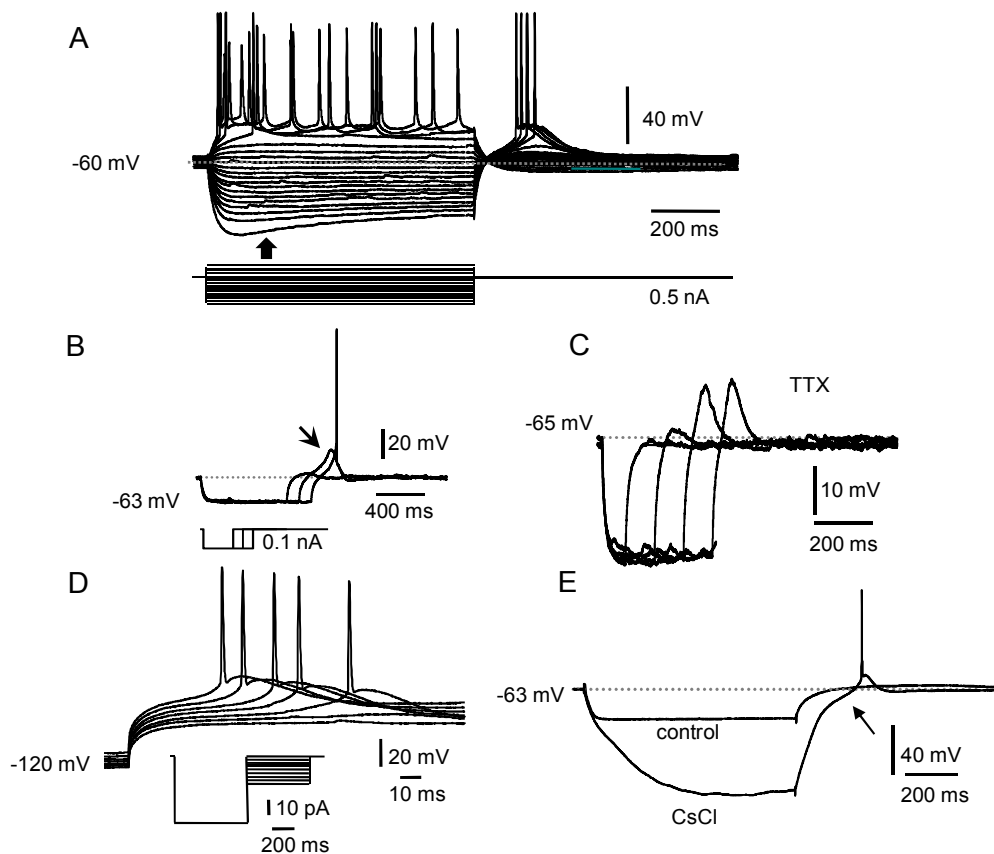
### 4.1. Caracterización de las neuronas del PnO.

#### 4.1.1. Caracterización electrofisiológica.

Una vez constatada la presencia de las estructuras de interés en la rodaja de la unión ponto-mesencefálica (ver M&M), se procedió a la caracterización del fenotipo electrofisiológico de las neuronas del PnO seleccionadas para el registro (n=45). Las neuronas mostraron una  $R_{in}$  de  $292.17 \pm 22.41$  MOhm, valores similares a los descritos en estudios *in vitro* realizados por otros autores (Greene & Carpenter, 1985; Greene et al., 1986; Gerber et al., 1989; Greene et al., 1989; Stevens et al., 1992; Stevens et al., 1993; Imon et al., 1996; Núñez et al., 1997; Núñez et al., 1998; Ito et al., 2002; Núñez et al., 2002; Heister et al., 2009, Weng et al., 2014). La caracterización del fenotipo electrofisiológico se realizó en condiciones de fijación de corriente e incluyó la aplicación de protocolos específicamente diseñados para detectar la presencia de espigas de bajo umbral (LTS, de Low Threshold Spike). Los resultados obtenidos mediante este tipo de protocolos (ver más adelante) permitió categorizar las neuronas registradas en dos grupos LTS (Fig. 5) y No-LTS (sin espiga de bajo umbral, Fig. 6). Una vez establecida esta categorización primaria, se indagó específicamente si la pertenencia de una neurona a una u otra categoría podría condicionar la expresión de otras propiedades electrofisiológicas activas ( $I_h$  e  $I_A$ ), así como las características de las entradas sinápticas y su modulación por colinomiméticos.

En la FRP, varios estudios electrofisiológicos (ver p.ej.: Greene et al., 1986, Núñez et al., 1997) señalan la presencia de neuronas caracterizadas por presentar espigas de bajo umbral (LTS) mediada por la activación de la corriente de calcio transitoria ( $I_T$ ). Este tipo de corriente de calcio, se encuentra normalmente parcial o totalmente inactivada en el reposo y requiere de un  $V_m$  en el rango de -80 a -110 mV durante un tiempo no menor a 500 ms para su desactivación. La LTS, respuesta todo o nada despolarizante de forma característica, despolariza la membrana neuronal y suele desencadenar uno o varios potenciales de acción de sodio (Fig. 5). En esta tesis, se utilizaron varios protocolos específicos en condiciones de fijación de corriente para poner de manifiesto la existencia de LTS. De forma característica, las neuronas LTS (n=21) presentaron una  $R_{in}$  con un valor medio de  $294.14 \pm 35.78$  MOhm y respondieron a pulsos despolarizantes descargando repetitivamente mostrando adaptación de frecuencia (ver Fig. 5A). En este tipo de neuronas la hiperpolarización provocada durante la aplicación de los protocolos para la estimación de la  $R_{in}$  (800 ms de duración) usualmente resultó suficiente para desencadenar una LTS a la salida

de la hiperpolarización (Fig. 5A). Mediante los protocolos específicos para LTS, las neuronas se hiperpolarizaron con pulsos de corriente de amplitud y duración adecuados para producir la desinactivación de la corriente de calcio de tipo T y se consignó la presencia de LTS a la salida del pulso hiperpolarizante (Fig. 5 B y C). La LTS puede ocurrir de manera aislada o desencadenando una o varias espigas de Na<sup>+</sup> (Fig. 5 A y B). En algunos casos (n=3) protocolos similares se aplicaron en presencia de TTX (1 μM) para mostrar que la LTS no implica la participación de canales de sodio transitorios sino que está mediada por canales de calcio (Fig. 5 C). El carácter todo o nada de la respuesta con características compatibles con una LTS observada a la salida de la hiperpolarización se analizó combinando el pulso hiperpolarizante de desinactivación con un segundo pulso hiperpolarizante (aplicado inmediatamente después del pulso precedente, postpulso), de amplitud creciente con la ejecución del protocolo (típicamente de 0 a -0.1 nA en 12 a 20 barridos). De manera característica la hiperpolarización creciente provocada por el postpulso, inicialmente retrasó la LTS y luego provocó su fallo sin haber modificado significativamente su amplitud Fig. 5 D).

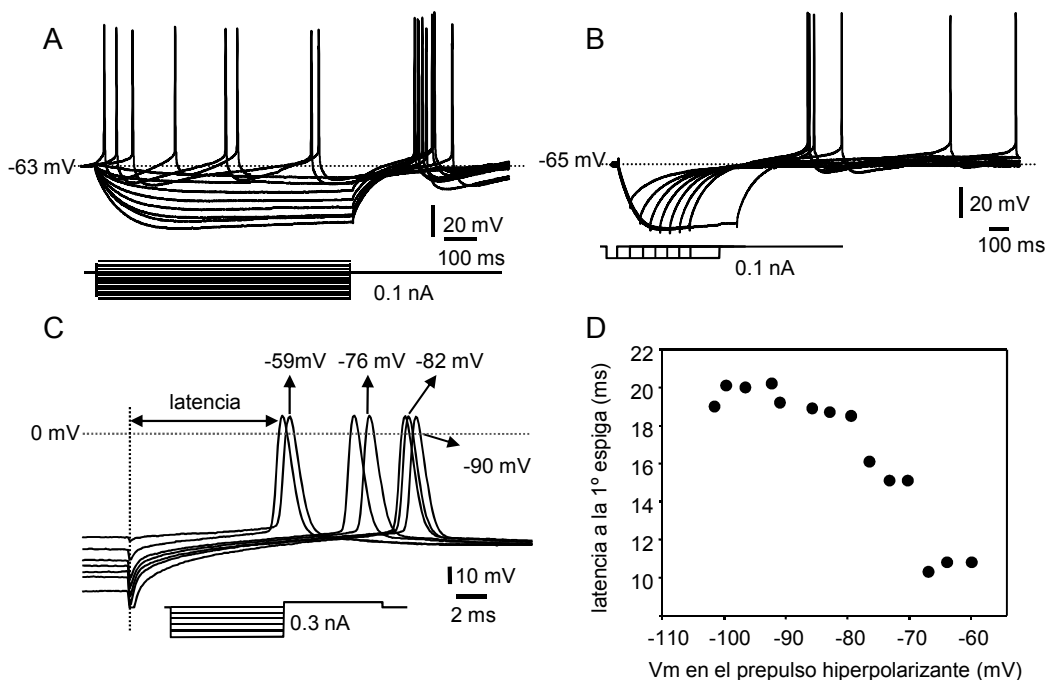


**Figura 5. Caracterización electrofisiológica de las neuronas tipo LTS.** **A.** Familia de respuestas de una neurona LTS al protocolo de corrientes ilustrado en el inserto. A la salida de los pulsos hiperpolarizantes se observa una respuesta despolarizante lenta de tipo todo o nada que alcanza a provocar un potencial de acción de sodio en su fase de ascenso. La flecha señala el inicio de la rectificación que muestran las respuestas a pulsos hiperpolarizantes de mayor amplitud (sag) característico de la corriente  $I_h$ . **B.** Respuestas de la misma neurona a protocolos de corriente diseñados para el estudio de la LTS (ver texto). La respuesta despolarizante a la salida de la hiperpolarización adquiere las características de la LTS (flecha) cuando la duración de la hiperpolarización alcanza un valor crítico (en el ejemplo  $\sim 600$  ms). **C.** Protocolos de corriente similares al utilizado en B son capaces de generar la LTS en presencia de TTX ( $1 \mu\text{M}$ ). **D.** Familia de respuestas de una neurona LTS al protocolo de corrientes ilustrado en el inserto ilustrando el comportamiento todo o nada de la LTS. La hiperpolarización creciente del  $V_m$  durante la LTS provocada por el postpulso produce el incremento progresivo de su latencia hasta su falla sin cambios significativos de su amplitud. **E.** Superposición de respuestas a un pulso hiperpolarizante de  $100 \text{ pA}$ , obtenidas antes (control) y durante la perfusión de CsCl  $3 \text{ mM}$ , bloqueante de la corriente  $I_h$ . El bloqueante elimina la rectificación anómala mediada por esta corriente provocando un incremento del cambio de  $V_m$  en respuesta al mismo pulso de corriente. En estas condiciones, a la salida de la hiperpolarización, se observa una LTS precedida por una trayectoria del  $V_m$  (flecha) que sugiere la participación de una corriente de tipo  $I_A$ .

En un grupo de neuronas estos protocolos no fueron capaces de desencadenar LTS en ningún caso, independientemente de la magnitud y duración de la hiperpolarización aplicadas durante los protocolos. Estas fueron categorizadas como No-LTS ( $n=23$ ). Un ejemplo representativo de este tipo de neuronas se ilustra en la Fig. 6 A y B. En conjunto estas neuronas presentaron una Ren de  $270.07 \pm 28.20 \text{ MOhm}$ , valor que no mostró diferencia estadísticamente significativa con la Ren

promedio de las neuronas LTS (Mann-Whitney test,  $p=0.78$ ). La descarga repetitiva provocada por los pulsos despolarizantes mostró adaptación de frecuencia, comportamiento similar al observado en las neuronas LTS (Fig. 6 A).

La presencia de  $I_h$ , corriente catiónica que se abre por hiperpolarización (McCormick & Pape, 1990; revisado recientemente en He et al., 2014), se evaluó aplicando una serie de pulsos de corriente hiperpolarizante de amplitud creciente (800 ms de duración) en condiciones de fijación de corriente, explorando la eventual participación de esta corriente en las respuestas observadas en un rango del  $V_m$  de entre -70 y -110 mV. Típicamente, para valores de  $V_m$  alcanzados durante el pulso hiperpolarizante del orden de -90 a -100 mV, la presencia de  $I_h$  se manifestó por la presencia del llamado "sag", relajación del  $V_m$  hacia valores relativamente

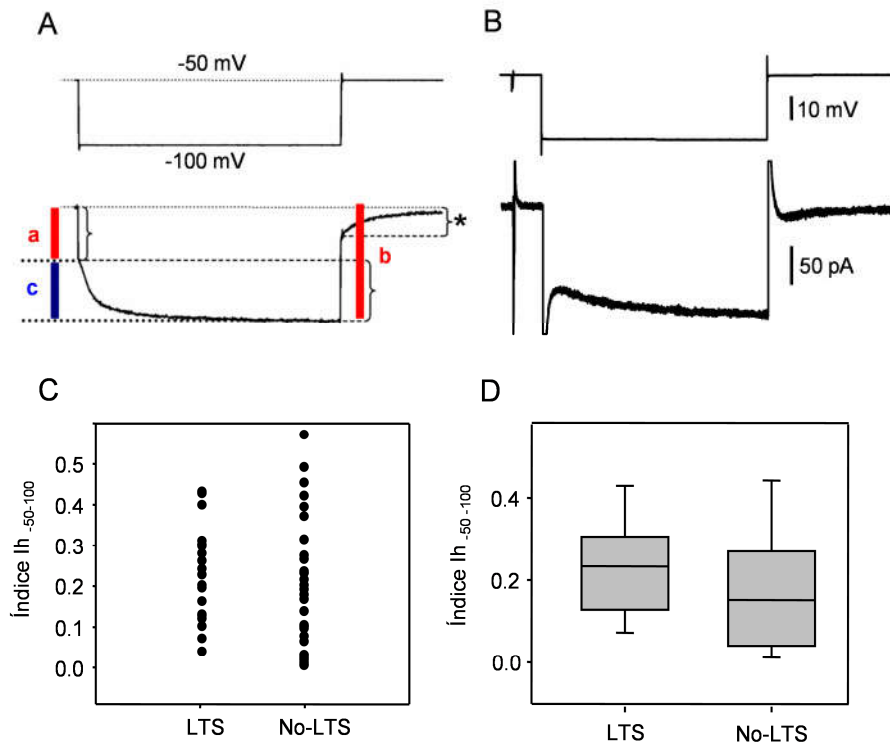


**Figura 6. Caracterización electrofisiológica de las neuronas tipo No-LTS.** **A.** Respuestas de una neurona de tipo No-LTS frente a una serie de estímulos hiperpolarizantes y despolarizantes de corriente (ver protocolo abajo). Las respuestas a pulsos hiperpolarizantes presentan "sag" sugiriendo la presencia de una corriente de tipo  $I_h$ . Note la ausencia de LTS a la salida de la hiperpolarización. **B.** Protocolos de pulsos de corriente específicamente diseñados para la generación de la LTS (abajo) no son capaces de generar este tipo de respuestas a la salida de la hiperpolarización (ver Fig. 5 para comparación). **C.** Respuestas compatibles con la presencia de corrientes de potasio de tipo  $I_A$  provocadas por la aplicación del protocolo de corrientes ilustrado abajo en el inserto. La latencia de la primera espiga generada por el postpulso despolarizante varía con el nivel de  $V_m$  alcanzado durante los pulsos hiperpolarizantes (valores de  $V_m$  indicados para cada espiga). **D.** Gráfico de la latencia a la primera espiga en función del  $V_m$  alcanzado hacia el final de los pulsos hiperpolarizantes obtenido para la misma neurona que en C.

despolarizados (ver Fig. 5A y 6A), y la existencia de rebote despolarizante post-hiperpolarización fácilmente distinguible de la LTS por tratarse de un cambio de  $V_m$

graduado con la magnitud de la hiperpolarización previa. En algunos experimentos se analizaron los efectos de la aplicación en el líquido de perfusión de CsCl (3-5 mM), bloqueante relativamente específico de las conductancias de tipo HCN de las que  $I_h$  es la representante más conspicua en el SNC (Zhou, et. al 2010; Orio et al. 2009). Un ejemplo de los resultados obtenidos en este tipo de experimentos de ilustra en la Fig. 5 E. La aplicación de CsCl provocó la desaparición de la rectificación de entrada acompañada de un incremento aparente de la resistencia de entrada. En condiciones de fijación de voltaje, se buscó cuantificar la expresión funcional de esta corriente a través del cálculo del índice  $I_{h_{50-100}}$ . El protocolo utilizado consistió en un escalón de voltaje de 800 ms de duración desde un potencial de mantenimiento ( $V_h$ ) de -50 mV hasta un potencial de -100 mV (Fig. 7A). Las respuestas registradas se promediaron y se midió la magnitud del salto instantáneo de corriente al inicio del escalón de voltaje (“a” en la Fig. 7A) y la magnitud de la corriente en el estado estacionario alcanzada durante el escalón (“b” en la Fig. 7A). El índice  $I_{h_{50-100}}$  se calculó como:  $(b-a)/a$ , cociente que permitió obtener la magnitud de la corriente provocada durante el escalón (con características cinéticas de  $I_h$ ) normalizada al valor de “a”, parámetro relacionado de manera directa con la conductancia de entrada y por tanto, con el tamaño de la neurona. Un ejemplo de los registros obtenidos con este tipo de protocolos se ilustra en la Fig. 7B. En términos generales, en las 20 neuronas LTS registradas, el índice  $I_{h_{50-100}}$  mostró una media de  $0.25 \pm 0.03$  (Fig. 7C y D). Por su parte las neuronas No-LTS (n=23) presentaron un índice de  $0.18 \pm 0.03$  (Fig. 7C y D). Si bien las neuronas de tipo LTS mostraron un índice ligeramente superior al de las neuronas No-LTS las diferencias entre ambos grupos no alcanzaron la significación estadística (K-S,  $p=0.13$ ).





**Figura 7. Cuantificación de  $I_h$ .** **A.** Esquema del procedimiento empleado para cuantificar la  $I_h$  (Índice  $I_h$   $_{-50-100}$ ) en condiciones de fijación de voltaje, modificado de Gerard et al., 2012. Arriba. Protocolo utilizado que consiste en un escalón de voltaje de 800 ms de duración que modifica el potencial de mantenimiento ( $V_h$ ) desde -50 mV hasta -100 mV. Abajo, esquema de la corriente transmembrana generada por el comando de voltaje (no se incluye la corriente capacitiva). Se indican los tres parámetros referidos en el texto para el cálculo del índice  $I_h$ . "a" indica el salto instantáneo de corriente, "b" la corriente en el estado estacionario alcanzada durante el escalón de voltaje y "c" corresponde al valor de la  $I_h$  (ver texto para más detalles). El "\*" indica la corriente de cola. **B.** Ejemplo de respuesta (trazado inferior), obtenida en una neurona No-LTS del PnO mediante un protocolo similar (ilustrado en el trazado superior). El comando de voltaje incluye un pulso breve de -10 mV (al inicio del barrido) utilizado rutinariamente para monitorizar la resistencia en serie. **C.** Grafico del Índice  $I_h$   $_{-50-100} = (b-a)/a$ , obtenido para las neuronas LTS y No-LTS. Cada punto representa una neurona. **D.** Diagrama de caja del Índice  $I_h$   $_{-50-100}$  calculado para ambas poblaciones de neuronas LTS y No-LTS. El límite inferior de la caja indica el percentil 25, por su parte el límite superior indica el percentil 75; la línea dentro de la caja indica la mediana. Las barras de error por encima y por debajo del cuadro indican los percentiles 90 y 10.

Las corrientes de potasio de tipo  $I_A$  son corrientes transitorias activadas por despolarización que presentan inactivación (Adams & Galvan, 1986). Reportes previos (ver p.ej.: Núñez et al., 1997) describen la presencia de este tipo de corrientes en neuronas de la FRP. En general las corrientes de tipo  $I_A$  se encuentran parcialmente inactivadas en el reposo y los protocolos utilizados para poner de manifiesto la participación de este tipo de corrientes en las respuestas neuronales consisten en pulsos de corriente hiperpolarizante de amplitud y duración adecuadas (típicamente -0.1 a -0.5 nA y 200 ms) que buscan su desinactivación seguido de un pulso despolarizante de amplitud levemente superior a la reobase (ver p.ej. Fig 3C). La

despolarización provoca uno o pocos potenciales de acción y la latencia de la primera espiga está determinada en parte por la activación de este tipo de corrientes. Un ejemplo de las respuestas neuronales a este tipo de protocolos se ilustra en la Fig. 6C. De manera característica, la presencia de corrientes de tipo  $I_A$  provoca que a la salida de un pulso hiperpolarizante la trayectoria del  $V_m$  hasta el nivel de disparo de la primera espiga sea relativamente lineal por efecto de la apertura de la corriente y su interacción con otras conductancias neuronales (ver p.ej. Fig. 5E, flecha) y la latencia a la primera espiga varía directamente con la magnitud de la hiperpolarización alcanzada durante el pulso precedente (Fig. 6C y D). Aún cuando no se llevó a cabo una cuantificación de las corrientes de tipo  $I_A$  en las neuronas registradas, respuestas neuronales compatibles con la presencia de este tipo de corrientes de potasio se consignaron en el 74.04 % de las neuronas ( $n=45$ ) independientemente de su naturaleza LTS o No-LTS.

Las neuronas registradas en el área de la FRP seleccionada para este estudio presentaron fenotipos electrofisiológicos similares a los descritos previamente en la rata para neuronas de la formación reticulada de aquellos sectores presumiblemente implicados en el control del S-REM (Greene et al., 1986; Gerber et al., 1989; Stevens et al., 1992; Núñez et al., 1997; Núñez et al., 1998; Núñez et al., 2002; Heister et al., 2009, Weng et al., 2014). Esto sugiere la adecuación de los criterios utilizados en esta tesis para la identificación del PnO como sector de la reticulada del tronco encefálico integrante del circuito mesopontino implicado en el control del S-REM. En lo que sigue, i.e.: la caracterización morfológica de estas neuronas, el análisis de la conectividad del LDT-PPT con el PnO y el estudio de entradas sinápticas a las neuronas del PnO y su modulación, se indagó acerca de eventuales características distintivas de ambos tipos neuronales, LTS y No-LTS, en relación a estos aspectos.

#### **4.1.2. Caracterización morfológica.**

La caracterización morfológica primaria de las neuronas registradas (tamaño y forma del soma neuronal), se realizó principalmente a través de la inspección de las imágenes obtenidas con la técnica de visualización (DIC-IR) y un objetivo de inmersión 40X. En algunos casos las neuronas registradas del PnO se marcaron con neurobiotina intracelular lo que permitió realizar una descripción algo más detallada de las características del soma neuronal y de las principales prolongaciones dendríticas. Las neuronas registradas en el PnO fueron observadas consignando la forma y dimensión aproximada del soma neuronal durante la etapa de selección de las

neuronas para realizar los registros electrofisiológicos. La posterior caracterización electrofisiológica buscó establecer una relación entre el fenotipo electrofisiológico y la morfología del soma de las dos categorías de neuronas: LTS y No-LTS.

Las neuronas que a posteriori fueron categorizadas electrofisiológicamente como LTS (n=21) presentaron predominantemente somas ovoides (Media: 15  $\mu\text{m}$  diám. menor y 25  $\mu\text{m}$  diám. mayor). El marcaje intracelular con neurobiotina permitió identificar el soma así como las principales prolongaciones de este tipo de neuronas. Un ejemplo representativo de las neuronas LTS se ilustra en la (Fig. 3B). En esta figura es posible observar la forma ovoide del soma neuronal, ligeramente ahusada, así como la disposición de sus dendritas. En las neuronas LTS las prolongaciones dendríticas tienden a originarse en polos opuestos del soma neuronal, extendiéndose en sentido medial o lateral.

Por su parte, la mayoría de las neuronas No-LTS (n=23) presentaron somas de aspecto redondo y ligeramente estrellado con dimensiones similares a las de las neuronas LTS (25  $\mu\text{m}$  diám.). Cabe consignar que, pese a numerosos intentos de ajuste del protocolo de inyección de neurobiotina y del procedimiento de revelado, en ningún caso fue posible obtener un marcaje intracelular completo de este tipo neuronal. En estos casos solo se pudo observar finas prolongaciones en el área de la neurona marcada sin poder detectar la presencia del soma neuronal.

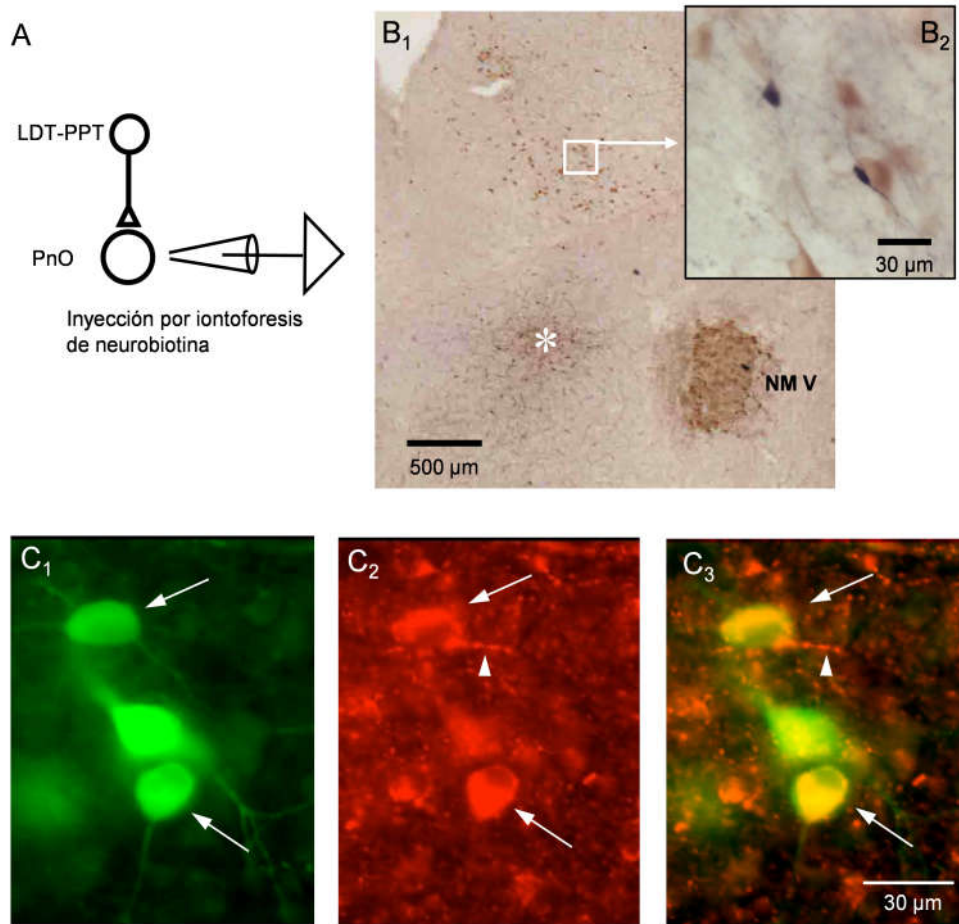
#### **4.2. Estudio de la conectividad entre el LDT-PPT y el PnO en la rodaja de la unión ponto-mesencefálica.**

Como se mencionara en la sección de Introducción, las aferencias a las neuronas del PnO procedentes del complejo LDT-PPT son elementos constitutivos esenciales de la red mesopontina implicada en el control del S-REM a nivel del tronco encefálico. Con el propósito de determinar si este componente de la red mesopontina está presente y es funcional en la rodaja de la unión ponto-mesencefálica; se desarrollaron dos series experimentales tendientes a obtener evidencias, morfológicas y funcionales, que apoyaran la indemnidad de esta conexión.

##### **4.2.1. Evidencias Morfológicas.**

En 6 rodajas se inyectó iontoforéticamente neurobiotina como marcador retrógrado (Lapper & Bolam, 1991) a nivel de la formación reticulada pontina precisamente en el área tomada como referencia en esta tesis y de la que proceden las neuronas cuyas características electrofisiológicas se incluyeron en la sección anterior. En algunos

casos, de forma complementaria, se aplicaron técnicas inmunohistoquímicas para identificación del neurotransmisor de las neuronas marcadas retrógradamente.



**Figura 8. Análisis de la conectividad entre neuronas del LDT-PPT y del PnO en la preparación.** Marcaje retrógrado e IHQ para ChAT. Neuronas colinérgicas y no colinérgicas del LDT-PPT proyectan al PnO en nuestra rodaja de trabajo. **A.** Esquema del diseño experimental empleado para el marcaje retrógrado de las neuronas que proyectan al PnO. **B1.** Fotografía panorámica de una sección representativa de la rodaja procesada para neurobiotina y ChAT sin contrainyección. El sitio de la aplicación iontoforética de neurobiotina se indica con el asterisco. Note la intensa expresión de ChAT a nivel del NM V. Algunas neuronas del complejo LDT-PPT se hacen evidentes con este nivel de magnificación y sus características se analizaron a mayor aumento. El área del complejo LDT-PPT comprendida en el recuadro blanco se ilustra en el inserto en **B2**. Las neuronas positivas para ChAT se presentaron con un citoplasma marrón en tanto que las neuronas marcadas retrógradamente exhibieron sus somas y prolongaciones de un color negro intenso. Esta técnica de procesamiento no permitió detectar ChAT en las neuronas marcadas retrógradamente. **C.** El procesamiento con anticuerpos conjugados con fluoróforos diferentes (emisión en verde para la neurobiotina y en rojo para la ChAT) permitió distinguir la naturaleza colinérgica de algunas de las neuronas marcadas retrógradamente. **C1.** Ejemplo representativo de neuronas del LDT-PPT que presentaron marcaje con neurobiotina luego de la inyección iontoforética del marcador en el PnO. Las neuronas indicadas con la flecha resultaron, asimismo, ChAT positivas (**C2**) como se observa más claramente en la superposición de imágenes en **C3**. En estos cortes fue posible observar finas prolongaciones ChAT positivas de aspecto arrosariado como la señalada con la punta de flecha en C2 y C3 en estrecha aposición a las neuronas marcadas.

En cada rodaja se realizó una única inyección mediante iontoforesis (Fig. 8A). Seleccionamos el área de inyección según los mismos criterios que los empleados para la búsqueda de las neuronas del PnO La inspección del área efectiva de

inyección en cada experimento reveló que en todos los casos la inyección del marcador quedó circunscripta al sector dorsal del polo rostral de la formación reticulada pontina (PnO, Fig. 8B<sub>1</sub>).

El revelado del marcador retrógrado permitió identificar algunos somas neuronales en el LDT-PPT ipsilateral (Fig. 8B<sub>2</sub>). La combinación del marcaje retrógrado con la detección inmunohistoquímica para la colina acetiltransferasa (ChAT), buscó identificar las neuronas colinérgicas dentro del grupo de neuronas del LDT-PPT marcadas retrógradamente. Como se mencionara en la sección de Introducción, la principal aferencia colinérgica al PnO se origina precisamente en el LDT-PPT. La utilización del procedimiento estándar para la inmunodetección para ChAT mostró marcaje evidente en las motoneuronas del MN V así como en neuronas del LDT-PPT que no mostraron marcaje retrógrado (Fig. 8 B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>). Desafortunadamente, este procedimiento no permitió distinguir la expresión de ChAT en las neuronas marcadas retrógradamente. Para ello, 3 rodajas fueron procesadas para la inmunodetección de neurobiotina y ChAT utilizando anticuerpos conjugados con fluoróforos diferentes. Un ejemplo de los resultados obtenidos con este abordaje se ilustra en las Fig. 8C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub>. Neuronas del LDT-PPT positivas para neurobiotina (Fig. 8C<sub>1</sub>) también mostraron positividad para ChAT (Fig. 8C<sub>2</sub>) como se observa en la superposición de imágenes en la Fig. 8C<sub>3</sub>. Se destaca que este abordaje también mostró neuronas positivas para neurobiotina pero negativas para ChAT sugiriendo que neuronas no colinérgicas, presumiblemente glutamatérgicas o GABAérgicas, inervan el PnO y están presentes en la rodaja de la unión ponto-mesencefálica. Evidencias en este sentido han sido aportadas por otros autores (Semba, 1993; Iwasaki et al., 1999; Boissard et al., 2002). Según estos reportes, y coincidiendo con nuestros hallazgos, el número de neuronas no colinérgicas del LDT-PPT que proyectan a la PnO es relativamente bajo en relación a la población de neuronas de este complejo.

#### **4.2.2. Evidencias funcionales.**

Con vistas a la obtención de evidencias adicionales a favor de la conexión entre neuronas del LDT-PPT y de la FRP en la rodaja de la unión ponto-mesencefálica, se procedió a 1.- la estimulación eléctrica del PnO y registro de neuronas del LDT-PPT con vistas a la activación de los axones de las neuronas del LDT-PPT que proyectan al PnO (activación antidrómica), 2.- estimulación farmacológica del LDT-PPT con agonistas glutamatérgicos y colinérgicos y registro de neuronas del PnO y 3.- estimulación eléctrica del LDT-PPT y registro de respuestas sinápticas en neuronas

del PnO, abordaje que se utilizó luego, de manera sistemática, para el estudio de las entradas sinápticas a las neuronas del PnO.

#### 4.2.2.1. Respuestas de neuronas del LDT-PPT a la estimulación eléctrica del PnO.

##### Activación antidrómica de neuronas del LDT-PPT.

Para este abordaje se registraron neuronas del LDT-PPT ( $n=33$ ) al tiempo que se estimuló eléctricamente el PnO con estímulos únicos o pareados con el propósito de estimular el axón de las neuronas del LDT-PPT que proyectan a este núcleo (Fig. 9 A). El fenotipo electrofisiológico de las neuronas registradas presentó características similares ( $I_h$ , presencia o ausencia de LTS entre otras) a las descritas por diversos grupos de investigación (Luebke et al., 1992; Luebke et al., 1993; Leonard & Llinás, 1994), quienes han caracterizado las propiedades electrofisiológicas de las neuronas del LDT-PPT en estudios *in vitro* similares.

A intensidades de estimulación (típicamente  $3 \mu\text{A}$ ,  $0.2 \text{ ms}$ ,  $0.3 \text{ Hz}$ ) inferiores a las requeridas para la activación ortodrómica de estas neuronas (algunas reciben proyección de neuronas del PnO; Cornwall, 1990), los estímulos provocaron potenciales de acción cuya morfología sugiere su naturaleza antidrómica (Fig. 9B y C). De las 33 neuronas registradas solo fue posible registrar esta actividad en solo 2 (6%) neuronas.

Modificando levemente la intensidad del estímulo aplicado se constató el comportamiento todo o nada de la espiga registrada. Asimismo, se constató la invariabilidad de la respuesta durante la aplicación de estímulos supramáximos



**Figura 9. Análisis de la conectividad entre neuronas del LDT-PPT y del PnO en la preparación. Activación antidrómica de neuronas del LDT-PPT. A.** Diseño experimental utilizado para el estudio de las respuestas de neuronas del LDT-PPT a la estimulación eléctrica del PnO. **B y C.** Registros en condiciones de fijación de corriente de la primera (B) y segunda (C) respuestas provocadas por un par de estímulos eléctricos del PnO (50 ms de intervalo). En los trazados inferiores de cada uno de ellos se ilustra la derivada primera del  $V_m$  en función del tiempo ( $dV_m/dt$ ). En el trazado  $dV_m/dt$  en C es posible distinguir más claramente la morfología característica de la espiga antidrómica con sus diferentes componentes, segmento inicial (SI) y somato-dendrítico (SD).

repetidos a frecuencias relativamente elevadas (50 Hz). Ambos resultados, sugieren el carácter antidrómico de la respuesta registrada. En este mismo sentido apunta la

peculiar morfología del potencial de acción registrado. En efecto, la espiga, que se origina abruptamente desde el  $V_m$  de reposo, mostró cambios abruptos de la trayectoria del  $V_m$  en la fase de ascenso y de repolarización que sugieren la presencia de varios componentes. Estos cambios se apreciaron más claramente en el trazado de  $dV_m/dt$  en función del tiempo como se ilustra en el trazado inferior de la figura 9 B y C. En este trazado es posible distinguir tres componentes que podrían representar la descarga de diferentes compartimientos neuronales (Coombs, et al. 1957). El primer componente podría corresponder a la espiga del segmento inicial del axón, el segundo -y de mayor amplitud- a la invasión del soma neuronal y el tercero podría resultar de la invasión tardía del árbol dendrítico. Estos componentes se aprecian mejor si se utilizan pares de estímulos a intervalos tales que los cambios de excitabilidad provocados por la respuesta al primer estímulo afecten la propagación de la respuesta al segundo i.e.: la reducción de la excitabilidad provocada por la respuesta al primer estímulo (período refractario) disfacilita la invasión antidrómica del soma y las dendritas de la respuesta al segundo estímulo. Un ejemplo representativo se ilustra en la Fig. 9C en el que el intervalo utilizado fue de 50 ms; nótese el retraso del segundo y tercer componentes de la respuesta al segundo estímulo. La latencia de la espiga antidrómica fue de  $7.87 \pm 0.29$  ms lo que arroja una velocidad de conducción estimada de 0.20 m/s. Esto sugiere, en línea con observaciones realizadas por otros autores en hipocampo (ver p.ej.: Andersen et al., 1978), que las neuronas del LDT-PPT que proyectan al PnO presentan axones amielínicos relativamente finos.

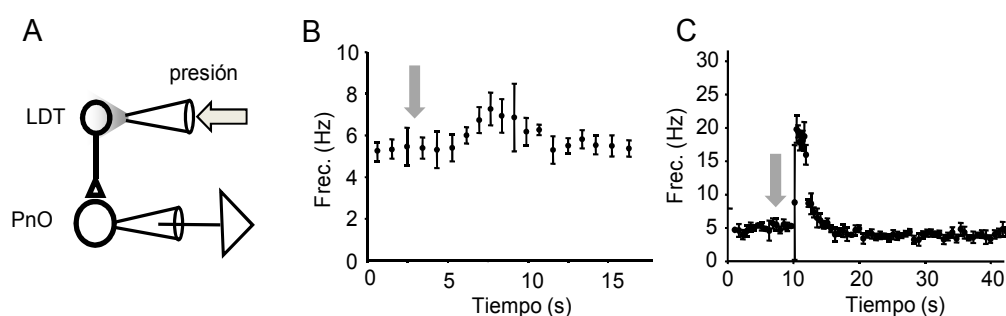
#### **4.2.2.2. Respuestas de las neuronas del PnO a la activación farmacológica de neuronas del LDT-PPT.**

Clásicamente, el estudio de la fisiología de la sinapsis en el SNC como el utilizado en esta tesis, incluye el análisis de las respuestas de las neuronas postsinápticas a la estimulación eléctrica de las estructuras presinápticas. La estimulación eléctrica aplicada en el tejido nervioso es capaz de activar tanto elementos neurales propios del área estimulada así como fibras de pasaje procedentes de otras estructuras. En consecuencia, a los efectos de obtener evidencias a favor del contacto sináptico entre dos agrupamientos neuronales (LDT-PPT y PnO) se procedió a la activación de las neuronas del LDT-PPT mediante la aplicación local de agonistas glutamatérgicos y colinérgicos y se analizaron las respuestas provocadas en neuronas del PnO. Aun cuando este método no permite el estudio sistemático de potenciales postsinápticos aislados en las neuronas del PnO como ocurre con la estimulación eléctrica, es posible

analizar las respuestas postinápticas globales provocadas presumiblemente por la activación de somas neuronales del LDT-PPT y no por fibras de pasaje en esa estructura.

La estimulación farmacológica (diseño experimental en Fig. 10A) se ensayó en 14 neuronas realizando microinyecciones por presión (20 ms, 20 psi) de soluciones de CCh 1 mM (n=5) o Glu. 10 mM (n=9) en el LDT-PPT CCh es capaz de hiperpolarizar algunas neuronas del LDT-PPT (Leonard & Llinás 1994). Otros reportes (ver p.ej. Sánchez & Leonard, 1996) muestran que el Glu. es capaz de activar todos los tipos neuronales del LDT-PPT.

Para estos experimentos las neuronas del PnO se registraron utilizando medio intracelular en base de Gluconato a los efectos de evaluar adecuadamente las respuestas sinápticas provocadas por la estimulación farmacológica del LDT-PPT. En algunos experimentos, a los efectos de facilitar la detección de los efectos sinápticos



**Figura 10. Análisis de la conectividad entre neuronas del LDT-PPT y del PnO en la preparación. Respuestas de neuronas del PnO a la estimulación farmacológica de neuronas del LDT-PPT. A.** Diseño experimental para el estudio de las respuestas de neuronas del PnO a la estimulación farmacológica de neuronas del LDT-PPT. Se indica el sitio de registro así como el método y sitio de inyección de agonistas glutamatérgicos y colinérgicos. **B.** Gráfico de frecuencia instantánea de la descarga de espigas en función del tiempo en una neurona del PnO. Se indica con una flecha el momento de la inyección de glutamato (10 mM) en el LDT-PPT, localizado a más de 1000  $\mu\text{m}$  de distancia en sentido dorsal. Cada punto representa la media ( $\pm$  SE.) de la frecuencia instantánea en un intervalo de un minuto. **C.** Similar a B pero se ilustran las repuestas de otra neurona del PnO a la aplicación de microvolúmenes de CCh (1 mM) en el instante indicado por la flecha. En este caso, cada punto representa la media ( $\pm$  SE.) de 5 eventos sucesivos.

globales provocados sobre las neuronas del PnO provocados por la activación – seguramente asincrónica- de un grupo de neuronas presinápticas del LDT-PPT, se modificó el potencial de equilibrio del ion  $\text{K}^+$ , aumentando la concentración extracelular en la solución de perfusión ( $[\text{K}^+]_e = 9 \text{ mM}$ ), de forma de provocar la despolarización de todas las neuronas de la preparación y asegurar la descarga de PAs de forma espontánea en las neuronas del PnO y evaluar sus eventuales modificaciones.

En la figura 10 se ilustran resultados representativos obtenidos por la aplicación de Glu. (Fig. 10B) y de CCh (Fig. 10C). Como se ilustra en la figura, ambos agonistas



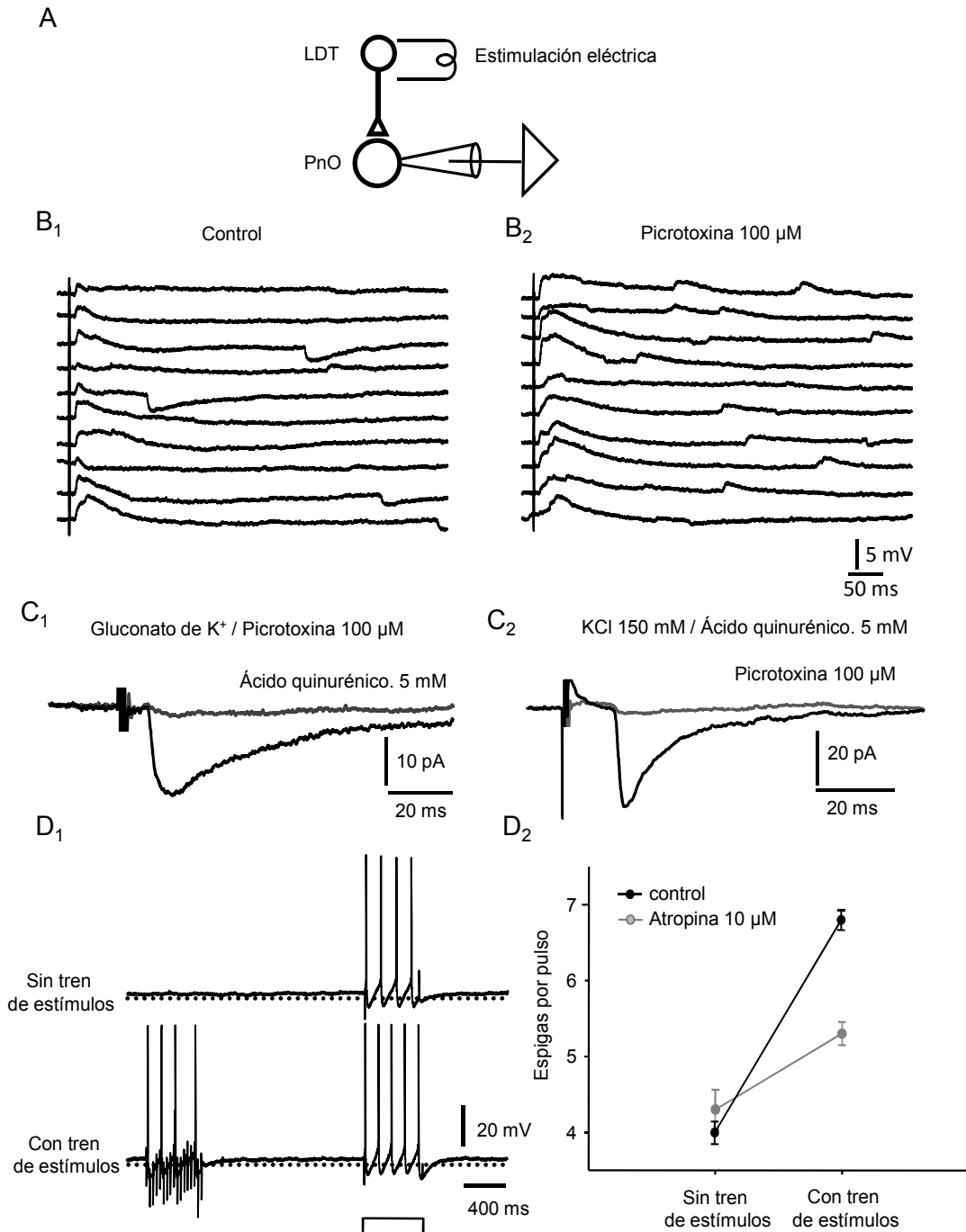
fueron capaces de provocar incrementos transitorios en la frecuencia de descarga de potenciales de acción en las neuronas del PnO. La respuesta a Glu. presentó una latencia en el rango de 3-5 s en tanto que la respuesta a CCh presentó una latencia levemente mayor (6 y 8 s). El incremento en la frecuencia de descarga de las neuronas del PnO ante la aplicación de Glu. fue de 2-3 Hz. Por su parte el CCh generó una modificación de hasta 15 Hz en la descarga de las neuronas del PnO. En estos casos la hiperpolarización de las neuronas registradas por inyección de corriente hiperpolarizante (típicamente 0.01 a 0.05 nA) capaz de detener la descarga espontánea de potenciales de acción de las neuronas registradas, no permitió detectar claramente la existencia de un bombardeo sináptico como posible causa del incremento de la frecuencia de descarga observada en la situación control. Resultados similares pudieron ser detectados solamente en el 19% de las inyecciones. En las restantes inyecciones no fue posible obtener respuestas claras ni en el Vm ni en la frecuencia de descarga de potenciales de acción en las neuronas del PnO.

En algunos experimentos se ensayó el registro de neuronas del LDT-PPT a los efectos de confirmar su activación por los agonistas inyectados; para el caso del Glu., la aplicación yuxtacelular de microvolúmenes de solución (10 ms, 20 psi) provocó despolarizaciones transitorias (típicamente 1 a 1.7 s) supraumbrales capaces de inducir la descarga en ráfaga de potenciales de acción (datos no mostrados).

#### **4.2.2.3. Respuestas de las neuronas del PnO a la estimulación eléctrica de LDT-PPT.**

Para esta serie experimental, en primera instancia, las neuronas del PnO se registraron en condiciones de fijación de corriente (Vm  $-57.30 \pm 1.70$  mV) con electrodos de patch con medio intracelular basado en gluconato de potasio (ver Metodología). De manera característica, e independientemente del fenotipo electrofisiológico de la neurona registrada, estímulos eléctricos únicos del LDT-PPT (0.3-3.0  $\mu$ A, 0.2 a 0.6 ms, 0.16 Hz) provocaron potenciales postsinápticos despolarizantes de corta latencia ( $9.74 \pm 0.45$  ms, n=45) de amplitud variable ( $3.35 \pm 0.59$  mV). Un ejemplo representativo se ilustra en la Fig. 11B<sub>1</sub>. En estas condiciones fue posible observar además actividad hiperpolarizante espontánea. En presencia de picrotoxina (100  $\mu$ M, Fig. 11B<sub>2</sub>), bloqueante de los receptores GABAérgicos de tipo A, esta actividad espontánea fue suprimida y sustituida por un bombardeo sináptico despolarizante -probablemente debido a un incremento general de la excitabilidad del preparado provocado por el bloqueo de la transmisión GABAérgica-, al tiempo que la amplitud de la respuesta sináptica provocada aumentó ligeramente ( $4.17 \pm 0.77$  mV).

Estos resultados sugieren que: i) la estimulación eléctrica del LDT es capaz de provocar respuestas postsinápticas mixtas excitadora (presumiblemente glutamatérgica) e inhibitora (GABAérgica) en las neuronas del PnO y que ii) las neuronas del PnO reciben otros contactos sinápticos GABAérgicos además de los activados por el estímulo en el LDT-PPT.



**Figura 11. Análisis de la conectividad entre neuronas del LDT-PPT y del PnO en la preparación. Respuestas de neuronas del PnO a la estimulación eléctrica del LDT-PPT.** **A.** Diseño experimental empleado para la caracterización de las entradas sinápticas al PnO (registro) originadas en el LDT-PPT (estímulo). **B.** Respuestas sinápticas a estímulos eléctricos del LDT-PPT (0.3 Hz) obtenidas en la modalidad fijación de corriente (medio intracelular basado en Gluconato de K<sup>+</sup>, V<sub>m</sub> aprox. -70 mV) en situación control (**B<sub>1</sub>**) y en presencia de PTX (100  $\mu$ M) (**B<sub>2</sub>**) en la misma neurona. Se ilustran en ambos casos 10 barridos individuales consecutivos. En **B<sub>1</sub>**, note la variabilidad de la respuesta sináptica provocada, tanto en amplitud como en el curso temporal, y la presencia de potenciales postsinápticos espontáneos siendo los hiperpolarizantes (IPSPs) los más frecuentes y de mayor amplitud. **B<sub>2</sub>** En presencia de PTX (100  $\mu$ M) las respuestas sinápticas provocadas aumentaron globalmente de amplitud y la actividad sináptica espontánea dominante es ahora despolarizante (EPSPs), posiblemente debido a un incremento de la excitabilidad global de la rodaja por efecto del bloqueante GABA-A. Continúa.

**Figura 11 Continuación. C.-** Respuestas sinápticas aisladas farmacológicamente obtenidas en condiciones de fijación de voltaje. **C<sub>1</sub>.** En presencia de PTX 100  $\mu$ M, EPSC representativo (promedio de 20 barridos sucesivos,  $V_h = -60$  mV, medio intracelular basado en gluconato de potasio) obtenido antes (negro) y durante (gris) la perfusión de ácido quinurénico (5 mM) bloqueante inespecífico de los receptores ionotrópicos para Glutamato. **C<sub>2</sub>.** En otra neurona, en presencia de ácido quinurénico (5 mM), IPSC representativo (promedio de 20 barridos sucesivos,  $V_h = -70$  mV, medio intracelular basado en KCl) obtenido antes (negro) y durante (gris) la perfusión de PTX (100  $\mu$ M). **D.** La estimulación del LDT-PPT con trenes de estímulos de alta frecuencia (50 Hz, 500 ms) provoca cambios de la excitabilidad de la neurona del PnO compatibles con un efecto colinérgico muscarínico. **D<sub>1</sub>.** Arriba, respuesta de la neurona a la aplicación de un pulso de corriente despolarizante (protocolo esquematizado a abajo) no precedido del tren de estimulación (sin tren de estímulos). Abajo, la aplicación del tren de estímulos en el LDT-PPT provoca la descarga de algunos potenciales de acción y promueve un incremento de la excitabilidad neuronal que persiste casi 2 segundos después del estímulo sináptico. **D<sub>2</sub>.** Gráfico del número de espigas provocadas por el pulso de corriente despolarizante en ausencia (sin tren de estímulos) o en presencia del estímulo sináptico condicionante (con tren de estímulos) El incremento de la excitabilidad neuronal provocado por el estímulo sináptico de alta frecuencia se bloquea parcialmente en presencia de atropina (10  $\mu$ M), cada punto corresponde a la media de 20 barridos sucesivos ( $\pm$  d.e.).

A los efectos de poder estudiar en las neuronas del PnO aisladamente la actividad sináptica glutamatérgica o GABAérgica provocada por estimulación eléctrica del LDT-PPT, estas respuestas se obtuvieron en presencia de picrotoxina (100  $\mu$ M) (Fig. 11 C<sub>1</sub>), para el estudio de la sinapsis glutamatérgica o en presencia de ácido quinurénico (5mM) (Fig. 11 C<sub>2</sub>) – bloqueante de receptores ionotrópicos para Glu.- para el análisis de la sinapsis GABAérgicas. Las respuestas se registraron en condiciones de fijación de voltaje (corrientes sinápticas) optimizando en cada caso las condiciones de registro (potencial de mantenimiento y medio intracelular) para el estudio de uno u otro tipo de acción sináptica.

Las corrientes sinápticas excitadoras (EPSCs) aisladas farmacológicamente se registraron utilizando un potencial de mantenimiento ( $V_h$ ) de -60 o -70 mV y medio intracelular basado en Gluconato de potasio. La estimulación del LDT-PPT provocó corrientes sinápticas de entrada de una amplitud media ( $\pm$  SE.) de  $26.38 \pm 2.39$  pA ( $n=11$ ). Dicha respuesta fue bloqueada por la perfusión de ácido quinurénico (5 mM) (Fig. 11 C<sub>1</sub>). Por su parte, las corrientes sinápticas inhibitoras (IPSCs) provocadas por la estimulación del LDT-PPT se obtuvieron utilizando un  $V_h$  de -70 mV y medio intracelular basado en KCl (150 mM,  $V_{eq. Cl^-} \approx -3$  mV). En estas condiciones los IPSCs se registran como corrientes sinápticas de entrada que alcanzaron una amplitud media ( $\pm$  SE.) de  $95.91 \pm 21.56$  pA ( $n=54$ ); un ejemplo se ilustra en la Figura 11 C<sub>2</sub>. Estos IPSCs se bloquearon completamente por la perfusión de picrotoxina 50-100  $\mu$ M indicando su naturaleza GABAérgica y la participación de receptores de tipo GABA-A. La latencia de los EPSCs ( $10.09 \pm 2.77$  ms) fue similar a la de los IPSCs ( $9.53 \pm 2.76$  ms) no existiendo entre ellos diferencias estadísticamente significativas (Test de t  $p=0.51$ ). En ningún caso, las respuestas postsinápticas a estímulos únicos del LDT-

PPT se modificaron por la perfusión de atropina (10  $\mu$ M) sugiriendo la ausencia de un componente postsináptico dependiente de la activación de aferentes colinérgicas. La activación de este tipo de aferentes sólo se logró mediante trenes de estímulos similares a los utilizados en el hipocampo de la rata *in vitro* (Madison et al., 1987). En efecto, como se muestra en el ejemplo de la Fig. 11D<sub>1</sub>, la aplicación de trenes breves de estímulos a alta frecuencia (50 Hz, 500 ms) a nivel del LDT-PPT, provocó un incremento de la excitabilidad neuronal compatible con un efecto muscarínico a nivel postsináptico que se bloqueó parcialmente con la perfusión de atropina 10  $\mu$ M (Fig. 11D<sub>2</sub>).

En algunos experimentos, se buscó obtener evidencias tendientes a establecer el carácter monosináptico de las respuestas sinápticas en estudio. Para ello nos basamos en los criterios utilizados por Rose & Metherate (2005), i.e.: 1) desvío estándar de la latencia de la respuesta postsináptica menor a 1 ms con intensidades de estimulación submáximas y 2) estabilidad de la latencia al pie para frecuencias de estimulación en el orden de 50 estímulos/s. La mayoría (57 %) de las respuestas estudiadas (EPSCs e IPSCs) se ajustaron a estos criterios indicando su carácter monosináptico. De forma complementaria, la posibilidad de aislar farmacológicamente los IPSCs por bloqueo de la transmisión glutamatérgica, apunta en este mismo sentido. En las restantes, la variabilidad de la latencia apenas excedió el milisegundo pero mostró relativa estabilidad frente a estímulos de alta frecuencia.

El análisis de la conectividad entre las neuronas del LDT-PPT y las neuronas del PnO en la rodaja de la unión ponto-mesencefálica incluyó la estimación de la velocidad de conducción de las fibras aferentes (supuestos axones de las neuronas glutamatérgicas o GABAérgicas) implicadas en la generación de las respuestas sinápticas en las neuronas del PnO. Tomando en cuenta la latencia y las distancias (lineales) medidas desde el sitio de estímulo en el LDT-PPT hasta la zona de registro en el PnO se estimó una velocidad de conducción de 0.17 m/s. Este valor es similar al estimado para los axones de las neuronas del LDT-PPT que proyectan al PnO (~0.20 m/s) de acuerdo a los resultados de los experimentos de activación antidrómica. Esto sugiere que las respuestas postsinápticas provocadas por el estímulo en el LDT-PPT resultan de la activación de neuronas o axones de neuronas pertenecientes a este complejo.

#### **4.2.3. Características identitarias del IPSC provocado por la estimulación eléctrica del LDT-PPT.**

#### **4.2.3.1. Características electrofisiológicas.**

Como se mencionara en la sección de Introducción, en esta tesis el análisis de las entradas sinápticas a las neuronas del PnO procedentes del LDT-PPT y su eventual modulación por ACh o agentes colinomiméticos se centró en el estudio de las entradas GABAérgicas. Aún cuando es objetivo central de esta tesis indagar acerca de la modulación de las entradas sinápticas a las neuronas de la FRP como indicativo de la existencia de procesos de reconfiguración circuital a nivel mesopontino en la generación de diversos estados comportamentales, el énfasis se colocó sobre las entradas GABAérgicas debido a la jerarquía que ha adquirido en los últimos años la innervación GABAérgica de la FRP en el control del S-REM y de la vigilia (ver para revisión Luppi et al., 2013).

La caracterización de la entrada sináptica GABAérgica que reciben las neuronas del PnO procedentes del LDT-PPT tuvo como fin determinar características particulares, identitarias, que permitieran su identificación dentro de la población de entradas que recibe la neurona. Esto permitió desarrollar el análisis de la modulación de las entradas sinápticas GABAérgicas por colinomiméticos en una población relativamente homogénea e identificable de entradas sinápticas en cuanto a:

- su probable origen (LDT-PPT) por la localización del electrodo de estimulación y
- las propiedades funcionales del contacto sináptico.

Vista la variedad de efectos de los colinomiméticos en las sinapsis GABAérgicas en el SNC en general (Picciotto et al., 2012) y en el PnO en particular (Heister et al., 2009; Weng et al., 2014) acotar el estudio de esta modulación a un grupo funcional y anatómicamente homogéneo, constituyó un punto estratégico de esta tesis.

La caracterización se realizó a partir del análisis de los IPSCs aislados farmacológicamente, registrados en 44 neuronas del PnO (21 LTS y 23 No-LTS). Como se detallara en la sección de Introducción el curso temporal de la corriente sináptica y la plasticidad de corto plazo dependiente de la actividad (plasticidad por estímulos pareados) constituyen propiedades características de un contacto sináptico dado; la primera dependiente fundamentalmente de la postsinapsis y la segunda de la fisiología del terminal presináptico. Algunos de los parámetros seleccionados para la caracterización se indican en el esquema de la Fig. 12. Como criterio adicional en favor de lograr una razonable homogeneidad en las entradas GABAérgicas para el estudio, las corrientes seleccionadas mostraron amplitudes de pico cercanas a los 70-90pA para lo cual la intensidad estimulación se ajustó en cada caso. Asimismo solo se consideraron los IPSCs de cuya latencia al pie se encontrara en el entorno de los 9-10ms de acuerdo a las estimaciones de velocidad de conducción de la proyección LDT-PPT al PnO realizada en la sección anterior. Los resultados obtenidos en esta caracterización de los IPSCs se incluyen en la Tabla 1.

**Tabla 1. Principales características de los contactos sinápticos GABAérgicos activados por estimulación del LDT-PPT según el fenotipo electrofisiológico (LTS y No-LTS) de las neuronas del PnO registradas.**

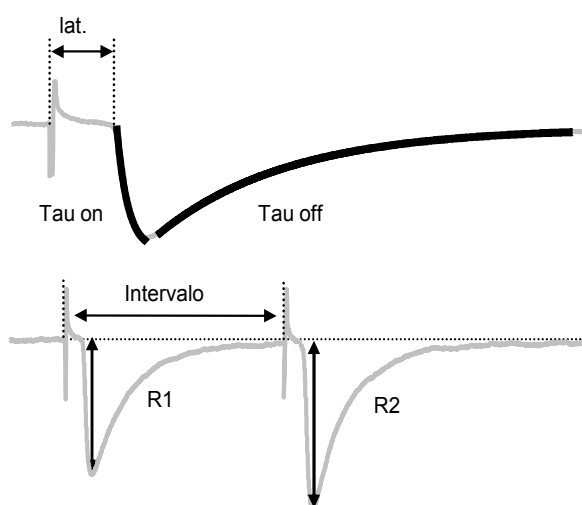
	LTS (n=21)	No-LTS (n=23)
Amplitud de pico (pA)	72.8 ± 10.9	73.8 ± 20.9
Latencia al pie (ms)	8.9 ± 0.4	10.6 ± 0.7
Tau on (ms)	2.1 ± 0.2	1.8 ± 0.2
Tau off (ms)	24.4 ± 1.9	24.2 ± 2.5

Tau on y Tau off constantes de tiempo de ascenso y de relajación de los IPSCs respectivamente. PPR (de Paired Pulse Ratio) es el cociente de R2/R1: razón de las amplitudes medias del segundo IPSC (R2) y del primer IPSC (R1) de un par de estímulos aplicados al LDT-PPT separados por un intervalo de 150 ms

Los IPSCs registrados en las neuronas LTS (n=21) mostraron una amplitud media de 72.8 ± 10.9 pA y una latencia al pie de 8.9 ± 0.4 ms. La constante de tiempo de la fase de ascenso (tau on) de las corrientes sinápticas en este tipo celular fue de 2.1 ± 0.2 ms, en tanto que la de la fase de recuperación de la corriente de mantenimiento (tau off) fue de 24.4 ± 1.9 ms. De manera característica, el PPR de los IPSCs fue de 1.36 ± 0.1, indicando la presencia de facilitación por estímulos pareados. Por su parte, los IPSCs analizados en las neuronas No-LTS (n=23) presentaron una amplitud similar

( $73.8 \pm 20.9$  pA) y una latencia al pie de  $10.6 \pm 0.7$  ms. La tau on de la respuesta sináptica fue de  $1.8 \pm 0.2$  ms en tanto que la tau off alcanzó los  $24.2 \pm 2.5$  ms. Al igual que los IPSCs registrados en las neuronas LTS, en estas neuronas mostraron facilitación por estímulos pareados (PPR =  $1.22 \pm 0.08$ ).

Aunque en la Tabla 1 los parámetros utilizados para caracterizar los contactos GABAérgicos procedentes del LDT-PPT se muestran desglosados según el fenotipo electrofisiológico de las neuronas postsinápticas, los valores de estos parámetros fueron similares para ambos tipos de neuronas y no mostraron diferencias estadísticamente significativas. En todos los casos la comparación estadística (test de



**Figura 12. Parámetros empleados para la caracterización de los IPSCs provocados por la estimulación del LDT-PPT. Arriba.** Esquema del IPSC característico, aislado farmacológicamente, provocado por la estimulación del LDT-PPT (estímulo único) en el que se señalan la latencia, tiempo comprendido entre el artefacto del estímulo y el pie de la corriente postsináptica, además se superponen los ajustes realizados (una única exponencial) a la fase de ascenso y a la fase de relajación y se determinan las respectivas constantes de tiempo Tau on y Tau off. **Abajo.** Esquema de los IPSCs provocados por el protocolo de estímulos pareados utilizado para determinar el PPR. El intervalo utilizado rutinariamente fue de 150 ms. El PPR se calcula como  $R2/R1$ , cociente de las amplitudes de pico del segundo IPSC (R2) sobre la del primer IPSC (R1).

T y K-S para dos muestras) de cada uno de los parámetros para neuronas LTS vs No-LTS arrojó un  $p > 0.05$ .

El hecho de que los IPSCs en ambos tipos celulares mostraran facilitación por estímulos pareados (PPR) sugiere que las aferentes GABAérgicas a las neuronas del PnO procedentes del LDT-PPT presentan una baja probabilidad de liberación de neurotransmisor (Dobrunz & Stevens, 1997). En este mismo sentido apunta la observación de que la amplitud de pico de las corrientes sinápticas provocadas por estímulos únicos del LDT-PPT mostró una notable variabilidad. Por ejemplo, el Coeficiente de Variación (CV) de la amplitud de pico (d.s./media) de los IPSCs fue de



0.48 ± 0.22 (rango 0.16 a 1.12; n = 56). Para cada experimento, el CV se analizó en series de 20 estímulos (a 0.3 Hz). Coherentemente con ello, de manera característica, los fallos de respuesta en algunos de los estímulos fueron relativamente frecuentes, en algunos casos llegando hasta el 20%. En conjunto estos datos sugieren que, en nuestras condiciones experimentales, las respuestas sinápticas provocadas por el estímulo del LDT-PPT resultan del reclutamiento de un bajo número de aferentes caracterizadas por una baja probabilidad de liberación de neurotransmisor.

**4.2.3.2.** La entrada GABAérgica no involucra receptores GABAB y carece de “Depolarization-Induced Suppression of Inhibition” (DSI).

La caracterización de las aferentes GABAérgicas en estudio incluyó además la búsqueda de evidencias que sugirieran la presencia de receptores presinápticos bien caracterizados en terminales GABAérgicas en otros sistemas y que pudieran conferirle mecanismos adicionales de modulación de la eficacia sináptica.

En primera instancia se analizó la presencia de receptores GABA-B. Estos receptores, localizados tanto a nivel pre como postsináptico, pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (ver Ulrich & Bettler, 2007 para revisión). A nivel presináptico, la activación de los receptores GABA-B promueve la supresión de la liberación de neurotransmisor, principalmente a través de la inhibición de los canales de Ca<sup>2+</sup>presinápticos. Por su parte el efecto postsináptico se asocia al incremento de la permeabilidad al potasio a través de la activación de canales de tipo Kir-3, mediada directamente por la proteína G activada; esto provoca un potencial postsináptico inhibitorio lento y duradero de corta latencia.

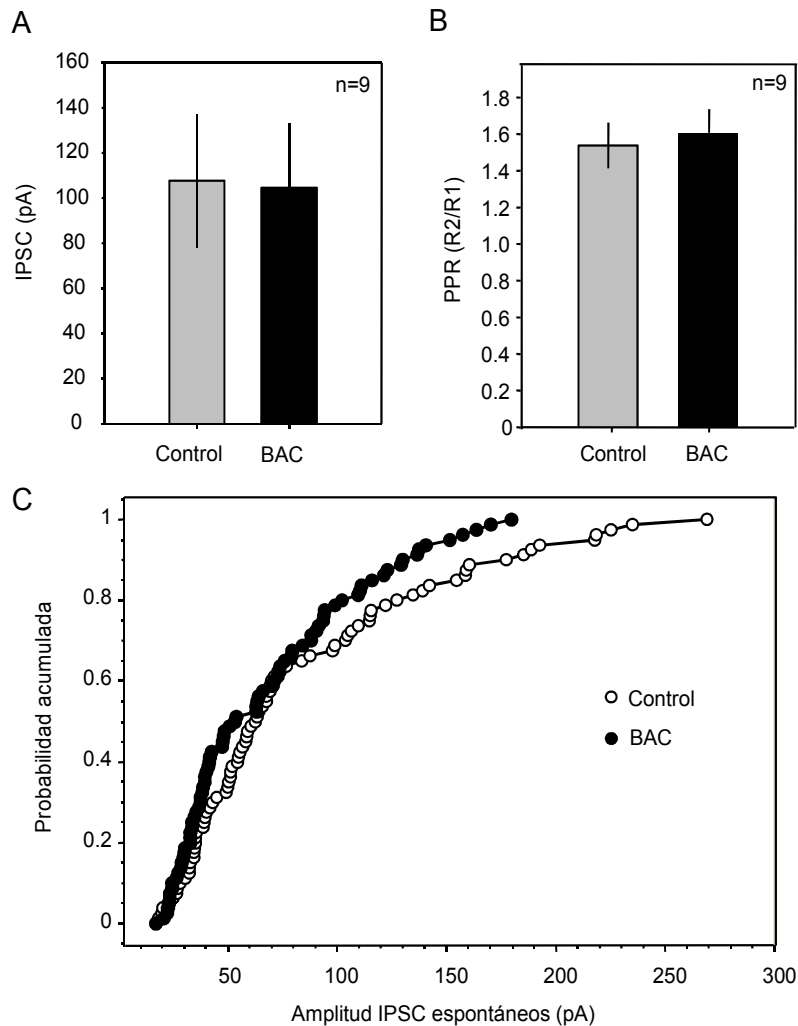
Recientemente, evidencias obtenidas en ratas (Gottesmann, 2002; Datta, 2007) sugieren la participación de receptores GABA-B en la regulación de la vigilia y el S-REM a través de sus efectos a varios niveles del SNC implicados en la regulación y ejecución de estos estados comportamentales, lo cual nos motivó a indagar acerca de su presencia a nivel presináptico en la sinapsis GABAérgica en estudio. La presencia de este tipo de receptores ofrece un mecanismo adicional de regulación de las propiedades funcionales de estas terminales sinápticas.

En esta serie experimental (n=9) se analizó el efecto de Baclofen (100-500 μM, aplicación yuxtacelular) agonista para receptores GABA-B sobre los IPSCs provocados por estimulación del LDT-PPT y sobre el PPR a los efectos de poner de manifiesto el eventual efecto presináptico de Baclofen.

En nuestra preparación Baclofen no modificó ni la amplitud de los IPSC ni tampoco el PPR (Fig. 13). En efecto, la amplitud media ( $\pm$  SE.) del IPSC antes y durante el efecto de Baclofen fue de  $107.7 \pm 29.40$  pA y  $104.6 \pm 28.40$  pA, respectivamente (test de t pareado,  $p=0.89$ ). Por su parte, el PPR no mostró modificaciones,  $1.54 \pm 0.12$  versus  $1.61 \pm 0.13$ , antes y luego de la inyección de Baclofen respectivamente (test de t pareado  $p=0.56$ ) (Fig. 13B).

Complementariamente se ensayó ( $n=3$ ) un antagonista selectivo para receptores GABA-B (CGP52432  $19 \mu\text{M}$ , dato no mostrado). La perfusión del antagonista no generó cambios significativos en la amplitud de la respuesta sináptica ( $137.50 \pm 81.75$  pA y  $113.21 \pm 69.01$  pA, antes durante la perfusión respectivamente, test de t pareado  $p=0.25$ ). De forma similar el PPR no mostró modificaciones ( $1.29 \pm 0.15$  vs  $1.37 \pm 0.39$ , test de t pareado  $p=0.61$ ).

Estos resultados indican la ausencia de receptores GABA-B en las terminales GABAérgicas en estudio. Sin perjuicio de ello, el análisis primario de los efectos de Baclofen sobre los IPSCs espontáneos (analizados en 2 casos) sugiere que las neuronas del PnO reciben otras aferencias GABAérgicas de origen no identificado que expresan receptores GABA-B (Fig. 13C). La aplicación yuxtacelular de Baclofen resulta ineficaz de modificar la eficacia del contacto GABAérgico en estudio; sin embargo provocó la reducción de la probabilidad de ocurrencia de los IPSCs espontáneos cuya amplitud fuera  $> 180$  pA. Esta modificación en el perfil de amplitud determino un corrimiento de la curva hacia la izquierda en la Fig. 13C. Este efecto es compatible con una reducción de la probabilidad de liberación de neurotransmisor mediada por la activación de receptores GABA-B en algunas de las terminales GABAérgicas (Heifets & Castillo, 2009; Diana & Marty 2003; 2004). Las modificaciones provocadas por Baclofen en la población de IPSCs espontáneos, aunque ostensibles en la inspección de las curvas no alcanzó significación estadística (K-S para dos muestras,  $p=0.65$ ). En ambos casos, el efecto de Baclofen yuxtacelular sobre los IPSCs espontáneos no se observó en presencia de CGP 52432 ( $19 \mu\text{M}$ ) (no mostrado).



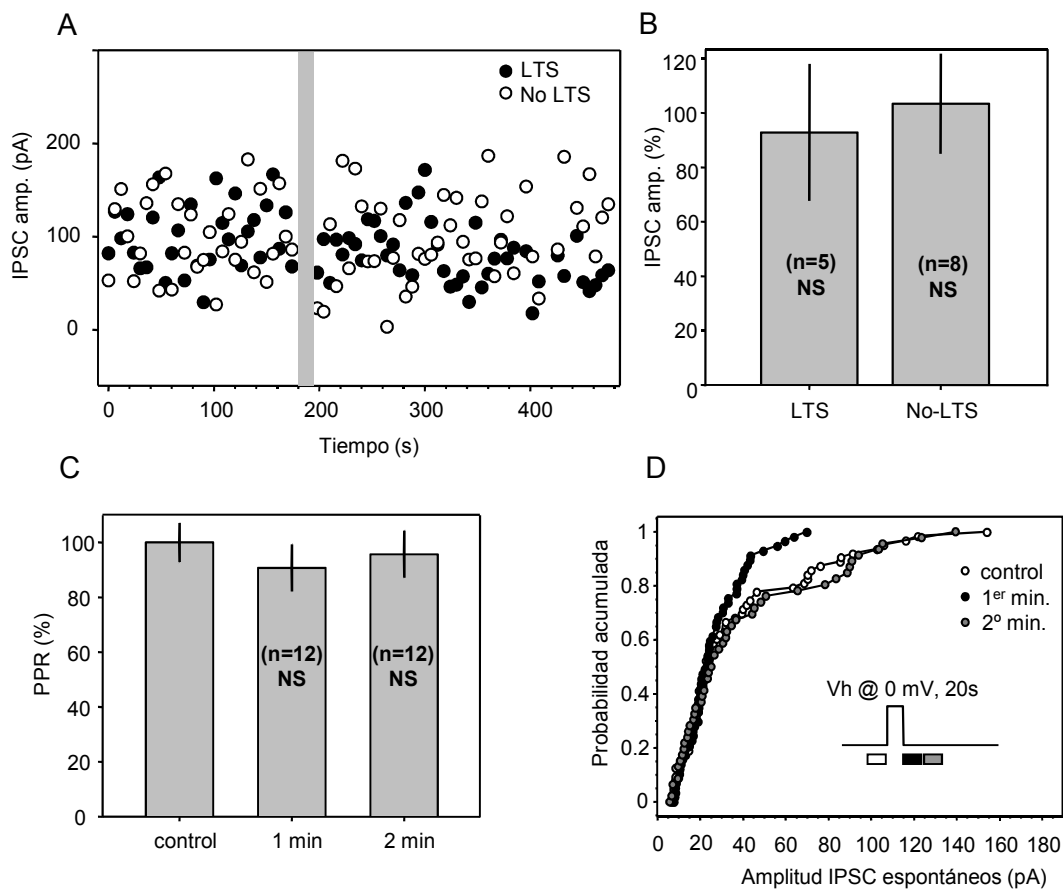
**Figura 13. Caracterización funcional de las terminales GABAérgicas en estudio, Ausencia de receptores presinápticos GABA<sub>B</sub>.** **A.** Amplitud media ( $\pm$  SE.) del IPSC antes, y durante la aplicación yuxtacelular del agonista para receptores GABA-B, Baclofen (BAC, 500  $\mu$ M). **B.** En el mismo grupo de neuronas se determinó la media del PPR ( $\pm$  SE.) antes y durante la inyección yuxtacelular de microvolúmenes de Baclofen. **C.** Gráfico de la probabilidad acumulada en función de la amplitud de los IPSC espontáneos aislados farmacológicamente, obtenido en una neurona representativa. Se representan los resultados obtenidos antes (control  $\circ$ ) y durante la aplicación de Baclofen (BAC,  $\bullet$ ). Note la desaparición de los IPSCs espontáneos de mayor amplitud (>160 pA) por efecto de Baclofen, indicando la participación de receptores GABA-B en el control de otras terminales GABAérgicas que contactan a las neuronas del PnO.

Cabe consignar que en ningún caso, la aplicación local de Baclofen o la perfusión de CGP52432 modificó significativamente la corriente de mantenimiento de la célula postsináptica lo cual sugiere la ausencia de receptores de tipo GABA-B en las neuronas del PnO. Este aspecto no se indagó específicamente en nuestro trabajo y en consecuencia no se profundizó en el análisis de esta observación.

La supresión de la inhibición inducida por despolarización (DSI del inglés “Depolarization-Induced Suppression of Inhibition”) es una forma de plasticidad sináptica de corta duración (Diana & Marty, 2003; 2004) mediada por receptores CB1

para endocannabinoides localizados en la terminal presináptica. Originalmente reportada en las sinapsis GABAérgicas de las células de Purkinje del cerebelo y en las células piramidales CA1 del hipocampo. La DSI es desencadenada por la despolarización postsináptica, la cual induce una inhibición transitoria de la frecuencia de los IPSC espontáneos que puede alcanzar valores cercanos al 90% en preparaciones *in vitro* como hipocampo y cerebelo (Diana & Marty, 2004). La DSI es totalmente reversible en un lapso de segundos, llegando a alcanzar en algunos casos hasta 30 segundos. Los endocannabinoides sintetizados y liberados por la neurona postsináptica en respuesta a los incrementos en la concentración intracelular de calcio, y actúan sobre receptores CB1 localizados en la terminal presináptica.

Los receptores CB1, receptores metabotrópicos asociados a proteínas G ( $G_{i/o}$ ), en general utilizan la vía del AMPc como mecanismo de señalización intracelular. Se ha propuesto que la activación de estos receptores provoca inhibición presináptica a través de la inhibición de canales de calcio presinápticos y/o la activación de ciertos canales potasio (Kano et al., 2009).



**Figura 14. Caracterización funcional de las terminales GABAérgicas en estudio, Ausencia de DSI.** **A.** Gráfico de la amplitud de pico de los IPSCs provocados por estimulación del LDT-PPT en función del tiempo. Se representan los resultados obtenidos en dos neuronas una LTS (●) y otra No-LTS (○). La barra vertical indica la aplicación de un protocolo clásico para DSI (Depolarization-induced Suppression of Inhibition, Supresión de la inhibición provocada por la despolarización postsináptica). El protocolo consistió en la despolarización a  $V_h = 0$  mV Edurante 20s (ver texto). **B.** Amplitud media de los IPSC provocados por estimulación del LDT-PPT (normalizados a la amplitud control, %,  $\pm$  SE.) para neuronas LTS y No-LTS tomados en los primeros 30 segundos luego de la finalización del protocolo de DSI. En sistemas susceptibles (terminales GABAérgicas con receptores para endocannabinoides CB1), la supresión de la inhibición provocada por la despolarización postsináptica alcanza su máximo en este intervalo. **C.** Gráfico de barras que representa el PPR normalizado al control (%) y luego de la aplicación del protocolo para DSI. **D.** Gráfico de la probabilidad acumulada en función de la amplitud de los IPSC espontáneos aislados farmacológicamente registrados antes (Control, ○), durante el primer minuto (1<sup>er</sup> min. ●) y durante el segundo minuto (2<sup>o</sup> min. ●) luego de la finalización del protocolo para DSI (ver esquema del protocolo y de la distribución de los intervalos para la obtención de las muestras en el inserto). Note la desaparición transitoria de los IPSCs espontáneos de mayor amplitud (> 70 pA) en el primer minuto luego del protocolo para la DSI, sugiriendo la participación de receptores para endocannabinoides en el control de otras terminales GABAérgicas que contactan a las neuronas del PnO. Los niveles de significación estadística se señalan con NS en caso ausencia (Test de t pareado).

El protocolo experimental usualmente empleado para poner de manifiesto la DSI consiste en la despolarización postsináptica (típicamente a 0 mV durante 10 a 30 s). Se espera que dicha despolarización active canales de calcio operados por voltaje de la neurona postsináptica incrementando la concentración de  $Ca^{2+}$  libre citosólico y con ello promover la síntesis y liberación de endocannabinoides (Heifets &Castillo, 2009).

En nuestra preparación exploramos la presencia de DSI utilizando un protocolo similar (0 mV, 20 s). Este protocolo no fue capaz de inducir el fenómeno de DSI en ningún caso. En la Fig. 14 se muestran ejemplos representativos de los resultados obtenidos en 2 neuronas (LTS y No LTS); en ninguna de ellas es posible observar una disminución transitoria de la amplitud del IPSC provocado por estimulación del LDT-PPT (o un incremento de las fallas) luego de la despolarización de la célula postsináptica. Resultados similares se obtuvieron en 13 neuronas independientemente de su fenotipo electrofisiológico. Así, la amplitud media de los IPSC obtenidos antes y durante los primeros 30 s luego de la despolarización fue de  $104.23 \pm 50.59$  pA y  $104.03 \pm 55.94$  pA respectivamente. La comparación de ambas amplitudes no mostró diferencias significativas (test de t pareado  $p=0.98$ ). La ausencia de DSI en los IPSCs sugiere que las terminales GABAérgicas en estudio carecen de receptores para endocannabinoides. Coherentemente con la ausencia de DSI del IPSC provocado por estimulación del LDT-PPT no se observaron cambios significativos en el PPR de estas neuronas. En efecto como se puede observar en la Fig. 14 C, el PPR presentó una leve reducción al  $90.71 \pm 8.57$  % ( $n=12$ ,  $p=0.152$ ) al cabo de un minuto; y a los 2 minutos el PPR se alcanzó un  $95.71 \pm 8.57$  % ( $n=12$ ,  $p=0.497$ ). Sin embargo, estas modificaciones en ningún caso resultaron estadísticamente significativas.

Sin perjuicio de lo anterior, en 7 neuronas se observó que el protocolo inductor de DSI utilizado en nuestro estudio provocó cambios reversibles en la población de los IPSC espontáneos como se ilustra en el gráfico de la Fig. 14D. En efecto, si bien las diferencias observadas en el conjunto de la población de IPSCs no alcanzan un nivel de significación estadística (K-S,  $p=0.11$ ) es evidente la ausencia prácticamente total de los IPSCs espontáneos de mayor amplitud en el primer minuto luego de la aplicación del protocolo para DSI. Este hallazgo confirma la eficacia del protocolo inductor de DSI al tiempo que sugiere que otras entradas GABAérgicas serían pasibles de modulación por endocannabinoides aunque el fenómeno de DSI esté ausente en las terminales GABAérgicas en estudio.

#### **4.2.3.3. Naturaleza inhibitoria de la acción GABAérgica sobre las neuronas del PnO.**

Durante el desarrollo postnatal se produce el “switch” de la acción sináptica GABAérgica de despolarizante a hiperpolarizante, debido al desarrollo de los transportadores de cloro (NKCC1 o KCC2) a nivel postsináptico que llevan la concentración intracelular de cloro a los niveles bajos que exhiben las neuronas del

SN en el adulto (revisado por Ben Ari et al., 2007). El switch ocurre de manera más o menos drástica (1-2 días) en etapas tempranas (primera semana) o más tardías (hasta la tercer semana) después del nacimiento, dependiendo de la especie y del sector del SNC analizado. Este evento forma parte de un conjunto de cambios madurativos operados de la sinapsis GABAérgica tanto a nivel pre- como postsináptico, que en ratas se procesan a lo largo del primer mes de vida (ver p.ej: Kirischuk et al., 2005). Dada la eventual trascendencia en la operativa del circuito mesopontino y, en consecuencia, comportamental que tiene la naturaleza excitadora o inhibidora del GABA en las neuronas de la FRP en la rodaja de la unión ponto-mesencefálica, nos propusimos determinar la naturaleza (excitadora/inhibidora) de la acción GABAérgica sobre las neuronas del PnO en condiciones de registro electrofisiológico tales que no afectaran la distribución fisiológica del ion cloro a ambos lados de la membrana de estas neuronas.

Para ello se utilizó el diseño experimental que se esquematiza en la Fig. 15A. El registro electrofisiológico de las neuronas del PnO se realizó en condiciones de “cell-attach”, condición que se logra una vez alcanzado el giga sello sobre la membrana celular. Con este método, a diferencia del registro de célula entera, utilizado de forma rutinaria en nuestro trabajo, no se establece la comunicación entre el compartimiento intracelular y la solución electrolítica del electrodo de registro y con ello no se interfiere con el gradiente fisiológico de concentración transmembrana para el ion cloro. En estas condiciones, se analizó los efectos de la aplicación yuxtacelular de GABA (1 mM) o de Muscimol (100  $\mu$ M). Con el registro eléctrico se monitorizó la descarga espontánea de potenciales de acción (n=3) o sobre la provocada por la despolarización (n=3) mediante la perfusión de la rodaja con una solución extracelular con alto contenido de potasio (9 mM, Bracci et al., 1998). El incremento de la concentración extracelular de  $K^+$ , debería provocar un  $\Delta V_m$  de 14.94 mV (según la ley de Nernst) llevando el  $V_m$  de las neuronas a un valor estimado cercano a los -45 mV. En estas condiciones las neuronas del PnO inicialmente silenciosas, descargaron potenciales de acción espontáneamente a frecuencias de  $2.24 \pm 0.05$  Hz.

Como se ilustra en la Fig. 15 B, la aplicación de microvolúmenes de GABA (1mM) detuvo transitoriamente la descarga de potenciales de acción de la neurona (silencio <2 s) retomando luego la descarga espontánea. La aplicación de Muscimol (100  $\mu$ M, n=3) provocó efectos similares aunque la supresión de la descarga espontánea de potenciales de acción fue algo más prolongada (5-10 segundos). Luego del período de silencio, las neuronas retomaron la descarga de potenciales de acción a valores de

frecuencia similares a los observados antes de la aplicación (Control  $2.43 \pm 0.03$  Hz Vs Recuperación  $2.45 \pm 0.08$  Hz,  $K-S=0.28$ ). De manera característica, en cada una de las neuronas estudiadas, ni la naturaleza (inhibidora) ni la magnitud (duración) de las respuestas se modificaron con la aplicación reiterada de GABA o Muscimol (20 – 30 inyecciones, 0.6 Hz) durante más de 30 minutos. Esto sugiere que en nuestro preparado, la activación GABAérgica intensa no provocó modificaciones detectables del gradiente transmembrana de cloro (redistribución) ni evidente desensibilización de los receptores GABAérgicos.

Una vez determinada la naturaleza de la acción sináptica GABAérgica en las neuronas del PnO, se procedió a abrir el sello pasando al modo de registro intracelular en la configuración de célula entera para caracterizar el fenotipo electrofisiológico de la neurona estudiada. Este procedimiento fue exitoso en 3 neuronas dos de las cuales fueron identificadas como LTS y la restante como No-LTS.

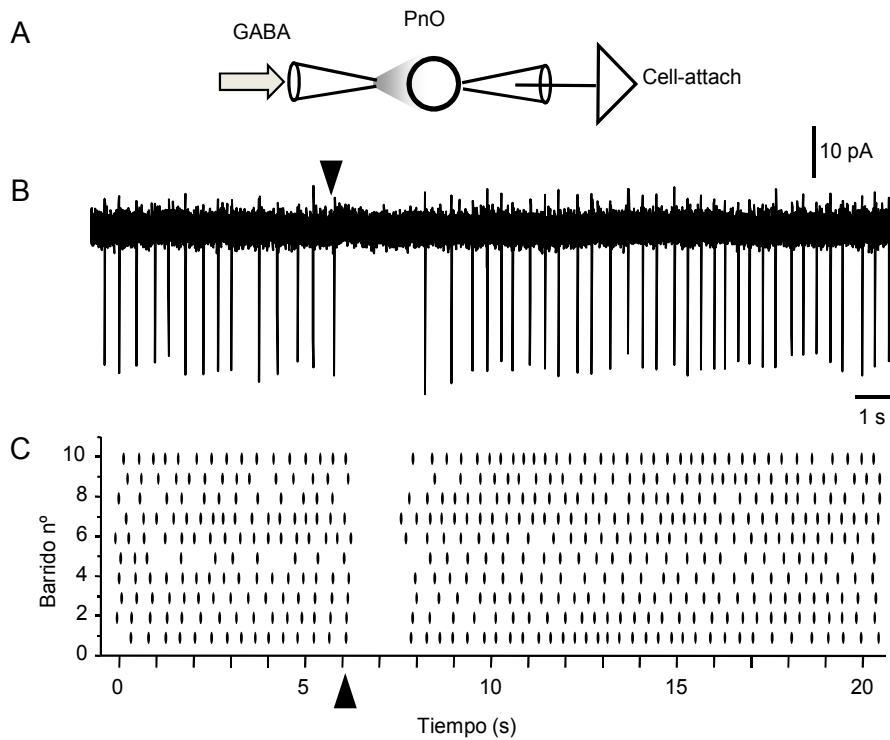
En suma, la acción GABAérgica en neuronas de la FRP, ya en etapas tempranas del desarrollo postnatal (P7 a P15), es inhibidora. Esto que sugiere que la inervación GABAérgica en la red mesopontina a este nivel del desarrollo postnatal presenta características distintivas de un sistema GABAérgico maduro. Es interesante notar que, aun cuando las ratas en etapas tempranas del desarrollo postnatal (<P12) presentan patrones de sueño considerados inmaduros, despliegan episodios de sueño cuyas características electrográficas y comportamentales (incluso el sustrato neural) son similares a las del S-REM del adulto (Karlsson et al., 2005, ver sin embargo Frank et al., 2003). Sin embargo otros autores no consideran que animales de esta edad tengan un comportamiento desarrollado (Frank et al., 2003).

En resumen, en esta sección hemos aportado sólida evidencia que apoya la existencia de contactos anatómica y funcionalmente intactos entre neuronas del LDT-PPT y neuronas del PnO en nuestra rodaja. Asimismo, hemos logrado determinar un conjunto de parámetros que caracterizan el componente GABAérgico de esta proyección. El GABA liberado por estas terminales ejerce un efecto inhibitor, aún tratándose de una preparación obtenida de ratas en período postnatal temprano (P7 - P14) sugiriendo la madurez de los circuitos GABAérgicos que controlan al PnO, sector considerado ejecutivo para componentes cardinales del S-REM. Los contactos GABAérgicos seleccionados para el análisis de la modulación mediada por el sistema colinérgico a nivel del PnO presentan, de manera característica, baja probabilidad de liberación de neurotransmisor e involucran receptores postsinápticos GABA-A. Como característica distintiva de otras aferencias GABAérgicas a las neuronas del PnO,



estas terminales carecen de receptores GABA-B y no parecen expresar receptores CB1 para endocannabinoides a juzgar por la ausencia de DSI.

En la siguiente sección se presentan los resultados obtenidos en el estudio de la modulación ejercida por colinomiméticos sobre esta población seleccionada de contactos sinápticos GABAérgicos.



**Figura 15. En la rodaja de trabajo GABA o sus agonistas GABAA (muscimol) ejercen un efecto inhibitor sobre las neuronas del PnO.** **A.** Diagrama del diseño experimental utilizado para analizar los efectos postsinápticos de GABA en las neuronas del PnO. Se realizó la inyección yuxtacelular de microvolúmenes de GABA (1 mM) o de Muscimol (100  $\mu$ M) y se analizó su efecto sobre la descarga espontánea de potenciales de acción en las neuronas del PnO. El registro de la actividad neuronal se realizó en la configuración de cell-attach a los efectos de no modificar los gradientes transmembrana fisiológicos para el ion Cloro. **B.** Registro de una neurona representativa del PnO. Note la descarga espontánea de espigas (deflexiones breves negativas). La punta de flecha indica el instante en el cual ocurre la aplicación local de GABA que provoca la detención transitoria de la descarga espontánea de potenciales de acción. **C.** Gráfico de tipo raster en el que la ocurrencia de cada espiga se representa como un segmento de recta vertical para 10 barridos consecutivos (1 a 10 en ordenadas) en función del tiempo y centrados en el instante de aplicación yuxtacelular de GABA (cabeza de flecha). El efecto inhibitor de GABA es sistemático presentándose en todas las inyecciones como una interrupción transitoria (~ 2s) de la descarga espontánea de espigas. En la neurona que se ilustra en B y C, la descarga espontánea fue relativamente estable ( $2.24 \pm 0.05$  Hz) y se provocó perfundiendo la rodaja con una solución conteniendo una concentración de potasio de 9 mM.

#### 4.3. Modulación colinérgica de las entradas GABAérgicas a las neuronas del PnO procedentes del LDT-PPT.

Como fuera jerarquizado en la sección de Introducción, el papel central de la innervación colinérgica del PnO en la generación y control del S-REM cuenta con un importante caudal de evidencia experimental. En efecto, aun cuando persiste cierta controversia en relación al sitio preciso de la formación reticulada mesopontina a cuyo nivel la aplicación de colinomiméticos desencadena un estado comportamental con características distintivas del S-REM (ver p.ej.: Garzón et al. 1998, Luppi et al. 2013). Se acepta que la actividad colinérgica a nivel mesopontino es capaz de activar neuronas colinoceptivas de la formación reticulada mesopontina, presumiblemente glutamatérgicas (Watson et al., 2011; Luppi et al., 2013), consideradas como neuronas REM-on. La activación de estas neuronas del PnO sería necesaria y “suficiente” para desencadenar los diversos componentes comportamentales del S-REM actuando este sector de la FRP como estructura comando de este estado comportamental. Como se mencionara, la hipótesis central del presente trabajo sostiene que la acción colinérgica a nivel del PnO asociada a episodios de S-REM no solamente incluye la modificación de la actividad de las neuronas de este núcleo sino que implica, además, la modulación específica de las entradas sinápticas que estas neuronas reciben. Así, de acuerdo a nuestra hipótesis, la activación de las aferentes colinérgicas al PnO implicadas en la generación del S-REM sería capaz de provocar una profunda modificación de la relación entrada-salida de las neuronas del PnO a través de la modulación de sus propiedades intrínsecas **conjuntamente con** cambios plásticos dependientes de estado de la eficacia de los contactos sinápticos que estas células reciben. La modificación de las entradas sinápticas a estas neuronas provocadas por colinomiméticos no ha sido suficientemente explorada y ha arrojado resultados conflictivos. La presencia de este tipo de fenómenos a nivel de la FRP le conferiría una nueva dimensión al análisis de los mecanismos neurales implicados en la generación y mantenimiento del S-REM.

En consecuencia, como objetivo central de esta tesis, indagamos acerca de la existencia de fenómenos plásticos de las entradas GABAérgicas procedentes del LDT-PPT a las neuronas del PnO desencadenados por agentes colinomiméticos, buscando recrear *in vitro* las modificaciones de la eficacia sináptica de las entradas a las neuronas del PnO asociadas al inicio y mantenimiento del S-REM.

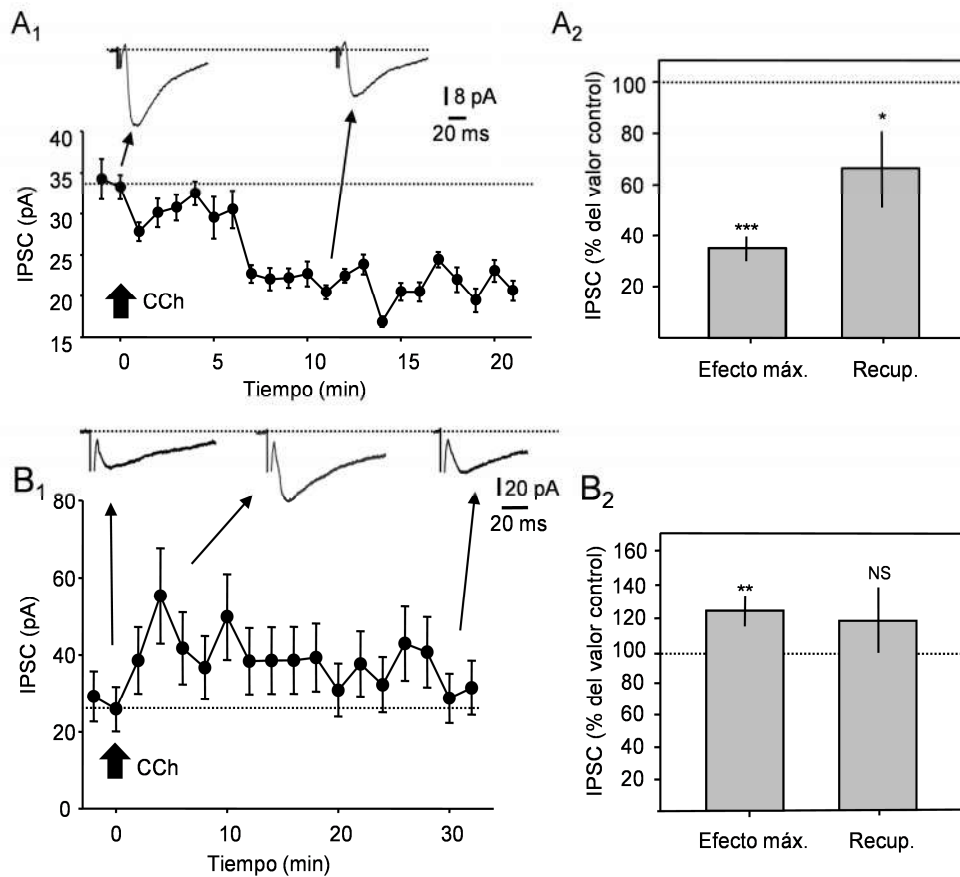
##### 4.3.1. Efectos de la aplicación local de colinomiméticos sobre la eficacia sináptica.

En una primera serie experimental y en virtud de los resultados de su aplicación local *in vivo*, se analizó los efectos de CCh, agonista colinérgico mixto muscarínico-nicotínico, sobre la eficacia del contacto GABAérgico en estudio. La aplicación yuxtacelular de microvolúmenes de CCh (1 mM) produjo modificaciones reversibles de la amplitud de los IPSC provocados por la estimulación del LDT-PPT en la totalidad de las neuronas estudiadas (n=21, Fig. 16). Estos resultados indican que la actividad colinérgica en el PnO, considerada como promotora de S-REM, es capaz de modificar la eficacia de los contactos sinápticos GABAérgicos que reciben las neuronas de la FRP. Llamativamente, los efectos de CCh no fueron uniformes. En efecto, la inyección de CCh provocó una reducción de la eficacia sináptica en el 62% de las neuronas (Fig. 16A) en tanto que en el 38% restante, provocó un incremento de la eficacia del contacto GABAérgico (Fig. 16B). La reducción o incremento de la eficacia del contacto GABAérgico no guardó relación con el fenotipo electrofisiológico de la neurona estudiada (LTS o No-LTS). Como se ilustra en el ejemplo de la Fig. 16A<sub>1</sub>, la reducción de la eficacia se hizo evidente inmediatamente después de la inyección de CCh se instaló progresivamente alcanzando un máximo a partir de los 10 - 15 minutos. Este efecto de CCh revirtió lentamente (no mostrado) recuperando parcialmente la amplitud del IPSC al cabo de 45 minutos de la inyección. En conjunto (Fig. 16A<sub>2</sub>), la amplitud del IPSC se redujo al  $35.35 \pm 4.49$  % del control ( $P < 0.001$ , test de t pareado) a los  $9.08 \pm 0.62$  minutos (rango 6-12 min) de la aplicación de CCh y se recuperó parcialmente alcanzando el  $66.84 \pm 14.35$  % de su valor control ( $p = 0.05$ ) a los  $19.23 \pm 0.89$  minutos (rango 14-44 minutos). El incremento de la eficacia sináptica provocado por CCh (Fig. 16B) mostró un curso temporal similar. La amplitud del IPSC se incrementó al  $124.77 \pm 9.65$  % del control (Wilcoxon Signed Rank test  $p = 0.008$ ) al cabo de  $3.50 \pm 0.73$  minutos (rango 2-8 minutos) de la inyección retornando lentamente a valores cercanos al control ( $118.17 \pm 20.98$  % del valor control,  $p = 0.42$  test de t pareado) al cabo de  $23.00 \pm 1.65$  minutos (rango 16-30 minutos). El curso temporal de los cambios de la eficacia del contacto GABAérgico provocados por la aplicación local de CCh coloca a los fenómenos plásticos observados en la categoría de los de media o larga duración (ver p.ej. Atwood et al., 2014). Sin embargo, dado que CCh no es degradado por los mecanismos enzimáticos naturales que controlan la acción colinérgica, la presencia prolongada del agonista colinérgico mixto en el espacio extracelular podría dar cuenta del peculiar curso temporal de los cambios de la eficacia sináptica observados.

Con vistas a caracterizar la modulación colinérgica de la entrada GABAérgica a las neuronas del PnO en condiciones más fisiológicas se procedió a analizar los efectos de la aplicación yuxtacelular de ACh (1 mM) con un abordaje experimental similar. En estos experimentos, una vez realizada la inyección (típicamente a 25 – 50  $\mu$ m de la célula registrada) la micropipeta se retiró suavemente del tejido con el fin de reducir un posible efecto por pérdida incontrolada de ACh desde la micropipeta.

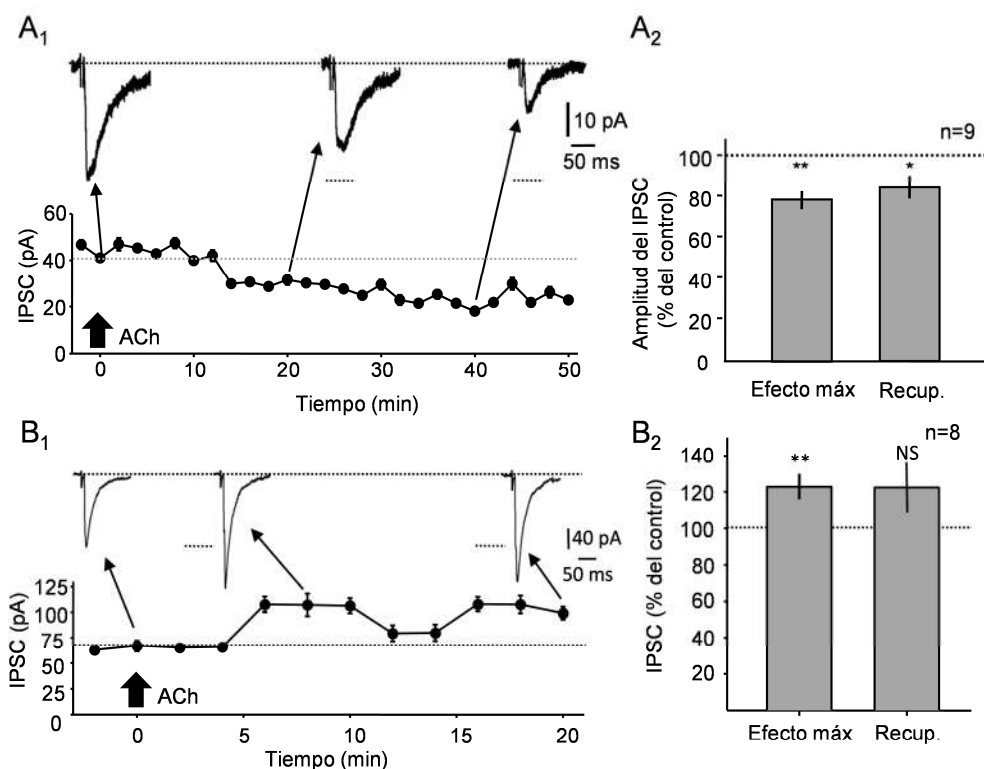
Los efectos de la aplicación yuxtacelular de ACh en la eficacia de contacto GABAérgico se analizaron en 17 neuronas. En todos los casos se observaron modificaciones de la amplitud del IPSC (Fig. 17). Consistentemente con los resultados obtenidos por la aplicación de CCh, ACh produjo tanto reducciones (n=9, Fig. 17A) como incrementos (n=8, Fig. 17B) de la amplitud de los IPSCs independientemente del fenotipo electrofisiológico (LTS o No-LTS) de la neurona registrada.

La reducción de la eficacia sináptica provocada por ACh (ver ejemplo Fig. 17A<sub>1</sub>) se instaló más lentamente que para el caso de CCh y la amplitud del IPSC mostró una leve tendencia a la recuperación a los 50 minutos de la inyección. En este grupo de neuronas (n=9) el efecto máximo (reducción al  $79.31 \pm 4.40$  % del control, test de t pareado  $p=0.004$ , Fig. 17A<sub>2</sub>) se observó a los  $6.67 \pm 0.58$  minutos (rango 4 – 10 minutos). En ningún caso se observó la recuperación total de la amplitud del IPSC en el tiempo que duró el experimento (20 - 50 minutos). Hacia el final del período de registro la amplitud de los IPSCs alcanzó el  $84.94 \pm 5.81$  % del control (test de t pareado  $p=0.028$ ). En estos casos, no detectamos elementos que sugirieran el deterioro de la preparación ni de la neurona registrada a la vez que no se produjeron cambios significativos de la resistencia en serie indicando la estabilidad de las condiciones de registro. En las restantes neuronas (n=8), ACh provocó incrementos de la eficacia del contacto GABAérgico que se instalaron lentamente mostrando una leve tendencia a la recuperación de la amplitud hacia los 20 minutos de la inyección (ver ejemplo en Fig. 17B<sub>1</sub>). En este grupo de neuronas (Fig. 17B<sub>2</sub>), el incremento de la amplitud de los IPSCs alcanzó el máximo ( $125.63 \pm 6.82$  % de la amplitud control,  $p=0.004$ ) a los  $8.22 \pm 0.85$  minutos de la inyección (rango 4 - 12 minutos) mostrando una tendencia lenta a la recuperación de la amplitud siendo de  $122.27 \pm 13.89$  % de la amplitud control ( $p=0.106$ ) hacia el final del período de registro (rango 16 - 32 minutos post inyección).



**Figura 16. Diversidad de efectos de CCh sobre la eficacia de los contactos sinápticos GABAérgicos sobre las neuronas del PnO procedentes del LDT-PPT.** **A<sub>1</sub>**. Ejemplo de una neurona con reducción de la eficacia sináptica provocada por la aplicación yuxtacelular de CCh. Gráfico amplitud media del IPSC ( $\pm$  SE.) en función del tiempo. Cada punto representa el promedio de respuestas obtenidas en intervalos de 1 minuto ( $n=10$ ). El CCh se aplicó una vez finalizado el muestreo de las respuestas correspondientes al minuto 0. Arriba se ilustran la respuesta media obtenida inmediatamente antes y después de la aplicación de CCh (indicadas por flechas). Los segmentos horizontales de línea punteada indican la amplitud media del IPSC obtenido antes de la inyección. **A<sub>2</sub>**. Gráfico de barras que representa la amplitud del IPSC normalizada a la amplitud control (%) durante el efecto máximo (Efecto máx.) y en el curso de la recuperación (Recup.) en las neuronas que mostraron una reducción de la eficacia sináptica. Los niveles de significación estadística de las diferencias de las amplitudes en relación a los valores control se señalan con \*\*\* indicando  $p<0.001$  y \* indicando  $p<0.05$  (Test de t pareado y de Wilcoxon respectivamente). **B<sub>1</sub>**. Igual que **A<sub>1</sub>** pero ilustrando el efecto de CCh en la amplitud del IPSC obtenido en una neurona representativa del grupo en el que CCh provocó un incremento transitorio de la eficacia sináptica. Cada punto representa la amplitud media de las repuestas obtenidas cada 2 minutos. Arriba se ilustran la respuesta media obtenida inmediatamente antes, y después de la aplicación de CCh (indicadas por flechas). **B<sub>2</sub>**. Similar a **A<sub>2</sub>** pero ilustrando el comportamiento del grupo de neuronas en el que CCh incrementó la eficacia del contacto GABAérgico. Los niveles de significación estadística de las diferencias de las amplitudes en relación a los valores control se señalan con \*\* indicando  $p<0.01$ ; o NS en caso ausencia (Wilcoxon Signed Rank Test; o Test de t pareado respectivamente).

Aún cuando las modificaciones de la eficacia sináptica provocadas por ACh fueron cuantitativamente más moderadas respecto de las observadas por CCh, su curso temporal fue similar. Esto sugiere que el curso temporal de los cambios de la eficacia sináptica de los contactos GABAérgicos sobre las neuronas del PnO provocados por



**Figura 17. Al igual que CCh la ACh promueve tanto reducciones como incrementos de la eficacia del contacto GABAérgico.** **A<sub>1</sub>**. Ejemplo de una neurona con reducción de la eficacia sináptica provocada por la aplicación yuxtacelular de ACh. Gráfico de la amplitud media del IPSC ( $\pm$  SE.) en función del tiempo. Cada punto representa el promedio de las respuestas obtenidas cada 2 minutos ( $n=20$ ). Se realizó la aplicación yuxtacelular de ACh una vez finalizado el muestreo de las respuestas correspondientes al minuto 0. Arriba se ilustran la respuesta media obtenida en los intervalos indicados por flechas. Los segmentos horizontales de línea punteada indican la amplitud media del IPSC obtenido antes de la inyección y se incluyen para facilitar la comparación. **A<sub>2</sub>**. Gráfico de barras que representa los resultados obtenidos por la aplicación de ACh sobre la amplitud del IPSC normalizada a la amplitud del control observada durante el efecto máximo y en el curso de la recuperación (Recup.) de la inyección. **B<sub>1</sub>**. Igual que **A<sub>1</sub>** pero ilustrando el efecto de ACh en la amplitud del IPSC obtenido en una neurona representativa del grupo en el que ACh provocó un incremento transitorio de la eficacia sináptica. Cada punto representa la amplitud media de las repuestas obtenidas cada 2 minutos. Arriba se ilustran la respuesta media obtenida inmediatamente antes y después de la aplicación de ACh (indicadas por flechas) **B<sub>2</sub>**. Similar a **A<sub>2</sub>** pero ilustrando el comportamiento del grupo de neuronas en el que ACh incrementó la eficacia del contacto GABAérgico. Los niveles de significación estadística de las diferencias de las amplitudes en relación a los valores control se señalan con \*\* indicando  $p<0.01$ , \* indicando  $p<0.05$  o NS en caso ausencia de significancia (Test de t pareado).

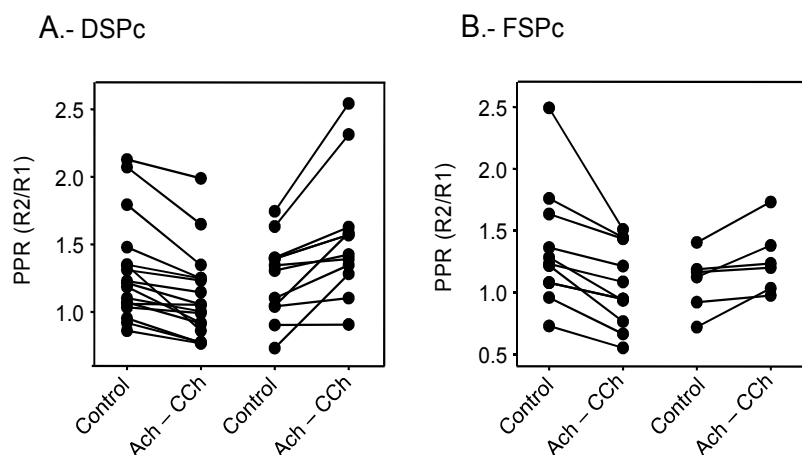
CCh constituye una de las características de la modulación colinérgica de estos contactos y no resulta de su carácter de agonista no degradable por los mecanismos enzimáticos fisiológicos del neurotransmisor natural. El fenómeno plástico observado

constituye un ejemplo de fenómeno heterosináptico de modulación de larga duración. El carácter de heterosináptico resulta del hecho de que se trata de una modulación colinérgica, originada probablemente de la innervación colinérgica de este sector de la FRP (Shiromani et al., 1987), de un contacto GABAérgico. El curso temporal de la modulación permite catalogarla como de depresión de larga duración (Depresión Sináptica Persistente, **DSP**), para el caso de la reducción prologada de la eficacia sináptica y para el incremento persistente de la eficacia, de potenciación de larga duración (Facilitación Sináptica Persistente, **FSP**) (Atwood et al., 2014). Dado que estos cambios plásticos fueron provocados por la aplicación local de colinomiméticos, estos han sido designados como **DSPc** y **FSPc** siendo el sufijo "c" indicativo del mecanismo de inducción colinérgico.

#### **4.3.2. Mecanismos de la modulación de la eficacia del contacto GABAérgico inducida por colinomiméticos.**

Como se mencionara en la Introducción, en el SNC, ACh es capaz de ejercer sus efectos moduladores modificando el fenotipo electrofisiológico de las neuronas así como la eficacia de los contactos sinápticos que las neuronas establecen entre sí (ver Picciotto et al., 2012). Más aún, en un contacto sináptico, ACh puede promover cambios de la eficacia sináptica a través de modificaciones tanto de la terminal presináptica (cambios de la probabilidad de liberación de neurotransmisor o del número de sitios de liberación,  $n$ ) como del sector postsináptico (modificación de la cantidad y tipo de receptores postsinápticos, tamaño cuantal). Clásicamente, se acepta que los cambios de la eficacia sináptica de origen presináptico se asocian a modificaciones específicas del PPR ( $R2/R1$ ) (Bekkers & Stevens, 1990; Schulz et al., 1994; ver para revisión McBain & Kauer, 2009). La depresión de la transmisión sináptica que implica mecanismos presinápticos se acompaña de incrementos del PPR en tanto que la potenciación de igual origen asocia la reducción de este índice. Para indagar acerca del aporte presináptico a los cambios plásticos del contacto GABAérgico inducidos por colinomiméticos, de manera sistemática se evaluó el PPR antes, durante y después de la inducción de la DSPc y la FSPc mediante la activación de aferentes GABAérgicas con pares de estímulos (ver Metodología).

En todos los casos, tanto la DSPc como la FSPc se acompañaron de cambios del PPR (Fig. 18) indicando un componente presináptico en el cambio plástico observado. Llamativamente, tanto para el caso de la DSPc como para la FSPc se observaron incrementos y disminuciones del PPR. De las neuronas que mostraron DSPc (n=29), el 58.62 % (n=17, Fig. 18A izquierda) presentó una reducción significativa del PPR siendo de  $1.30 \pm 0.09$  -antes de la inyección- y de  $1.12 \pm 0.08$  durante el efecto máximo de los agonistas (Wilcoxon Signed Rank test  $p < 0.001$ ). Por



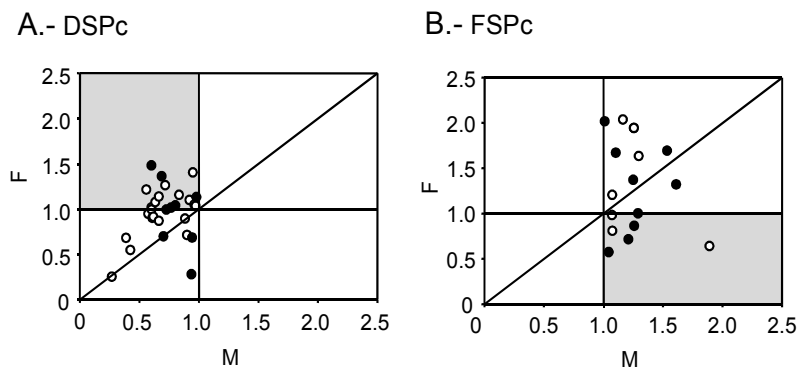
**Figura 18. Modificaciones del PPR del contacto GABAérgico que acompañan los cambios de la eficacia sináptica provocadas por colinomiméticos (ACh/CCh).** El total de neuronas estudiadas se desglosó de acuerdo a si mostraron reducciones (DSPc, A) o incrementos de la eficacia sináptica (FSPc, B). **A.** En las neuronas que mostraron DSPc, el cambio plástico de la sinapsis GABAérgica se acompañó de reducciones (izq.) en algunas neuronas o incrementos (dcha.) del PPR en otras. **B.** En aquellas neuronas en las que los colinomiméticos provocaron una FSPc, el cambio plástico también se acompañó de modificaciones sistemáticas del PPR. En tanto algunas neuronas mostraron reducciones (izq.) las restantes exhibieron incrementos (dcha.) del PPR.

su parte, en el 41.38 % restante (n=12; Fig. 18A derecha) el PPR se incrementó pasando de  $1.25 \pm 0.09$  (pre-inyección) a  $1.56 \pm 0.13$  en el efecto máximo de los colinomiméticos (Wilcoxon Signed Rank test  $p < 0.001$ ). Situación similar se observó en los casos en que los colinomiméticos provocaron potenciación. En estos casos, el 64.70 % (n=11) redujo significativamente el PPR (de  $1.46 \pm 0.16$  a  $1.15 \pm 0.14$ , test de t,  $p = 0.002$ ) con el desarrollo de la FSPc (Fig. 18B) mientras que en el 35.3 % (n=6) el PPR mostró un incremento estadísticamente significativo (de  $0.9 \pm 0.10$  a  $1.26 \pm 0.11$ , test de t,  $p = 0.03$ , Fig. 18B).

Si bien, en conjunto, estos hallazgos sugieren fuertemente que la modulación colinérgica del contacto GABAérgico en estudio obedece a mecanismos presinápticos, se profundizó en el análisis de los eventuales mecanismos implicados a través de la utilización del gráfico F vs M (ver Fig. 19), donde F corresponde al cociente de



$CV^2_{\text{Control}} / CV^2_{\text{maniobra}}$  y M al cociente de la amplitud media del IPSC obtenido luego de realizada la maniobra, sobre la amplitud media control:  $M = \text{IPSC}_{\text{maniobra}} / \text{IPSC}_{\text{control}}$  (ver metodología). Los casos en los que la modulación colinérgica se expresó como una DSPc (n=29) se graficaron separadamente (Fig. 19A) de los que expresaron una FSPc (Fig. 19B) para facilitar el análisis. Como se observa en la Fig. 19A, los puntos experimentales se distribuyeron en diversas áreas que sugieren múltiples mecanismos. Algunos puntos (n=6) se distribuyen en o por debajo de la línea de identidad ( $F=M$ ) sugiriendo un mecanismo exclusivamente presináptico. Otros sin embargo (n=11) se distribuyen en áreas que sugieren mecanismos postsinápticos (sobre la recta  $F=1$ , n=4) o mixtos en la expresión de la DSPc (por debajo de la recta  $F=1$  y por encima de la línea de identidad, n=7). Finalmente un grupo de puntos experimentales (n=12) se distribuyen de manera tal que sugieren que la depresión del



**Figura 19. Aplicación del método del coeficiente de variación ante la modulación mediada por colinomiméticos. A.** Distribución de puntos experimentales para el grupo de neuronas que desarrollaron DSPc. Note la proporción de puntos experimentales que se distribuyen en el cuadrante sombreado (reducción de la eficacia acompañada de facilitación presináptica). **B.** Distribución de puntos experimentales para el grupo de neuronas que desarrollaron FSPc. Si bien algunos puntos se distribuyen en el cuadrante sombreado (incremento de la eficacia acompañada de depresión presináptica) la mayoría ocupan el área de potenciación de origen presináptico. En A y B los círculos vacíos representan puntos experimentales obtenidos mediante la aplicación yuxtacelular de CCh y los círculos negros los resultados obtenidos por ACh.

IPSC por colinomiméticos se acompaña de un incremento de la probabilidad de liberación de neurotransmisor (área sombreada en el gráfico) sugiriendo una facilitación presináptica concurrente con la depresión.

Los resultados del análisis aplicado a los casos de la FSPc (Fig. 19B, n=16) mostró un panorama igualmente complejo. En 8 casos, la potenciación asoció una reducción de la probabilidad de liberación de neurotransmisor indicando un mecanismo de potenciación prevalentemente presináptico. Algunos puntos se distribuyeron por debajo de la línea de identidad (n=1) o sobre la línea de  $F=1$  (n=2) indicando un mecanismo mixto (pre y post) o exclusivamente postsináptico. Finalmente un grupo de

puntos experimentales (n=5) ocuparon el cuadrante de potenciación por debajo de la línea  $F=1$  (área sombreada en Fig. 19B) indicando una reducción de la probabilidad de liberación de neurotransmisor asociada al fenómeno de la potenciación sugiriendo una inhibición presináptica concurrente.

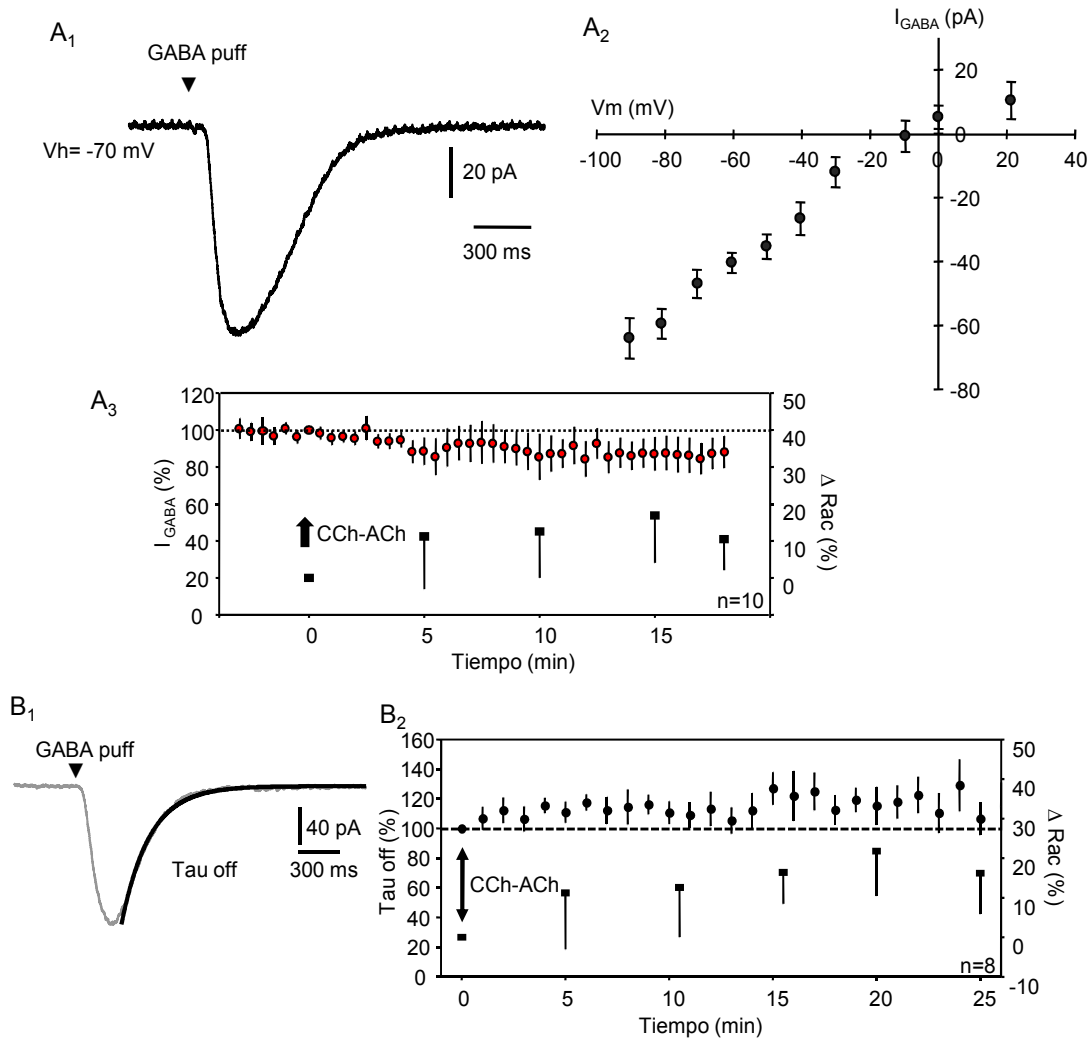
Aún cuando en todos los casos la modulación colinérgica del contacto GABAérgico se acompañó de modificaciones del PPR indicando el carácter predominantemente presináptico del mecanismo implicado, el análisis de estos mecanismos basado en las modificaciones del coeficiente de variación sugiere que en algunos casos (14 de 46) el fenómeno plástico podría implicar modificaciones a nivel postsináptico (p.ej. cambio cuanti y/o cualitativo de los receptores postsinápticos GABAérgicos, ver p.ej. Fernández de Sevilla et al., 2008).

Las condiciones experimentales de nuestro estudio (p.ej. estimulación de un conjunto de aferentes, imposibilidad de determinar el tamaño cuantal, probable heterogeneidad de la probabilidad de liberación en múltiples entradas GABAérgicas, eventual variabilidad en el n) obligan a la cautela en la interpretación de la distribución de puntos experimentales en el gráfico F vs M respecto de lo previsto en la Fig. 4. Sin embargo, antes de avanzar en la interpretación de nuestros resultados se desarrolló una serie experimental tendiente a descartar la participación de mecanismos postsinápticos en la modulación por colinomiméticos del contacto GABAérgico en estudio. Para ello, en 10 neuronas se analizó la corriente provocada por la aplicación yuxtacelular de GABA ( $I_{GABA}$ ) y su eventual modificación por la aplicación local de CCh o ACh (Fig. 20).

En estos experimentos, microvolúmenes de GABA (1 mM, 10 ms 20 psi) se aplicaron por presión de manera repetida a una frecuencia de 0.1 Hz. Un ejemplo representativo de la respuesta provocada se ilustra en la Fig. 20A<sub>1</sub>. La amplitud de la respuesta se estableció controlando el volumen inyectado de GABA obteniendo en general respuestas de  $97.69 \pm 8.41$  pA (n=7) cuyas características se mantuvieron relativamente estables durante al menos 5 minutos (30 inyecciones aproximadamente) antes de la aplicación de los colinomiméticos. Esta estabilidad sugiere la ausencia de fenómenos significativos de desensibilización en nuestras condiciones de trabajo así como de redistribución de cloro lo que pudiera ocasionar modificaciones de la amplitud de  $I_{GABA}$ , secundarias a cambios en el gradiente electroquímico para el ión. La curva I/V característica de la respuesta  $I_{GABA}$  (Fig. 20A<sub>2</sub>) confirma su dependencia de la activación de canales permeables a Cl (receptores GABA-A) e ilustra la ausencia de rectificación.

En ningún caso (10 de 10 neuronas) la aplicación yuxtacelular de microvolúmenes Ach (1 mM) o CCh (1 mM) provocó cambios significativos de la amplitud de pico de la  $I_{GABA}$  (Fig. 20 A<sub>3</sub>). En efecto, a los 15 - 20 minutos de la inyección de colinomiméticos -plazo en el cual tanto la DSPc como la FSPc del contacto GABAérgico se encuentran plenamente desarrolladas- la amplitud de la respuesta se redujo levemente, (a  $87.16 \pm 9.09$  % de la respuesta control) pero sin alcanzar significación estadística (test de t pareado  $p=0.19$ ). Esta leve reducción de la amplitud de pico ( $\sim 10\%$ ) pudo deberse a un leve incremento (del orden del 10%) de la resistencia en serie ocurrida durante el experimento como consecuencia de la distorsión repetida del tejido provocada por la inyección yuxtacelular de GABA.

Los cambios plásticos de la sinapsis GABAérgica pueden implicar cambios en el tipo de receptor y no necesariamente en su número modificando específicamente el curso temporal de la corriente sináptica sin exhibir cambios en su amplitud (ver p.ej. Fernández de Sevilla et al., 2008). En consecuencia se indagó acerca de la eventual modificación de la constante de tiempo de relajación de la  $I_{GABA}$  (Tau off, Fig. 20B<sub>1</sub>) provocada por la aplicación local de colinomiméticos. En 10 neuronas, se determinó la Tau off de la fase de relajación de  $I_{GABA}$  a partir del 90% de la amplitud de pico que fue de  $380.69 \pm 22.63$  ms (ver Fig. 20B<sub>1</sub> para ejemplo representativo). La aplicación de los agonistas colinérgicos (Fig. 20B<sub>2</sub>) no provocó cambios significativos de la Tau off de la  $I_{GABA}$ . Transcurridos de 15 a 20 minutos luego de la inyección local de los colinomiméticos, la Tau off se incrementó levemente  $115.84 \pm 7.60$  % del valor control, cambio que no mostró, sin embargo, significación estadística (Test de t pareado  $p=0.14$ ). Al igual que para la leve reducción progresiva de la amplitud de pico ilustrada en la Fig. 20A<sub>3</sub>, el incremento progresivo de la resistencia en serie podría dar cuenta también de los cambios observados en la Tau off de  $I_{GABA}$ .

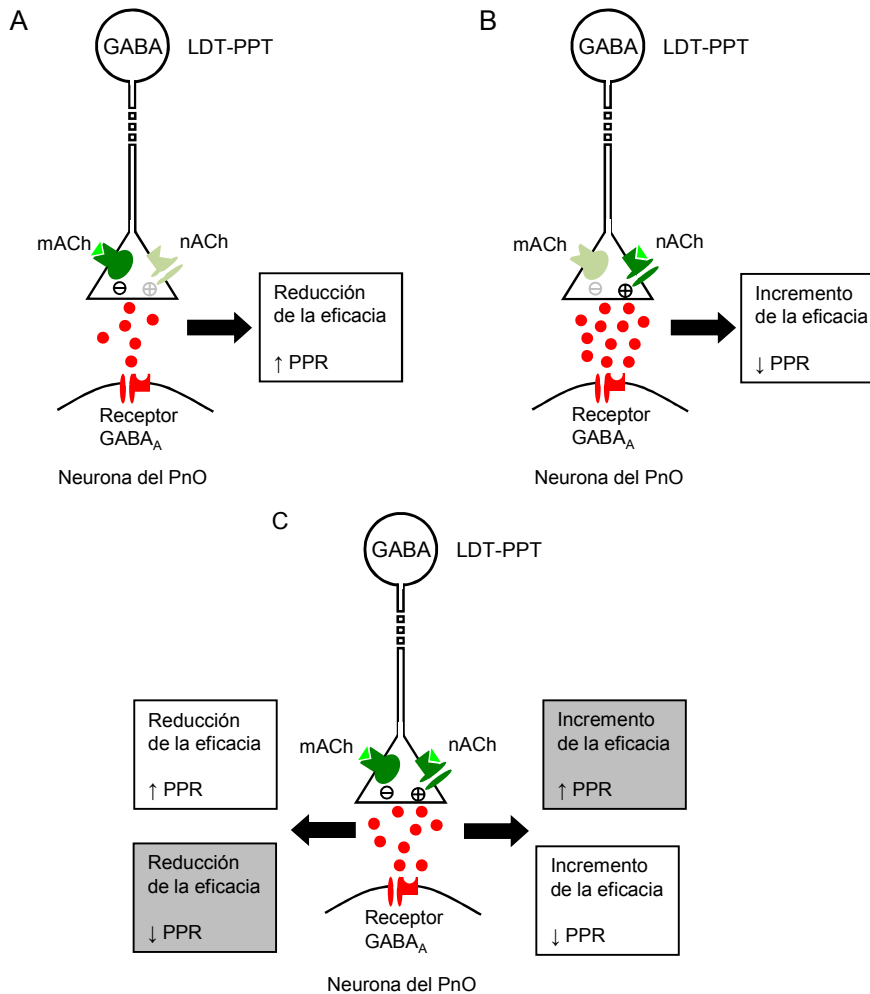


**Figura 20. Los colinomiméticos no modifican ni la amplitud ni el curso temporal de las respuestas postsinápticas a GABA.** **A<sub>1</sub>.** Respuesta ( $I_{GABA}$ ) control en modalidad de fijación de voltaje a la aplicación yuxtacelular de GABA (1 mM) por presión. El instante de aplicación se indica por la punta de flecha (GABA puff). **A<sub>2</sub>.** Curva I/V de  $I_{GABA}$  obtenida en una neurona representativa. Cada punto representa a la amplitud media ( $\pm$  SE.) de 10 respuestas consecutivas obtenidas para cada valor de  $V_m$  del protocolo. **A<sub>3</sub>.** Gráfico de la amplitud media de  $I_{GABA}$  ( $\pm$  SE.; círculos llenos, eje de ordenada izquierda) normalizada a la amplitud de la respuesta control (%) en función del tiempo y del cambio observado en la resistencia de acceso ( $\Delta Rac$  %  $\pm$  SE, cuadrados, ordenada a dcha.). La inyección yuxtacelular de CCh ( $n=5$ ) y ACh ( $n=5$ ) se realizó en el minuto 0 (Flecha). Para cada neurona, microvolúmenes de GABA se aplicaron repetidamente durante todo el experimento a razón de 1 inyección cada 30s durante el registro. **B<sub>1</sub>.** Respuesta a GABA promedio (trazado gris) de 20 inyecciones sucesivas, la punta de flecha indica el instante de inyección; y la exponencial (trazo negro) a la que se ajusta su fase de relajación ( $V_h=-70$ mV). En el ejemplo, la constante de tiempo de relajación ( $\tau_{off}$ ) fue de  $225.58 \pm 0.32$  ms, y el ajuste a una única exponencial mostró un  $r=0.965$ . **B<sub>2</sub>.** Gráfico de la  $\tau_{off}$  de  $I_{GABA}$  normalizada al valor control (% , ordenada izquierda) en función del tiempo para 8 neuronas, en 4 se aplicó CCh y en las 4 restantes ACh. En el eje de ordenada derecho se indica  $\Delta Rac$  % ( $\pm$  SE.) para el mismo grupo.

Nuestros resultados apuntan a que los mecanismos implicados en los cambios

plásticos del contacto GABAérgico provocados por agentes colinérgicos residen fundamentalmente a nivel presináptico. Sin embargo, aún cuando la terminal presináptica GABAérgica en estudio muestra cierta homogeneidad en cuanto sus propiedades funcionales (ver sección 4.2.3.), la diversidad de los efectos observados revelan la complejidad del control colinérgico de la eficacia sináptica de este contacto sináptico. Asimismo, la variedad de los probables mecanismos implicados sugieren la multiplicidad y eventual convergencia de efectos moduladores colinérgicos. En efecto, la reducción de la eficacia sináptica con incremento del PPR (Fig. 18A derecha) o reducción de la probabilidad de liberación de neurotransmisor (Fig. 19A y B) observado en algunas neuronas sugiere un fenómeno genuino de inhibición presináptica usualmente atribuido a la activación de receptores colinérgicos muscarínicos de tipo M2 o M4 (Fig. 21A, ver Introducción). En otros casos, el incremento de la eficacia del contacto GABAérgico asociado a una reducción del PPR (Fig. 18B izquierda) o a un incremento de  $p$  (Fig. 19) apunta a un fenómeno de facilitación presináptica atribuible a la activación de receptores colinérgicos nicotínicos localizados en la terminal (Fig. 21B, ver Introducción). Finalmente, en un importante número de neuronas -23 de 46 según el análisis de la modificación del PPR asociado al cambio plástico- las modificaciones presinápticas observadas durante los cambios de la eficacia del contacto sináptico (Fig. 18 A izquierda y B derecha) sugieren la concurrencia de facilitación y depresión de origen presináptico en el contacto GABAérgico. En el mismo sentido apuntan los puntos experimentales que se distribuyen en los cuadrantes sombreados de los gráficos F vs M ilustrados en la Fig. 19 A y B. Si asumimos que las entradas GABAérgicas en estudio son relativamente homogéneas en cuanto a sus características funcionales esenciales, es razonable postular que la concurrencia de fenómenos de depresión y facilitación presináptica resulten de la coexpresión de receptores muscarínicos y nicotínicos en la misma terminal presináptica (Fig. 21C).

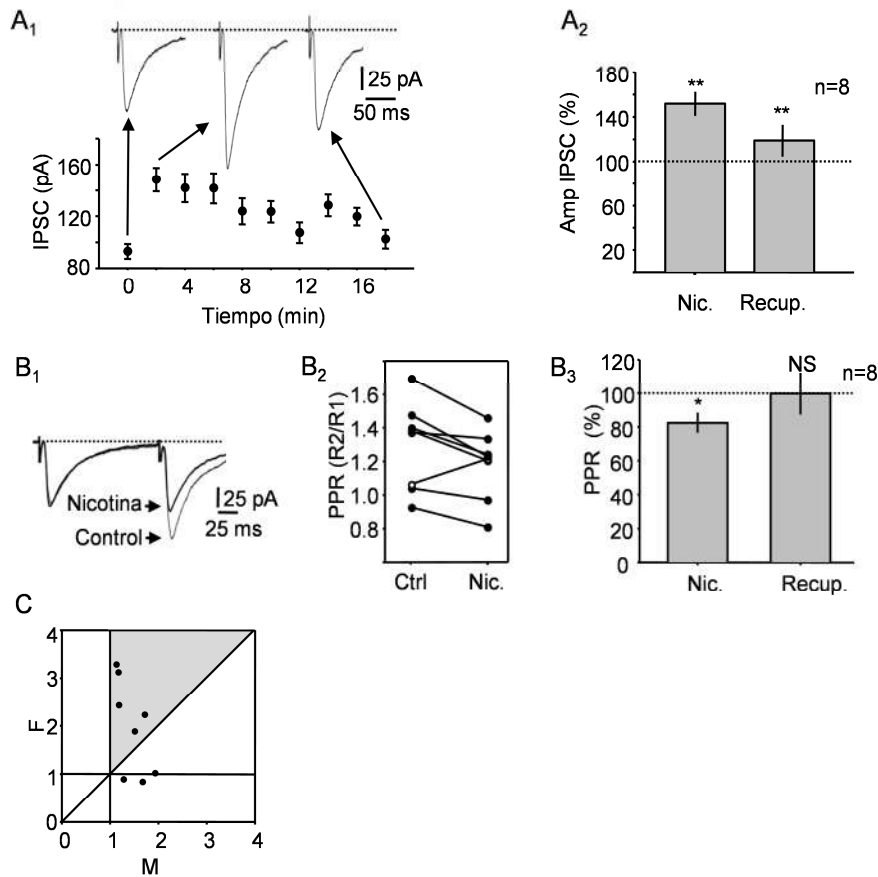
A los efectos de darle sustento experimental a esta hipótesis interpretativa, nos propusimos como siguiente paso obtener evidencias que apoyaran la expresión de ambos tipos de receptores colinérgicos a nivel presináptico en el contacto GABAérgico en estudio.



**Figura 21. Modelos de la modulación colinérgica del contacto GABAérgico procedente del LDT-PPT sobre las neuronas del PnO.** Nuestros resultados apoyan un mecanismo prevalentemente presináptico de la modulación colinérgica de la eficacia del contacto GABAérgico. En A, B y C se representan esquemáticamente una neurona GABAérgica del LDT-PPT que establece un contacto sináptico sobre una neurona del PnO. El GABA liberado (círculos rojos) actuaría sobre receptores de tipo GABA<sub>A</sub>. Las terminales presinápticas GABAérgicas podrían expresar tanto receptores colinérgicos muscarínicos (mACh), particularmente de tipo M2 o M4 (Brown, 2010), nicotínicos (nACh) (Léna & Changeux, 1997; Guo et al., 1998). **A.** La modulación colinérgica del contacto GABAérgico a través de la activación exclusiva (o predominante) de receptores muscarínicos podría dar cuenta de la reducción de la eficacia del contacto acompañada del incremento del PPR. Resultados compatibles con este tipo de modulación se observaron en 11 neuronas. **B.** La activación exclusiva (o predominante) de receptores nicotínicos, por su parte, provocaría un incremento de la eficacia sináptica acompañado de la reducción del PPR, como fuera observado en 10 neuronas. **C.** En las neuronas, se produce la coactivación de receptores muscarínicos y nicotínicos del terminal GABAérgico pudiendo provocar la combinación de efectos presinápticos como los destacados en los recuadros sombreados.

#### 4.3.3. Receptores colinérgicos involucrados en la modulación de la eficacia sináptica del contacto GABAérgico.

En una primera serie experimental preliminar (n=3) se analizó el efecto de la aplicación yuxtacelular de ACh sobre la eficacia del contacto GABAérgico en estudio en presencia de atropina (1  $\mu$ M), bloqueante muscarínico inespecífico. En estas condiciones, y de acuerdo a nuestra hipótesis, es esperable que la modulación colinérgica del contacto sináptico resulte exclusivamente de la activación de receptores nicotínicos, provocando un efecto neto de facilitación presináptica. En las neuronas estudiadas, ACh provocó un incremento persistente de la amplitud del IPSC que alcanzó el  $151.32 \pm 15.16$  % próximo a los 8 minutos de la inyección (test de t pareado  $p=0.04$ ) y el  $130.97 \pm 45.24$  % a los 25 minutos (test de t pareado  $p=0.56$ ). Paralelamente el PPR pasó de  $1.38 \pm 0.20$  a  $0.95 \pm 0.05$  en el efecto máximo de ACh sobre la amplitud del IPSC (Test de t pareado  $p=0.09$ ) y fue de  $1.23 \pm 0.09$  a los 25 minutos de la inyección (Test de t pareado  $p=0.87$ ). En estas neuronas ACh provocó un incremento persistente de la eficacia del contacto GABAérgico a través de un mecanismo presumiblemente presináptico similar al observado en la serie experimental de la sección anterior. La presencia de atropina sugiere que este efecto de ACh obedece a la activación de receptores presinápticos nicotínicos brindando sustento experimental a la hipótesis ilustrada en la Fig. 21. Para profundizar en este análisis se procedió a indagar acerca del efecto de Nic., agonista específico de este tipo de receptores colinérgicos, sobre la eficacia del contacto GABAérgico. Para ello, en 8 neuronas se evaluó el efecto de la aplicación yuxtacelular de Nic. (20  $\mu$ M, 20 psi y 30 ms) sobre el contacto GABAérgico en estudio. Un ejemplo representativo de los efectos observados se ilustra en la figura 19A<sub>1</sub>. Nicotina provocó un incremento persistente de la amplitud del IPSC aunque su curso temporal fue levemente diferente al observado con ACh/CCh. En efecto, la amplitud aumentó de manera significativa a los 2 minutos de la inyección ( $140.55 \pm 9.54$  pA) y tendió lentamente a la recuperación alcanzando valores similares al control ( $106.51 \pm 4.82$  pA) a los 18 minutos de la inyección. Resultados similares se observaron en las 8 neuronas estudiadas (Fig. 22A<sub>2</sub>). La aplicación de Nic. rápidamente provocó un incremento de amplitud del IPSC que alcanzó el  $151.73 \pm 10.74$  % del valor control (efecto máximo, Test de t pareado,  $p=0.002$ ) a los 2-5 minutos de la inyección permaneciendo significativamente aumentado ( $118.92 \pm 14.07$  %, Test de t pareado  $p=0.009$ ) aún a los 20 minutos. Las modificaciones del PPR que acompañaron el cambio de la eficacia sináptica inducido por Nic. (Fig. 22B) sugieren fuertemente el carácter presináptico del mecanismo



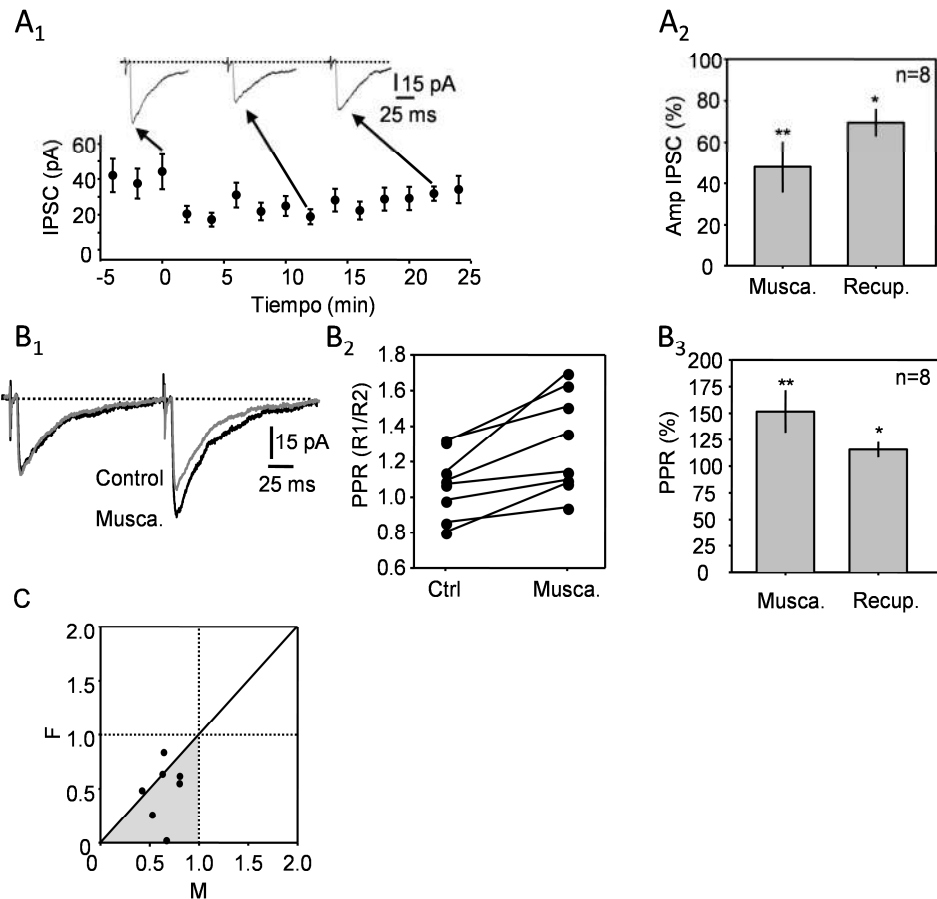
**Figura 22. Nicotina provoca un incremento persistente de la eficacia del contacto GABAérgico a través de un mecanismo presináptico.** **A<sub>1</sub>**. Una neurona representativa de los efectos ejercidos por Nicotina (Nic.) sobre la eficacia del contacto GABAérgico. Gráfico de la amplitud media del IPSC ( $\pm$  SE.) en función del tiempo. Cada punto representa la media de los IPSCs obtenidos en intervalos de 2 minutos ( $n=20$ ), Nic. se aplicó yuxtacelularmente una vez finalizado el muestreo de las respuestas correspondientes al minuto 0. Arriba se ilustran la respuesta media obtenida en tres momentos antes y después de la aplicación de Nic. (indicadas por flechas). **A<sub>2</sub>**. Gráfico de barras que representa la amplitud del IPSC normalizada a la amplitud control ( $\% \pm$  SE.) durante el efecto máximo y en el curso de la recuperación (Recup.). **B<sub>1</sub>**. Superposición de respuestas a pulsos pareados obtenidas en una neurona representativa. La amplitud de los IPSCs fue normalizada a la amplitud del primer IPSC de la respuesta control (trazado gris) y durante el efecto máximo de Nic. (trazado negro) para ilustrar la reducción del PPR provocada por la activación de estos receptores colinérgicos. **B<sub>2</sub>**. Gráfico de la magnitud del PPR antes de la aplicación de Nic. (Ctrl) y durante el efecto máximo para cada una de las neuronas estudiadas. **B<sub>3</sub>**. Gráfico de barras de la media del PPR normalizada al valor control ( $\% \pm$  SE.) durante el efecto máximo de Nic. y en el curso de la recuperación. **C**. Gráfico del cambio del coeficiente de variación de la amplitud de la respuesta postsináptica (F) vs factor de modificación de la amplitud de la respuesta postsináptica (M) que acompañan el desarrollo de un fenómeno plástico del contacto GABAérgico provocados por Nic.. La distribución de los puntos experimentales fundamentalmente en el área sombreada indica un mecanismo prevalentemente presináptico en línea con los cambios del PPR observados. Los niveles de significación estadística de las diferencias de las amplitudes medias en relación a los valores control (Test de t pareado) se señalan con \* para  $p < 0.05$ ; \*\* para  $p < 0.01$  o NS para la ausencia de significación.

implicado. En efecto, como se ilustra en el ejemplo de la Fig. 22B<sub>1</sub>, en 7 de 8 neuronas el efecto máximo de Nic. en la amplitud del IPSC se acompañó de la reducción del PPR (Fig. 22B<sub>2</sub>) que disminuyó al  $80.80 \pm 5.41$  % de su valor control (Fig. 22B<sub>3</sub>, Test de t pareado  $p=0.023$ ) y se restableció a los 20 minutos de la inyección (al  $99.68 \pm 12.55$  % del valor control, test de t pareado  $p=0.99$ ). La utilización del gráfico F vs M



(Fig. 22C) indica un mecanismo prevalentemente presináptico en 5 de las 8 neuronas estudiadas.

Con vistas a aportar evidencia adicional en favor del interpretativo ilustrado en la Fig. 21, en 8 neuronas se procedió a estudiar el efecto de la aplicación yuxtacelular de Muscarina (10  $\mu$ M, 20 psi 20 ms) sobre el IPSC GABAérgico. En línea con, la activación específica de receptores presinápticos muscarínicos de tipo M2-M4 debería provocar la supresión de la acción sináptica GABAérgica acompañada de evidencias indicativas de la naturaleza presináptica de la modulación. En la figura 20A<sub>1</sub> se ilustra un ejemplo representativo del efecto de Muscarina sobre la amplitud el IPSC. La eficacia del contacto GABAérgico se redujo drásticamente (de  $44.08 \pm 7.31$  pA a  $15.10 \pm 2.80$  pA) a los 12 minutos de la inyección, efecto que revirtió parcialmente a los 24 minutos ( $15.16 \pm 1.48$  pA). Similares resultados se obtuvieron en todas las neuronas estudiadas. El efecto supresor de Muscarina sobre el IPSC se instaló lentamente alcanzando el máximo a los 10-15 minutos de la inyección con una reducción al  $47.95 \pm 12.39$  % del control (Fig. 23A<sub>2</sub>, test de t pareado,  $p=0.02$ ) observándose una recuperación parcial de la amplitud del IPSC (al  $65.34 \pm 0.77$  % del control,  $p<0.001$ ) al cabo de 20-25 minutos. En todos los casos, el efecto supresor de Muscarina se acompañó de un incremento del PPR (Fig. 23B<sub>2</sub>) indicando un mecanismo presináptico. En efecto, en el máximo efecto supresor de Muscarina el PPR se incrementó significativamente (al  $151.66 \pm 19.89$  % del valor de control, Wilcoxon Signed Rank test  $p=0.008$ ) recuperando valores cercanos al control ( $115.59 \pm 7.26$  % del valor control, test de t pareado,  $p=0.02$ ) al cabo de 20 minutos de la inyección. Coherentemente con estos hallazgos, el análisis del cambio de coeficiente de variación provocado por Muscarina (gráfico F vs M, Fig. 23C) indica que en las 7 neuronas analizadas el mecanismo prevalente de la modulación es presináptico. En efecto, los puntos experimentales se distribuyeron cercanos a la diagonal (F=M, n=3) o en el área de inhibición presináptica (n=4).



**Figura 23. Muscarina provoca la reducción persistente de la eficacia del contacto GABAérgico a través de un mecanismo presináptico.** **A<sub>1</sub>**. Ejemplo representativo de una neurona con los efectos ejercidos por Muscarina sobre la eficacia del contacto GABAérgico. Gráfico de la amplitud media del IPSC ( $\pm$  SE.) en función del tiempo. Cada punto representa la media de los IPSCs obtenidos en intervalos de 2 minutos ( $n=20$ ), Muscarina (Musca.) se aplicó yuxtacelularmente una vez finalizado el muestreo de las respuestas correspondientes al minuto 0. Arriba se ilustran promedios de respuestas obtenidas en los intervalos de tiempo indicados por flechas. **A<sub>2</sub>**. Gráfico de barras que representa la amplitud del IPSC normalizada a la amplitud control ( $\% \pm$  SE.) durante el efecto máximo y en el curso de la recuperación (Recup.). **B<sub>1</sub>**. Superposición de respuestas a pulsos pareados obtenidas en una neurona representativa. La amplitud de los IPSCs fue normalizada a la amplitud del primer IPSC de la respuesta control (trazado gris) y durante el efecto máximo de Muscarina (trazado negro) para ilustrar el incremento del PPR provocado por la activación de estos receptores colinérgicos. **B<sub>2</sub>**. Gráfico de la magnitud del PPR antes de la aplicación de Musca. (Ctrl) y durante el efecto máximo (Musca.) para cada una de las neuronas estudiadas. **B<sub>3</sub>**. Gráfico de barras de la media del PPR normalizada al valor control ( $\% \pm$  SE.) durante el efecto máximo de Musca. en el curso de la recuperación (Recup.). **C**. Gráfico del cambio del coeficiente de variación de la amplitud de la respuesta postsináptica (F) vs factor de modificación de la amplitud de la respuesta postsináptica (M) que acompañan el desarrollo del fenómeno plástico del contacto GABAérgico provocados por Musca.. La distribución de los puntos experimentales fundamentalmente en el área sombreada o sobre la diagonal, indica un mecanismo prevalentemente presináptico en línea con los cambios del PPR observados. Los niveles de significación estadística de las diferencias de las amplitudes en relación a los valores control se señalan con \*\* indicando  $p < 0.01$  y \* en caso de  $p < 0.05$  para Test de t pareado.

## 5. DISCUSION

En esta tesis mostramos que las neuronas del PnO, núcleo de la FRP implicado críticamente en el inicio y control del S-REM, reciben inervación GABAérgica procedente del LDT-PPT cuya eficacia está sujeta a control colinérgico. Nuestros hallazgos colocan a los contactos sinápticos que integran la red mesopontina implicada en el control del S-REM, en el escenario de los mecanismos neurales que subyacen a este estado comportamental. La modulación colinérgica de contactos sinápticos GABAérgicos que integran la red mesopontina sugiere la participación de fenómenos de reconfiguración circuital en el control ejercido por esta red neural.

En la discusión general de esta tesis se abordarán: 5.1 la presencia y capacidad operativa en la rodaja de la unión ponto-mesencefálica de la red mesopontina considerada crítica en el inicio y control del S-REM. 5.2 las características funcionales distintivas de la inervación GABAérgica de las neuronas del PnO procedente del LDT-PPT y 5.3 peculiaridades de la modulación colinérgica de esta entrada sináptica. Finalmente, se especulará acerca de la implicancia funcional de esta modulación en el marco de los mecanismos propuestos para la generación de este estado comportamental.

### **5.1. Indemnidad anatómica y funcional de la red mesopontina en la rodaja de la unión ponto-mesencefálica.**

En la sección de Introducción se detalló el conjunto de evidencia que sustenta que, en mamíferos, una red mesopontina integrada por un sector aún poco definido de la FRP y su inervación procedente de los núcleos LDT y PPT (colinérgica y no-colinérgica), juega un papel central en el control del S-REM y otros estados comportamentales. En esta tesis se obtuvo sólida evidencia que apoya que estas estructuras están presentes en la rodaja de la unión ponto-mesencefálica y que neuronas del LDT-PPT establecen contactos sinápticos con neuronas del PnO.

Aún cuando el atlas estereotáxico utilizado como referencia (Paxinos y Watson, 1998) aplica a las características anatómicas de adultos jóvenes (270-290 g de peso), la morfología general de la rodaja obtenida de ratas neonatas (P7 a P14, Fig. 2) guarda razonable correspondencia con los cortes 53 a 55 (bregma -8.30 a -8.80 mm) de dicho atlas. Debido a la inclinación con la que se obtuvo la rodaja, el sector más ventral parece contener las estructuras delineadas en el corte más caudal (bregma ~ -8.80 mm) en tanto que el sector dorsal, colicular, se asemeja al ilustrado en el corte más cefálico (bregma ~ -8.30 mm). El perfil de la cavidad ventricular y las estructuras

de la zona subventricular corresponderían a las ilustradas en el corte intermedio (bregma -8.72 mm).

En esta tesis, se adoptó el polo rostral del núcleo motor del V par como referencia topográfica a los efectos de lograr cierta homogeneidad, experimento a experimento, en relación al sector de la reticulada del tronco seleccionada para nuestro estudio. Este sector de la FRP correspondería al PnO en su porción más caudal, área respecto de la cual varios autores sostienen su papel como zona ejecutiva para varios componentes del S-REM (Semba, 1990, Siegel, 2000; Reinoso-Suárez et al., 2007; Brown et al., 2012). Las registros intracelulares de las neuronas de este sector de la FRP presentaron, de manera característica, dos fenotipos electrofisiológicos signados por la presencia o ausencia de espiga de bajo umbral (LTS) lo que permitió categorizarlas como LTS y No-LTS (ver Fig. 5 y 6). Ambos tipos neuronales presentaron respuestas del Vm a diversos protocolos de corriente compatibles con la presencia de  $I_h$  e  $I_A$ . Neuronas del PnO con similares fenotipos electrofisiológicos han sido descritas por otros autores (ver p.ej.: Greene et al., 1986, Núñez et al., 1997, 1998) así como en otros sectores de la reticulada (Brown et al., 2006). Desafortunadamente, probablemente por problemas inherentes a la técnica de marcaje intracelular con electrodos de patch, no pudimos establecer una correspondencia entre la citomorfología de las neuronas registradas en el presente estudio y las descritas por otros autores (ver p.ej. Núñez et al., 1997). Aún cuando estos autores categorizaron las neuronas registradas en tipo I y tipo II de acuerdo a la ausencia (tipo I) o presencia de rectificación mediada por  $I_h$  ( tipo II), la proporción de neuronas LTS y No-LTS reportada por estos autores (14% y 86% de LTS y No-LTS) difiere de la encontrada en nuestro estudio (47.7% y 52.3%, respectivamente). Esta divergencia probablemente obedezca al hecho de que en el estudio de Núñez et al. (1997) el registro intracelular se obtuvo mediante electrodos afilados convencionales lo cual pudo haber sesgado el muestreo hacia las neuronas que mostraron diámetros somáticos relativamente mayores (neuronas carentes de LTS) y limitado el control del Vm en la célula registrada. Un factor adicional que podría dar cuenta de esta divergencia es que nuestro estudio se ha limitado a analizar el fenotipo electrofisiológico de las neuronas del PnO en las que la estimulación eléctrica a nivel del LDT-PPT provoca respuestas sinápticas muy probablemente por activación de neuronas que proyectan directamente sobre estas neuronas (respuestas monosinápticas).

La presencia del LDT-PPT en la rodaja de la unión ponto-mesencefálica se apoya en evidencias topográficas (Fig. 4), inmunohistoquímicas (Fig. 8) y electrofisiológicas. En efecto, de acuerdo con la rodaja seleccionada para nuestro estudio y según el atlas de Paxinos y Watson (1998), las neuronas del tegmento mesopontino próximas al polo medial del pedúnculo cerebeloso superior (ver imagen bregma -8.72mm) muy probablemente correspondan a neuronas del LDT-PPT. Más aún, la detección de neuronas ChAT+ en este sector (Fig. 8) es considerado un elemento confirmatorio (Ver p.ej., Shiromani et al. 1987; Wang & Morales, 2009). Finalmente, la breve caracterización electrofisiológica realizada en el curso de los experimentos dedicados al análisis de la activación antidrómica de las neuronas del LDT-PPT por estimulación eléctrica del PnO (Fig. 9) así como en los experimentos de estimulación farmacológica de estas neuronas (ver Resultados sección 4.2.2.2) permitió constatar que las neuronas registradas exhibieron fenotipos electrofisiológicos (datos no mostrado) similares a los reportados en estudios electrofisiológicos previos (ver p.ej. Leonard & Llinás, 1994).

El análisis *in vitro* de la modulación colinérgica de los contactos sinápticos que componen la red mesopontina implicada en el control del S-REM, objetivo central de esta tesis, presupone la existencia de contactos sinápticos entre neuronas del LDT-PPT y del PnO en la rodaja de la unión ponto-mesencefálica. La presencia de neuronas colinérgicas y no-colinérgicas del LDT-PPT marcadas retrógradamente por la aplicación de neurobiotina en el PnO (Fig.8) sugiere la existencia de terminales de neuronas del tegmento mesopontino a nivel del sitio de inyección. La activación antidrómica de las neuronas del LDT-PPT por estimulación del PnO (Fig. 9) apunta en este mismo sentido. Datos adicionales en favor de la existencia de una conexión funcional entre neuronas del tegmento mesopontino y neuronas del PnO en la rodaja de la unión ponto-mesencefálica provienen de los experimentos de activación farmacológica del LDT-PPT (Fig. 10), así como de los experimentos iniciales de estimulación eléctrica de este complejo (Fig. 11). La aplicación de microvolúmenes de agonistas glutamatérgicos y colinérgicos a nivel del LDT-PPT provocó incrementos en la frecuencia de descarga de PAs en neuronas del PnO. A diferencia de la estimulación eléctrica convencional (ver más adelante) que puede reclutar tanto somas neuronales como fibras de pasaje, este tipo de estímulo sería capaz de activar sectores somato-dendríticos de neuronas que expresan receptores funcionales para los agonistas utilizados. En este sentido, en tanto la inyección de Glu. pudo haber activado los diversos tipos celulares presentes en el LDT-PPT (colinérgicas,

glutamatérgicas y GABAérgicas, Boucetta et al, 2014; Wang & Morales, 2009), debido a los efectos de CCh sobre los diversos tipos celulares del agonista colinérgico.

## **5.2. Características de la entrada GABAérgica a las neuronas del PnO procedente del LDT-PPT.**

Como ya se mencionara, el análisis *in vitro* de la modulación colinérgica de los contactos sinápticos que componen la red mesopontina implicada en el control del S-REM, constituyó un objetivo central en esta tesis. Una vez demostrada anatómicamente y funcionalmente la conectividad LDT-PPT → PnO en la rodaja de la unión ponto-mesencefálica utilizada y como paso previo al análisis de la modulación colinérgica de la eficacia sináptica de los contactos GABAérgicos de esta proyección, dada la variabilidad de los efectos de la modulación colinérgica de las entradas sinápticas a neuronas de la FRP reportada por otros autores (Heister et al., 2009; Weng et al., 2014), se entendió necesario avanzar en la caracterización funcional de estos contactos. Esta caracterización se orientó fundamentalmente a determinar el carácter monosináptico de la proyección GABAérgica, el curso temporal de las corrientes postsinápticas y a establecer las propiedades funcionales esenciales (PPR) de las terminales presinápticas.

Estudios previos reportan la existencia de modulación colinérgica de contactos sinápticos tanto GABAérgicos como glutamatérgicos sobre neuronas de la FRP (Heister et al., 2009; Weng et al., 2014). Sin embargo, muy probablemente debido a que se analizan contactos sinápticos de origen indeterminado sobre neuronas pertenecientes a diversos sectores de la FRP, la aplicación de colinomiméticos provocó tanto incrementos como reducciones de la eficacia sináptica. A los efectos de reducir la incidencia de estas potenciales fuentes de variabilidad en nuestro estudio, se buscó restringir el análisis de la modulación colinérgica a un grupo de contactos de la red mesopontina funcionalmente homogéneo, representativo de entradas sinápticas de origen definido (muy posiblemente del LDT-PPT) a un conjunto de neuronas de la FRP perteneciente al mismo sector de la formación reticulada del tronco encefálico (región dorsal del PnO de situación medial al NMV).

Aun cuando existe consenso en la importancia funcional de la inervación GABAérgica de los sectores de la FRP críticos para el control del S-REM y la vigilia, la utilización de diversas técnicas de morfología funcional en ratas ha mostrado que el PnO recibe inervación GABAérgica de variado origen (Liang & Marks, 2009, Boissard et al., 2003, Semba, et al., 1992). A excepción de la mención realizada en los estudios

de Semba (1992) y de Boissard (2003), la inervación GABAérgica procedente del LDT-PPT hacia los sectores más caudales del PnO (este estudio) no ha sido específicamente jerarquizada. El estudio de Liang & Marks (2009), particularmente, reporta la existencia de una columna GABAérgica mesopontina contralateral al sitio de inyección del marcador retrógrado que se extiende desde los sectores más rostrales del PPT y del PnO hasta regiones más caudales de la FRP (PnC según Paxinos & Watson, 1998) que incluye las estructuras mesencefálicas descritas por Boissard et al. (2003) pero no hace mención a neuronas ubicadas en sectores caudales del LDT-PPT, ipsilaterales al sitio de inyección como las referidas en nuestro estudio. La utilización de ratas adultas en ese estudio así como inyecciones del marcador retrógrado a nivel de la FRP ligeramente más rostrales al sector analizado en esta tesis podrían dar cuenta, al menos en parte, de las diferencias observadas con nuestros resultados. En nuestro estudio, se describe la inervación GABAérgica de neuronas del PnO procedente del LDT-PPT ipsilateral apoyados no solamente en evidencias morfológicas (Fig. 8) sino que, a diferencia de los estudios mencionados, se sustenta complementariamente en variada evidencia electrofisiológica (Figs. 9 a 11). En efecto, como se discutiera en la sección anterior, la presencia de neuronas colinérgicas y no colinérgicas del LDT-PPT marcadas retrógradamente (inyección del marcador en el PnO caudal ipsilateral, Fig. 8) conjuntamente con la modificación de la descarga de las neuronas del PnO en respuesta a la estimulación farmacológica del LDT-PPT (Fig. 9) y la activación antidrómica de neuronas del LDT-PPT por estimulación eléctrica del PnO del mismo lado (Fig. 10) sugieren fuertemente la existencia de la conexión LDT-PPT → PnO descrita en esta tesis. Más aún, la obtención de IPSCs por estímulo eléctrico del LDT-PPT ipsilateral aislados farmacológicamente por bloqueo de la transmisión glutamatérgica (Fig. 11) indica que esa proyección, parte integral de la red mesopontina implicada en el control del S-REM y la vigilia, involucra contactos sinápticos GABAérgicos sobre neuronas del PnO. A los efectos de esta tesis, se destaca además que el patrón de estimulación utilizado aleja la posibilidad del reclutamiento, al menos significativo y sistemático (ver Fig. 11D<sub>2</sub>), de aferentes colinérgicas al PnO originadas en el LDT-PPT, eventualidad que podría dificultar el análisis de la modulación colinérgica de estos contactos analizados en esta tesis. La existencia de una proyección GABAérgica directa (monosináptica) desde el LDT-PPT sobre neuronas del PnO se apoya además en que: i) los IPSCs provocados por estimulación eléctrica del LDT-PPT registrados en estas neuronas se comportaron de acuerdo a lo previsto por Rose & Metherate (2005) para contactos monosinápticos

y ii) la latencia al pie de estos IPSCs fue similar a la latencia de los potenciales de acción antidrómicos provocados por estimulación del PnO y registrados en neuronas del LDT-PPT ( $9.53 \pm 2.76$  ms para el IPSC vs  $7.87 \pm 0.29$  ms para el PA antidrómico). La latencia al pie de los IPSCs provocados por estimulación submáxima del LDT-PPT y las características básicas de su curso temporal (ver Tabla 1) conjuntamente con el PPR (ver más adelante) constituyeron elementos identificatorios de las entradas sinápticas GABAérgicas a las neuronas del PnO esenciales para el desarrollo de nuestro estudio limitando el análisis a un grupo relativamente homogéneo de entradas sinápticas cuyas características funcionales fundamentales fueran consistentes experimento a experimento. En esta tesis se demuestra que el contacto GABAérgico estudiado presenta características distintivas y que además, junto con el resto de las aferentes GABAérgicas que reciben las neuronas del PnO, presentan características funcionales que indican su madurez y pleno desarrollo en el modelo experimental utilizado a juzgar por el efecto de la aplicación de GABA sobre la excitabilidad de las neuronas del PnO (ver Fig. 20).

Aún cuando *per se* puede no constituir una característica distintiva (ver p.ej.: Branco, & Staras, 2009), la estimación (cualitativa) de la probabilidad de liberación de neurotransmisor de la terminal presináptica del contacto GABAérgico estudiado a través del cálculo del PPR permitió avanzar en la caracterización de este contacto sináptico a la vez que se constituyó en una valoración ineludible para determinar el sitio de modulación colinérgica (pre o postsináptico) de su eficacia. Varias líneas de evidencia obtenidas en nuestro estudio sugieren que el contacto GABAérgico analizado se caracteriza por una probabilidad de liberación de neurotransmisor relativamente baja. En primer lugar el PPR resultó ser sistemáticamente mayor a 1 para toda la población estudiada (ver tabla 1). La presencia de facilitación por pulsos pareados ( $PPR > 1$ ) en todos los casos analizados sugiere que efectivamente en la situación control el contacto GABAérgico posee una probabilidad de liberación de neurotransmisor relativamente baja (Dobrunz & Stevens, 1997). En segundo lugar, si el proceso de liberación de neurotransmisor es binomial se acepta que la variabilidad de la amplitud de las respuestas postsinápticas en una misma neurona en la situación control (estímulos únicos a baja frecuencia) crece con la reducción de la probabilidad de liberación de neurotransmisor de las terminales implicadas (Faber y Korn, 1991 y ver sección 3.5). Valores relativamente elevados del CV de la amplitud (media  $0.48 \pm 0.22$ ,  $n=51$ ) así como una proporción relativamente elevada de fallos (de hasta el 20% en algunos casos) observados en nuestro estudio apuntan en que efectivamente ese



es el caso para la terminal GABAérgica. Las características funcionales de la terminal GABAérgica en relación a sus propiedades en cuanto a la liberación de neurotransmisor podrían ser mejor analizadas con otras aproximaciones que no hemos realizado hasta el momento. El empleo de la estimulación mínima (estimulación de una única aferente) y/o registro de pares neuronales podrían arrojar importante evidencia en este sentido y permitirían cuantificar la probabilidad de liberación de neurotransmisor en las terminales GABAérgicas en estudio.

Finalmente, nuestros resultados indican que, a diferencia de otras entradas GABAérgicas a las neuronas del PnO, la entrada GABAérgica en estudio carece de modulación por agonistas para receptores GABA-B (Fig. 13) a diferencia de lo descrito para otros contactos GABAérgicos en estructuras vinculadas al control de ciclo sueño-vigilia (Gottesmann, 2002; Datta, 2007). Aún cuando esta característica es relevante a la hora de considerar el perfil identitario de esta entrada sináptica y determinar la existencia de potenciales mecanismos de modulación no colinérgicos que pudieran influir en las propiedades funcionales de las terminales en estudio (Ulrich & Bettler, 2007), no parece ser relevante a la hora de analizar las características de la modulación colinérgica de este contacto. En contraste la obtención de evidencias que sugieren la ausencia de receptores para endocannabinoides como característica distintiva de este contacto sináptico entre otros contactos GABAérgicos que reciben las neuronas del PnO (Fig. 14), podría tener importantes derivaciones en relación a la modulación colinérgica de este contacto. En efecto, en varios sectores del SNC, la activación de receptores muscarínicos (M1-M3) en la célula postsináptica, a través de la activación de la fosfolipasa C, es capaz de iniciar la síntesis de endocannabinoides que activan retrógradamente los receptores CB1 localizados en la terminal presináptica provocando la reducción de la eficacia del contacto sináptico (Marty & Diana, 2004). Son varios los estudios que sugieren que ACh es capaz de activar neuronas del PnO a través de la activación de este tipo de receptores muscarínicos (Brown et al., 2011). En consecuencia, de producirse la síntesis de endocannabinoides en respuesta a la estimulación colinérgica en estas neuronas, estos podrían difundir hacia las terminales sinápticas que estas neuronas reciben y promover cambios específicos de la eficacia de estos contactos en tanto estos expresen receptores CB1. La ausencia de DSI en la terminal GABAérgica en estudio -indicando la ausencia de receptores de tipo CB1 en la terminal- aleja la posibilidad de que este mecanismo pueda participar en la modulación colinérgica de estos contactos analizada en el presente estudio. Es altamente probable entonces que los cambios de la eficacia del

contacto GABAérgico provocados por ACh estudiados en esta tesis obedezcan a la activación de receptores colinérgicos presentes en estas terminales.

### **5.3. Modulación colinérgica de la entrada sináptica GABAérgica a las neuronas del PnO.**

En el presente trabajo demostramos la existencia de modulación colinérgica de las entradas GABAérgicas a las neuronas del PnO activadas por estimulación eléctrica del LDT-PPT, parte de la red mesopontina considerada clásicamente como esencial en el control del ciclo sueño vigilia (ver introducción). Nuestros hallazgos complementan los obtenidos por Sanford et al., (2003) y establecen un eventual sustrato celular para los fenómenos descritos por Xi et al., (2004) y Vanini et al., (2011) quienes aportan evidencias acerca de la interacción funcional entre las inervaciones colinérgica y GABAérgica del PnO y sus consecuencias en la generación de diversos estados comportamentales.

Nuestros datos muestran que la aplicación yuxtacelular a las neuronas del PnO de agentes colinérgicos (CCh o ACh) fue capaz de modificar de manera reversible y duradera la amplitud de la respuesta sináptica GABAérgica a la estimulación del LDT-PPT indicando la presencia de un fenómeno plástico heterosináptico en todas las neuronas analizadas. Pese a tratarse de un hallazgo propio de este contacto sináptico, el fenómeno plástico no fue homogéneo en cuanto a sus características. En efecto, en el 63% de los casos la aplicación local de colinomiméticos provocó una reducción reversible aunque de larga duración de la amplitud del IPSC (DSPc; Fig. 16A, 17A). En los restantes casos (37%) la modulación colinérgica se expresó como un incremento de la amplitud del IPSC, igualmente reversible y con similar curso temporal (FSPc; Fig. 16B, 17B).

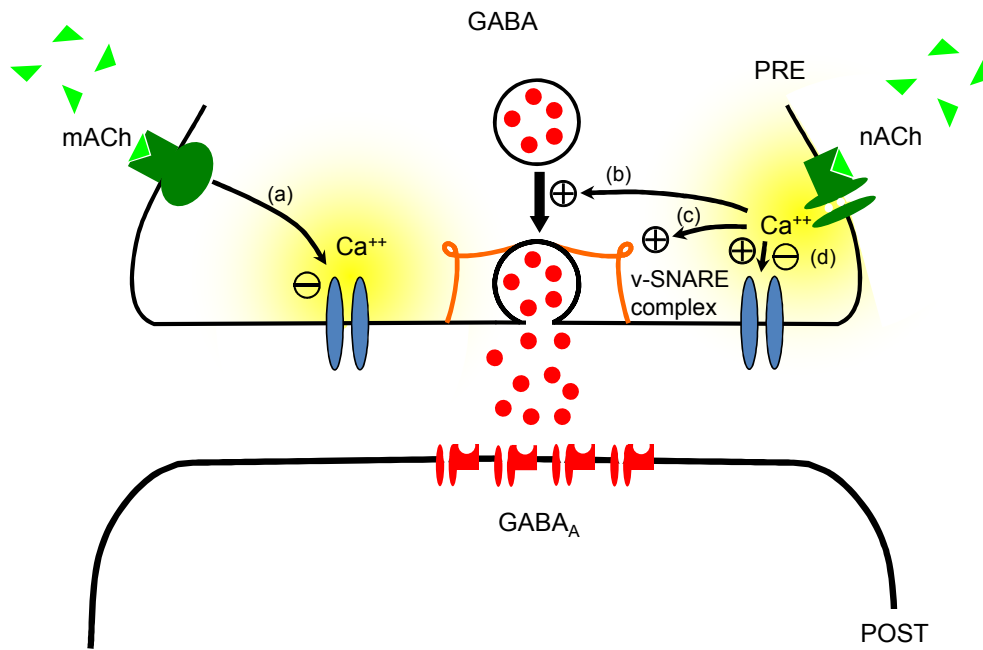
En todos los casos, tanto para la DSPc como para la FSPc, la modulación colinérgica del contacto GABAérgico se acompañó de modificaciones del PPR sugiriendo el origen presináptico del fenómeno plástico (Fig. 18). La distribución de puntos experimentales en el gráfico F vs M (Fig. 19) y la ausencia de modificaciones de la respuesta a la aplicación yuxtacelular de GABA durante la modulación colinérgica de la eficacia sináptica (Fig. 20) apuntan en el mismo sentido.

La variabilidad en la modificación del PPR y la distribución de puntos en el gráfico F vs M, sin embargo, revelan la complejidad del control colinérgico de la eficacia sináptica de este contacto sináptico. Como se discutiera en la sección 4.3.2, nuestros resultados son compatibles con un control colinérgico complejo dependiente de la

activación de receptores presinápticos tanto muscarínicos (M2 o M4) como nicotínicos (particularmente de tipo alfa4-beta2 o alfa7). Evidencias farmacológicas e inmunohistoquímicas (muscarínicos: Baghdoyan et al., 1994; Baghdoyan 1997; Baghdoyan & Lydic 1999; Coleman et al., 2004; nicotínicos: Stevens et al., 1993; Brown et al., 2012) indican la presencia de ambos tipos de receptores a nivel de estructuras centrales de la red mesopontina implicada en el control del S-REM y otros estados comportamentales aún cuando no existen datos claros acerca de su localización subcelular y persiste la controversia en cuanto a sus efectos a nivel de la transmisión sináptica sobre neuronas de la FRP (ver Introducción).

La observación de DSPc acompañada de un incremento del PPR, datos que corresponden en su mayoría a puntos experimentales ubicados en los cuadrantes de depresión presináptica en el gráfico F vs M, apunta a un efecto muscarínico con reducción de la probabilidad de liberación de neurotransmisor (Fig. 18A derecha y Fig. 19A), fenómeno genuino de inhibición presináptica usualmente atribuido a la activación de receptores colinérgicos muscarínicos de tipo M2 o M4 (Fig. 21A). Por su parte, el incremento de la eficacia del contacto GABAérgico (FSPc) asociado a una reducción del PPR (Fig. 18B izquierda), características ambas de un fenómeno de facilitación presináptica, sugieren un efecto atribuible a la activación de receptores colinérgicos nicotínicos localizados en la terminal (Fig. 21B). Resultados compatibles con esta interpretación se obtuvieron por aplicación local de muscarina y nicotina que provocaron fenómenos plásticos similares en la transmisión GABAérgica en estudio: DSPc para el caso de muscarina (Fig. 23) y FSPc frente a la aplicación de nicotina (Fig. 22) ambos fenómenos de mecanismo claramente presináptico,

Llamativamente, el 50% de las neuronas estudiadas (23 de 46) las modificaciones presinápticas observadas durante los cambios de la eficacia del contacto sináptico GABAérgico (Fig. 18 A izquierda y B derecha) sugieren la concurrencia de facilitación y depresión de origen presináptico. En el mismo sentido apuntan los puntos experimentales que se distribuyen en los cuadrantes sombreados de los gráficos F vs M ilustrados en la Fig. 19 A y B. Si asumimos que las entradas GABAérgicas en estudio son relativamente homogéneas en cuanto a sus características funcionales esenciales, es razonable postular que la concurrencia de fenómenos de depresión y facilitación presináptica resulten de la coexpresión de receptores muscarínicos y nicotínicos en la misma terminal presináptica (Fig. 21C).



**Figura 24. Resumen de los efectos más característicos de la activación de los receptores presinápticos muscarínicos (mACh) y nicotínicos (nACh) sobre algunos de los mecanismos implicados en la liberación de neurotransmisor en el SNC.** La activación de receptores muscarínicos de tipo M2 o M4 asocia la inhibición de los canales de calcio operados por voltaje de la terminal (a) lo que conlleva a una reducción de la eficacia sináptica con disminución de la probabilidad de liberación de neurotransmisor (Brown, 2010). Los procesos intracelulares derivados de la activación de los receptores nicotínicos (difieren ligeramente si se trata de de alfa 7 o de alfa4beta2) no han sido aún del todo esclarecidos (Dajas-Bailador & Wonnacott, 2004). Parte de los efectos sobre los mecanismos de liberación de neurotransmisor resultan del incremento localizado (directo a través del receptor, alfa7 o indirecto por despolarización alfa4beta2) de la concentración de calcio citosólico. El incremento de la concentración de calcio citosólico puede promover: el incremento del número de vesículas competentes para la fusión desde el RRP (pool pronto para la liberación) (b, Barclay et al., 2005) o directamente facilitar la liberación modulando algunos de los componentes proteicos de la maquinaria de liberación representados genéricamente en la figura como v-SNARE complex (c, MacDermott et al., 1999, Barclay et al., 2005). Finalmente, el incremento de calcio citosólico puede modular las conductancias de calcio operadas por voltaje de la terminal (d, Barclay et al., 2005, Díaz-Rojas et al., 2015).

La figura 24 resume los principales mecanismos descritos por los cuales la activación de ambos subtipos de receptores colinérgicos en la terminal presináptica puede modificar la eficacia del contacto sináptico. La activación de receptores muscarínicos de tipo M2 o M4, asociada a la activación de una cascada de reacciones a través de una proteína G (ver Introducción) se asocia a la inhibición de los canales de calcio operados por voltaje (posiblemente tipo N o P/Q) de la terminal presináptica (a en la Fig. 24) provocando así la reducción de la probabilidad de liberación de neurotransmisor durante el potencial de acción presináptico (ver p.ej. Brown, 2010 para revisión) con el consiguiente incremento en el PPR.

Por su parte la activación de los receptores nicotínicos en la terminal presináptica a través de diversos mecanismos dependientes del incremento localizado del calcio

citosólico (b, c y d en la Fig. 24) provocaría un incremento de la probabilidad de liberación de neurotransmisor acompañado de la reducción del PPR. Estos mecanismos no han sido totalmente dilucidados y serían dependiente del subtipo de receptor nicotínico expresado en la terminal (MacDermott et al., 1999; Dajas-Bailador & Wonnacott, 2004). En cualquier caso, el incremento de la concentración de calcio citosólico por un mecanismo independiente, en la mayoría de los casos, de los canales de calcio presinápticos operados por voltaje, puede promover el incremento de la probabilidad de liberación de neurotransmisor y en consecuencia la reducción del PPR. Diversos mecanismos han sido invocados: la modificación directa de la dinámica de las vesículas presinápticas (b en la Fig. 24, Barclay et al., 2005), la modulación de algunos de los componentes del complejo v-SNARE (c en la Fig. 24, MacDermott et al., 1999; Barclay et al., 2005) y la modulación dependiente del calcio intracelular de las conductancias de calcio operadas por voltaje de la terminal (d en la Fig. 24, Barclay et al., 2005; Catterall et al., 2008). Un mecanismo adicional que cuenta con creciente evidencia experimental a su favor en sinapsis del SNC consiste en la liberación de calcio inducida por calcio desde depósitos intracelulares localizados en la terminal (MacDermott et al., 1999) que podría amplificar los efectos intracelulares de la activación de receptores nicotínicos.

La posibilidad de la coexistencia de modulación de la misma terminal por activación de ambos tipos de receptores colinérgicos, muscarínicos y nicotínicos, se apoya en las características de los mecanismos moleculares implicados en la modulación de la liberación de neurotransmisor por activación de cada uno de ellos y su relativa independencia. En virtud de estas características y la eventualidad de la ausencia de oclusión en la expresión de los efectos provocados por la activación de ambos tipos de receptores, es razonable postular que la coactivación de receptores muscarínicos y nicotínicos pueda generar efectos netos sobre la liberación de neurotransmisor que combinen los efectos provocados por la activación de cada uno de ellos por separado. Así, será posible observar un efecto prevalente muscarínico sobre la amplitud de la respuesta sináptica (DSPc) acompañado de una reducción del PPR, característica de la activación nicotínica y viceversa. La co-expresión de efectos muscarínicos y nicotínicos sobre la terminal como se ilustra en la Fig. 21C, podría dar cuenta efectivamente de los resultados obtenidos en el 50% de las neuronas estudiadas (Fig. 18 A izquierda y B derecha y Fig. 19). De acuerdo con la visión actual que recoge un importante caudal de evidencia electrofisiológica, inmunohistoquímica y farmacológica (Gil et al., 1997; McDermott et al., 1999) se propone que sobre una terminal

presináptica pueden converger múltiples mecanismos de modulación de tal manera que el estado funcional de la terminal resultaría del peso relativo de cada uno de ellos y de su eventual interacción. En este sentido, la coexpresión de receptores muscarínicos y nicotínicos en la terminal GABAérgica en estudio podría ser otra característica distintiva de estas terminales aún cuando la modulación colinérgica podría expresarse como muscarínica o nicotínica neta de acuerdo al estado funcional de la terminal. Fenómenos de modulación colinérgica de la eficacia sináptica a través de la activación receptores muscarínicos y nicotínicos presinápticos de efectos opuestos sobre la eficacia del contacto han sido descritos en otros sectores del SNC: hipocampo (Behrends & ten Bruggencate, 1993), sinapsis dopaminérgicas mesoestriatales (Zhou et al., 2003), en sinaptosomas estriatales (Grilli et al., 2009), sinapsis hipotalámicas (Jo & Role, 2002), corteza prefrontal (Vidal & Changeux, 1993) y núcleo accumbens (De Rover et al., 2002). En general, estos reportes solo incluyen planteos especulativos en relación a las eventuales consecuencias funcionales de este tipo de diseño neural asumiendo la activación secuencial de ambos tipos de receptores o refiriendo a posibles diferencias en el curso temporal de los efectos de su activación simultánea.

La presencia de ambos tipos de receptores colinérgicos, muscarínicos y nicotínicos sobre la misma terminal GABAérgica, con efectos opuestos sobre la eficacia del contacto representa, a priori, una estrategia neural con significado funcional poco claro si se considera el efecto sobre una única respuesta postsináptica. Si este fuera el caso ¿cuál sería el efecto neto de la modulación colinérgica?, ¿de qué dependería? Si fuera facilitador ¿cómo se interpretarían las evidencias experimentales que señalan que durante el S-REM, estado comportamental dependiente de la activación de la inervación colinérgica de la red mesopontina, se produce (o debe producirse) una reducción de la actividad GABAérgica en las estructuras clave de la FRP (ver Introducción y p.ej. Vanini et al., 2011). En esta tesis proponemos que, a los efectos de promover la depresión sináptica de los contactos GABAérgicos sobre las neuronas del PnO, la modulación colinérgica de estos contactos sinápticos debe implicar la coactivación de receptores muscarínicos y nicotínicos. En este sentido, es necesario tomar en cuenta el patrón de activación de la terminal GABAérgica que, asumiendo su origen en el LDT-PPT, descarga repetitivamente en trenes más o menos prolongados durante el S-REM (REM on) y durante el S-REM y la vigilia (W-REM on, Boucetta et al., 2014). Si la modulación colinérgica se ejerciera exclusivamente a través de la activación de receptores presinápticos muscarínicos (M2-M4), esta provocaría

depresión de la transmisión GABAérgica con reducción de la amplitud de la primera respuesta del tren pero pudiendo promover la aparición de facilitación por frecuencia (fenómeno plástico de corto plazo de base similar al de la facilitación por pulsos pareados). El efecto colinérgico podría resultar en consecuencia, en un incremento del efecto inhibitor de la terminal GABAérgica sobre la célula PnO. Si el efecto neto fuera nicotínico, aplicando un razonamiento similar, la modulación colinérgica podría resultar en una reducción del efecto inhibitor sobre la célula postsináptica. La consideración del patrón de actividad presináptica ha sido propuesto como un factor ineludible para la adecuada evaluación del efecto de una aferencia moduladora sobre la transmisión sináptica (ver p. ej.: Exley & Cragg, 2008; Threffell & Cragg, 2011). Estos autores sugieren que la modulación colinérgica muscarínica o nicotínica podrían conferirle o exacerbar diferentes propiedades de filtro a la transmisión sináptica sujeta a modulación de acuerdo a la existencia de fenómenos plásticos dependientes de frecuencia (Fortune & Rose, 2001). En tanto la modulación muscarínica podría facilitar la transmisión sináptica durante la activación presináptica repetida sostenida o tónica (en virtud del fenómeno de facilitación por frecuencia), la modulación nicotínica podría ejercer el efecto opuesto facilitando la transmisión exclusivamente en el comienzo de la activación presináptica repetida o fásica (debido a la depresión por frecuencia).

En nuestro caso, y en el contexto de la red mesopontina, la coactivación muscarínico-nicotínica, a través de mecanismos intracelulares independientes y no ocluyentes en la misma terminal como los ilustrados en la Fig. 24, podría dar cuenta de una depresión neta de la transmisión GABAérgica sobre las neuronas del PnO al promover, la reducción de la amplitud de la respuesta postsináptica (efecto muscarínico) acompañada de un fenómeno de depresión por frecuencia (efecto nicotínico).

Finalmente cabe considerar las evidencias que sugieren que la expresión de ambos tipos de receptores muscarínico y nicotínico en el SNC es altamente dinámica pudiendo variar con el desarrollo (ver p.ej. Zhang & Warren, 2001) y, en el corto plazo, por el efecto de otros sistemas de modulación (Maguire, 2014). La actividad reciente del contacto sináptico así como la modificación de su eficacia por la actividad previa de otras aferencias moduladoras podrían condicionar la respuesta a una nueva entrada moduladora (Gil et al., 1997). De existir fenómenos similares a nivel de la red mesopontina, estos podrían explicar la dependencia de los efectos de la estimulación colinérgica del PnO según el estado comportamental en el que se realiza la estimulación (ver p. ej. López-Rodríguez et al, 1994). La expresión del efecto

modulador colinérgico "propio o adecuado" a nivel de la FRP para la generación de episodios de S-REM, podría depender de que este sector de la red mesopontina hubiera estado expuesto previamente a un entorno modulador propio de otro estado comportamental (monoaminas, p. ej.).

Los resultados obtenidos en esta tesis colocan a los contactos sinápticos que integran la red mesopontina implicada en el control del S-REM, en el escenario de los mecanismos neurales que subyacen a este estado comportamental. Existe consenso en que la inervación colinérgica de ciertos sectores de la FRP juega un papel modulador implicado centralmente en la generación y control del S-REM, más como facilitador que como factor determinante (ver Introducción). Los fenómenos de DSPc y FSPc de la transmisión GABAérgica sobre las neuronas del PnO desencadenados por la aplicación local de colinomiméticos que han sido caracterizados en el presente trabajo, podrían representar la expresión de un fenómeno plástico, específico de la modulación colinérgica de esta parte de la red mesopontina y por lo tanto propio del estado comportamental que la aplicación de este modulador a nivel de sectores específicos de la FRP es capaz de inducir in vivo, i.e.: el S-REM (ver sin embargo Grace & Horner, 2015). En virtud de ello, el fenómeno plástico del contacto GABAérgico sobre las neuronas del PnO que se ha descrito y caracterizado en la presente tesis, en tanto sea específicamente desencadenado por ACh y su existencia demostrada in vivo, podría ser considerado un ejemplo de fenómeno plástico dependiente del estado comportamental. La modulación colinérgica de contactos sinápticos GABAérgicos sobre las neuronas del PnO descrita sugiere asimismo la participación de fenómenos de reconfiguración circuital en el control comportamental ejercido por la red neural mesopontina.



## 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

1.- La rodaja mesopontina se constituye en un modelo adecuado para el análisis de los mecanismos celulares y sinápticos en estructuras implicadas en la generación de diversos estados comportamentales. En esta rodaja, las neuronas del PnO, localizadas en el sector de la FRP medial al NMV, reciben inervación colinérgica y no colinérgica (Glutamato-GABA) directa procedente del LDT-PPT.

2.- La entrada GABAérgica de las neuronas del PnO procedente del LDT-PPT presenta modulación por agentes colinérgicos. A diferencia de otras entradas GABAérgicas a las neuronas del PnO carecen de modulación por activación de receptores GABA-B y no muestran modificaciones asociadas a la activación de receptores para endocannabinoides.

3.- La modulación colinérgica de la entrada GABAérgica de las neuronas del PnO procedente del LDT-PPT es reversible y de larga duración (hasta 40 minutos) y se expresa como incrementos (FSPc, de facilitación sináptica persistente, mediada por ACh) o como reducciones (DSPc, de depresión sináptica persistente, mediada por ACh) de la amplitud del IPSC.

4.- El mecanismo de la modulación colinérgica de la entrada GABAérgica es presináptico y resulta de la coactivación de receptores muscarínicos y nicotínicos presentes en la misma terminal. La modulación colinérgica de la entrada GABAérgica a las neuronas del PnO procedentes del LDT-PPT podría representar un fenómeno de plasticidad sináptica dependiente del estado comportamental y sugiere la existencia de fenómenos de reconfiguración circuital a nivel de la red mesopontina, probablemente implicados en la generación de diversos estados comportamentales en la rata.

Del conjunto de resultados obtenidos han surgido nuevas interrogantes que nos permiten establecer posibles caminos complementarios o alternativos a estudiar en un futuro. Asimismo, para avanzar en la consolidación de las conclusiones detalladas más arriba, sería necesario desarrollar abordajes experimentales complementarios.

Un aspecto que, aunque meramente descriptivo, no deja de ser importante para avanzar en la comprensión de los mecanismos de modulación colinérgica de la entrada GABAérgica en estudio consiste en emprender un análisis farmacológico exhaustivo para determinar el tipo de receptor, tanto muscarínico como nicotínico, implicado en la modulación. Este análisis implicaría una aproximación experimental similar a la empleada en este trabajo (inyección yuxtacelular de colinomiméticos y registro intracelular en neuronas del PnO) en presencia de bloqueantes específicos

apara los diferentes subtipos de receptores. Por ejemplo un antagonista M2 como la metoctramina que ha demostrado ser efectiva en esta región (Baghdoyan et al, 1999); o un antagonista nicotínico inespecífico como mecamilamina para permitir el efecto únicamente muscarínicos (Zhang & Warren, 2002). De forma complementaria se pueden emplear antagonistas selectivos para la identificación de las subunidades que conforman el receptor. En este caso se podría emplear el antagonista alfa 7 metilcaconitina; y el antagonista dihidro-beta-Eritroidina para identificar el receptor compuesto por alfa4-beta2. Estos datos permitirá activar selectivamente los receptores pudiendo realizar una interpretación más precisa de los efectos a nivel presináptico. Así como, se demostró la ausencia de modulación del contacto mediada por receptores GABAB a través de un análisis farmacológico específico, a los efectos de descartar la participación de receptores para endocannabinoides en la modulación de la terminal (sugerida por ausencia de DSI) debería analizarse la eventual modificación del IPSC provocado por estimulación del LDT-PPT en presencia de agonistas para receptores CB1.

A los efectos de aportar evidencias sólidas relativas a la coexpresión de receptores muscarínicos y nicotínicos en la misma terminal experimentos electrofisiológicos con estimulación mínima, protocolo de estimulación capaz de activar una única fibra aferente (ver p. ej.: Fernández de Sevilla et al., 2002), podrían ser determinantes. La demostración de modulación del IPSC unitario por aplicación local de nicotina y muscarina (aplicados separadamente) sería concluyente. De forma complementaria este resultado podría ir acompañado de un detallado análisis histológico de la región del PnO y de su inervación por medio de técnicas de inmunomarcaje. La microscopía confocal utilizando anticuerpos fluorescentes específicos para receptores muscarínicos y nicotínicos combinado con marcaje fluorescente para transportadores vesiculares de GABA (ver p.ej. Chaudhry et al., 1998), podría aportar la resolución espacial requerida para demostrar la presencia de receptores muscarínicos y nicotínicos en la misma terminal GABAérgica (coexpresión).

Como se mencionara en la discusión, la evaluación integral del efecto modulador neto de ACh sobre la transmisión sináptica GABAérgica en estudio requiere de la aplicación del análisis desarrollado en la presente tesis pero aplicando trenes de estímulos aferentes (Exley & Cragg, 2008; Threffell & Cragg, 2011) con patrones de activación similares a los observados *in vivo* para neuronas GABAérgicas del LDT-PPT durante diversos estados comportamentales (ver p. ej.: Boucetta et al., 2014).

El avance en la comprensión de los mecanismos de la modulación colinérgica de las entradas sinápticas a las neuronas del PnO permitirá explorar la modulación ejercida por parte de otro tipo de aferencias (p.ej. monoaminas; Stevens et al., 1992; Leonard & Llinás, 1994) igualmente implicadas en el control del ciclo sueño-vigilia. En el modelo *in vitro* utilizado en esta tesis se podrá indagar acerca de la posible relación o interacción entre el mecanismo colinérgico y monoaminérgico (Luppi et al, 2006; Monti 2011) en el control de la eficacia de un mismo contacto sináptico sobre las células del PnO. La aferencia moduladora monoaminérgica podría participar en el control de la expresión del efecto modulador colinérgico sea en su duración y/o sea en la determinación del tipo de receptor colinérgico implicado.

Finalmente con vistas a completar el panorama de la modulación colinérgica sobre la función entrada/salida de las neuronas del PnO, el análisis de la eventual modulación colinérgica de la entrada glutamatérgica que reciben las neuronas del PnO, utilizando una abordaje similar al del presente trabajo, es relevante. Este aspecto, apenas mencionado en este trabajo, podría tener importantes repercusiones en el control del ciclo sueño-vigilia. La relevancia de la transmisión glutamatérgica a nivel de la red mesopontina en el control de diversos estados comportamentales ha sido jerarquizada por el grupo de Luppi (ver p.ej. Luppi et al., 2006; Brown et. al., 2012).

## 7. REFERENCIAS.

- Adams PR, Galvan M (1986) Voltage-dependent currents of vertebrate neurons and their role in membrane excitability. *Adv Neurol* 44:137–170.
- Aghajanian GK, Rasmussen K (1989) Intracellular studies in the facial nucleus illustrating a simple new method for obtaining viable motoneurons in adult rat brain slices. *Synapse* 3:331–338.
- Andersen P, Silfvenius H, Sundberg SH, Sveen O, Wigström H (1978) Functional characteristics of unmyelinated fibres in the hippocampal cortex. *Brain Res* 144:11–18.
- Atwood BK, Lovinger DM, Mathur BN (2014) Presynaptic long-term depression mediated by Gi/o-coupled receptors. *Trends Neurosci* 37:663–673.
- Baghdoyan HA (1997) Location and quantification of muscarinic receptor subtypes in rat pons: implications for REM sleep generation. *Am J Physiol* 273:R896–904.
- Baghdoyan HA, Carlson BX, Roth MT (1994) Pharmacological characterization of muscarinic cholinergic receptors in cat pons and cortex. Preliminary study. *Pharmacology* 48:77–85.
- Baghdoyan HA, Lydic R (1999) M2 muscarinic receptor subtype in the feline medial pontine reticular formation modulates the amount of rapid eye movement sleep. *Sleep* 22:835–847.
- Baghdoyan HA, Lydic R, Callaway CW, Hobson JA (1989) The carbachol-induced enhancement of desynchronized sleep signs is dose dependent and antagonized by centrally administered atropine. *Neuropsychopharmacology* 2:67–79.
- Baghdoyan HA, Rodrigo-Angulo ML, McCarley RW, Hobson JA (1987) A neuroanatomical gradient in the pontine tegmentum for the cholinergic induction of desynchronized sleep signs. *Brain Res* 414:245–261.
- Barclay JW, Morgan A, Burgoyne RD (2005) Calcium-dependent regulation of exocytosis. *Cell Calcium* 38:343–353.
- Batini C, Moruzzi G, Palestini M, Rossi GF, Zanchetti A (1958) Persistent patterns of wakefulness in the pretrigeminal midpontine preparation. *Science* 128:30–32.
- Behrends JC, ten Bruggencate G (1993) Cholinergic modulation of synaptic inhibition in the guinea pig hippocampus in vitro: excitation of GABAergic interneurons and inhibition of GABA-release. *J Neurophysiol* 69:626–629.
- Beitz AJ, Clements JR, Ecklund LJ, Mullett MM (1987) The nuclei of origin of brainstem enkephalin and cholecystinin projections to the spinal trigeminal nucleus of the rat. *Neuroscience* 20:409–425.
- Bekkers JM, Stevens CF (1990) Presynaptic mechanism for long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 346:724–729.
- Ben-Ari Y, Gaiarsa J-L, Tyzio R, Khazipov R (2007) GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev* 87:1215–1284.
- Bertrand SS, Cazalets J-R (2013) Activity-dependent synaptic plasticity and metaplasticity in spinal motor networks. *Curr Pharm Des* 19:4498–4508.
- Boissard R, Fort P, Gervasoni D, Barbagli B, Luppi P-H (2003) Localization of the GABAergic and non-GABAergic neurons projecting to the sublaterodorsal nucleus and potentially gating paradoxical sleep onset. *Eur J Neurosci* 18:1627–1639.
- Boissard R, Gervasoni D, Schmidt MH, Barbagli B, Fort P, Luppi P-H (2002) The rat ponto-medullary network responsible for paradoxical sleep onset and maintenance: a combined microinjection and functional neuroanatomical study. *Eur J Neurosci* 16:1959–1973.
- Bon L, Corazza R, Inchingolo P (1980) Eye movements during the waking-sleep cycle of the encéphale isolé semichronic cat preparation. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 48:327–340.
- Borde M, Curti S, Comas V, Rivero C (2004) [Central modulation of a sensory system by a motor command. One intention with two results]. *Rev Neurol* 38:253–260.
- Boucetta S, Cissé Y, Mainville L, Morales M, Jones BE (2014) Discharge profiles across the sleep-waking cycle of identified cholinergic, GABAergic, and glutamatergic neurons in the pontomesencephalic tegmentum of the rat. *J Neurosci* 34:4708–4727.
- Boucetta S, Jones BE (2009) Activity profiles of cholinergic and intermingled GABAergic and putative glutamatergic neurons in the pontomesencephalic tegmentum of urethane-anesthetized rats. *J Neurosci* 29:4664–4674.
- Bourgin P, Escourrou P, Gaultier C, Adrien J (1995) Induction of rapid eye movement sleep by carbachol infusion into the pontine reticular formation in the rat. *Neuroreport* 6:532–536.
- Bracci E, Beato M, Nistri A (1998) Extracellular K<sup>+</sup> Induces Locomotor-Like Patterns in the Rat Spinal Cord In Vitro: Comparison With NMDA or 5-HT Induced Activity. *Journal of Neurophysiology* 79:2643–2652.
- Branco T, Staras K (2009) The probability of neurotransmitter release: variability and feedback control at single synapses. *Nat Rev Neurosci* 10:373–383.
- Bremer F (1935) Cerveau “isolé” et physiologie du sommeil. *C R Soc Biol (Paris)* 1235–42.
- Briggman KL, Kristan WB (2006) Imaging dedicated and multifunctional neural circuits generating distinct behaviors. *J Neurosci* 26:10925–10933.
- Brown DA (2010) Muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) in the nervous system: some functions and mechanisms. *J Mol Neurosci* 41:340–346.
- Brown RE, Basheer R, McKenna JT, Strecker RE, McCarley RW (2012) Control of sleep and wakefulness. *Physiol Rev* 92:1087–1187.
- Bullock TH (1979) Identifiable and addressed neurons in vertebrates. In: *Neurobiology of the*

- mauthner cell. Edited by Donald S. Faber and Henri Korn, 303 pp, illus, Raven Press, New York, NY, 1978. pp 1–12
- Calabrese RL (1998) Cellular, synaptic, network, and modulatory mechanisms involved in rhythm generation. *Curr Opin Neurobiol* 8:710–717.
- Capece ML, Efange SM, Lydic R (1997) Vesicular acetylcholine transport inhibitor suppresses REM sleep. *Neuroreport* 8:481–484.
- Catterall WA, Few AP (2008) Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron* 59:882–901.
- Chase MH, Morales FR (1990) The atonia and myoclonia of active (REM) sleep. *Annu Rev Psychol* 41:557–584.
- Chaudhry FA, Reimer RJ, Bellocchio EE, Danbolt NC, Osen KK, Edwards RH, Storm-Mathisen J (1998) The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons. *J Neurosci* 18:9733–9750.
- Cherubini E (2012) Phasic GABAA-Mediated Inhibition. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*
- Choi HJ, Lee CJ, Schroeder A, Kim YS, Jung SH, Kim JS, Kim DY, Son EJ, Han HC, Hong SK, Colwell CS, Kim YI (2008) Excitatory actions of GABA in the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci* 28:5450–5459.
- Clément O, Sapin E, Bérod A, Fort P, Luppi P-H (2011) Evidence that neurons of the sublaterodorsal tegmental nucleus triggering paradoxical (REM) sleep are glutamatergic. *Sleep* 34:419–423.
- Clements JR, Grant S (1990) Glutamate-like immunoreactivity in neurons of the laterodorsal tegmental and pedunculopontine nuclei in the rat. *Neurosci Lett* 120:70–73.
- Coleman CG, Lydic R, Baghdoyan HA (2004) Acetylcholine release in the pontine reticular formation of C57BL/6J mouse is modulated by non-M1 muscarinic receptors. *Neuroscience* 126:831–838.
- Coleman CG, Lydic R, Baghdoyan HA (2004) M2 muscarinic receptors in pontine reticular formation of C57BL/6J mouse contribute to rapid eye movement sleep generation. *Neuroscience* 126:821–830.
- Coombs JS, Curtis DR, Eccles JC (1957) The generation of impulses in motoneurons. *J Physiol (Lond)* 139:232–249.
- Dajas-Bailador F, Wonnacott S (2004) Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci* 25:317–324.
- Datta S, Hobson JA (1994) Neuronal activity in the caudolateral peribrachial pons: relationship to PGO waves and rapid eye movements. *J Neurophysiol* 71:95–109.
- Datta S, Maclean RR (2007) Neurobiological mechanisms for the regulation of mammalian sleep-wake behavior: reinterpretation of historical evidence and inclusion of contemporary cellular and molecular evidence. *Neurosci Biobehav Rev* 31:775–824.
- Deurveilher S, Hars B, Hennevin E (1997) Pontine microinjection of carbachol does not reliably enhance paradoxical sleep in rats. *Sleep* 20:593–607.
- Diana MA, Marty A (2003) Characterization of depolarization-induced suppression of inhibition using paired interneuron–Purkinje cell recordings. *J Neurosci* 23:5906–5918.
- Diana MA, Marty A (2004) Endocannabinoid-mediated short-term synaptic plasticity: depolarization-induced suppression of inhibition (DSI) and depolarization-induced suppression of excitation (DSE). *Br J Pharmacol* 142:9–19.
- Dickinson PS (2006) Neuromodulation of central pattern generators in invertebrates and vertebrates. *Curr Opin Neurobiol* 16:604–614.
- DiDomenico R, Eaton RC (1988) Seven principles for command and the neural causation of behavior. *Brain Behav Evol* 31:125–140.
- Dobrunz LE, Stevens CF (1997) Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. *Neuron* 18:995–1008.
- Domínguez S, Fernández de Sevilla D, Buño W (2014) Postsynaptic activity reverses the sign of the acetylcholine-induced long-term plasticity of GABAA inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:E2741–2750.
- Eaton RC, DiDomenico R (1985) Command and the neural causation of behavior: a theoretical analysis of the necessity and sufficiency paradigm. *Brain Behav Evol* 27:132–164.
- Eaton RC, Lee RK, Foreman MB (2001) The Mauthner cell and other identified neurons of the brainstem escape network of fish. *Prog Neurobiol* 63:467–485.
- Exley R, Cragg SJ (2008) Presynaptic nicotinic receptors: a dynamic and diverse cholinergic filter of striatal dopamine neurotransmission. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1:S283–297.
- Eyre MD, Renzi M, Farrant M, Nusser Z (2012) Setting the time course of inhibitory synaptic currents by mixing multiple GABAAR  $\alpha$  subunit isoforms. *J Neurosci* 32:5853–5867.
- Faber DS, Korn H (1991) Applicability of the coefficient of variation method for analyzing synaptic plasticity. *Biophys J* 60:1288–1294.
- Falgairolle M, de Seze M, Juvin L, Morin D, Cazalets J-R (2006) Coordinated network functioning in the spinal cord: an evolutionary perspective. *J Physiol Paris* 100:304–316.
- Faumont S, Combes D, Meyrand P, Simmers J (2005) Reconfiguration of multiple motor networks by short- and long-term actions of an identified modulatory neuron. *Eur J Neurosci* 22:2489–2502.
- Fernández de Sevilla D, Cabezas C, de Prada ANO, Sánchez-Jiménez A, Buño W (2002) Selective muscarinic regulation of functional glutamatergic Schaffer collateral synapses in rat CA1 pyramidal neurons. *J Physiol (Lond)* 545:51–63.

- Fernández de Sevilla D, Núñez A, Borde M, Malinow R, Buño W (2008) Cholinergic-mediated IP3-receptor activation induces long-lasting synaptic enhancement in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 28:1469–1478.
- Ford B, Holmes CJ, Mainville L, Jones BE (1995) GABAergic neurons in the rat pontomesencephalic tegmentum: codistribution with cholinergic and other tegmental neurons projecting to the posterior lateral hypothalamus. *J Comp Neurol* 363:177–196.
- Fortune ES, Rose GJ (2001) Short-term synaptic plasticity as a temporal filter. *Trends Neurosci* 24:381–385.
- Foutz AS, Ternaux JP, Puizillout JJ (1974) [Sleep stages of the “encéphale isolé” preparation: II. Paradoxical stages. Their triggering by afferent baroceptive stimulation]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 37:577–588.
- Foutz AS, Ternaux JP, Puizillout JJ (1975) [Sleep stages in the “encéphale isolé” preparation III. A quantitative and comparative study of wakefulness-sleep cycles in the semi-chronic encéphale isolé preparation]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 38:579–588.
- Fuller PM, Saper CB, Lu J (2007) The pontine REM switch: past and present. *J Physiol (Lond)* 584:735–741.
- Garzón M, De Andrés I, Reinoso-Suárez F (1998) Sleep patterns after carbachol delivery in the ventral oral pontine tegmentum of the cat. *Neuroscience* 83:1137–1144.
- George R, Haslett WL, Jenden DJ (1964) A cholinergic mechanism in the brainstem reticular formation: induction of paradoxical sleep. *Int J Neuropharmacol* 3:541–552.
- Gerber U, Greene RW, McCarley RW (1989) Repetitive firing properties of medial pontine reticular formation neurons of the rat recorded in vitro. *J Physiol (Lond)* 410:533–560.
- Gerber U, Stevens DR, McCarley RW, Greene RW (1991) Muscarinic agonists activate an inwardly rectifying potassium conductance in medial pontine reticular formation neurons of the rat in vitro. *J Neurosci* 11:3861–3867.
- Getting PA (1989) Emerging principles governing the operation of neural networks. *Annu Rev Neurosci* 12:185–204.
- Gillin JC, Salin-Pascual R, Velazquez-Moctezuma J, Shiromani P, Zoltoski R (1993) Cholinergic receptor subtypes and REM sleep in animals and normal controls. *Prog Brain Res* 98:379–387.
- Gil Z, Connors BW, Amitai Y (1997) Differential regulation of neocortical synapses by neuromodulators and activity. *Neuron* 19:679–686.
- Gottesmann C (2002) GABA mechanisms and sleep. *Neuroscience* 111:231–239.
- Grace KP, Horner RL (2015) Evaluating the Evidence Surrounding Pontine Cholinergic Involvement in REM Sleep Generation. *Front Neurol* 6:190.
- Grace KP, Vanstone LE, Horner RL (2014) Endogenous cholinergic input to the pontine REM sleep generator is not required for REM sleep to occur. *J Neurosci* 34:14198–14209.
- Greene RW, Carpenter DO (1985) Actions of neurotransmitters on pontine medial reticular formation neurons of the cat. *J Neurophysiol* 54:520–531.
- Greene RW, Haas HL, Gerber U, McCarley RW (1989) Cholinergic activation of medial pontine reticular formation neurons in vitro. *EXS* 57:123–137.
- Greene RW, Haas HL, McCarley RW (1986) A low threshold calcium spike mediates firing pattern alterations in pontine reticular neurons. *Science* 234:738–740.
- Grilli M, Zappettini S, Raiteri L, Marchi M (2009) Nicotinic and muscarinic cholinergic receptors coexist on GABAergic nerve endings in the mouse striatum and interact in modulating GABA release. *Neuropharmacology* 56:610–614.
- Grillner S, Wallén P (1985) Central pattern generators for locomotion, with special reference to vertebrates. *Annu Rev Neurosci* 8:233–261.
- Guo J-Z, Tredway TL, Chiappinelli VA (1998) Glutamate and GABA Release Are Enhanced by Different Subtypes of Presynaptic Nicotinic Receptors in the Lateral Geniculate Nucleus. *J Neurosci* 18:1963–1969.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85–100.
- Harris-Warrick RM, Marder E (1991) Modulation of neural networks for behavior. *Annu Rev Neurosci* 14:39–57.
- He C, Chen F, Li B, Hu Z (2014) Neurophysiology of HCN channels: from cellular functions to multiple regulations. *Prog Neurobiol* 112:1–23.
- Heifets BD, Castillo PE (2009) Endocannabinoid signaling and long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 71:283–306.
- Heister DS, Hayar A, Garcia-Rill E (2009) Cholinergic modulation of GABAergic and glutamatergic transmission in the dorsal subcoeruleus: mechanisms for REM sleep control. *Sleep* 32:1135–1147.
- Hernandez-Lopez S, Garduño J, Mihailescu S (2013) Nicotinic modulation of serotonergic activity in the dorsal raphe nucleus. *Rev Neurosci* 24:455–469.
- Hernández-Vázquez F, Chavarría K, Garduño J, Hernández-López S, Mihailescu SP (2014) Nicotine increases GABAergic input on rat dorsal raphe serotonergic neurons through alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *Journal of Neurophysiology* 112:3154–3163.
- Hooper SL (2004) Multiple routes to similar network output. *Nat Neurosci* 7:1287–1288.
- Imon H, Ito K, Dauphin L, McCarley RW (1996) Electrical stimulation of the cholinergic laterodorsal tegmental nucleus elicits scopolamine-sensitive excitatory postsynaptic potentials in medial pontine reticular formation neurons. *Neuroscience* 74:393–401.

- Ito K, Yanagihara M, Imon H, Dauphin L, McCarley RW (2002) Intracellular recordings of pontine medial gigantocellular tegmental field neurons in the naturally sleeping cat: behavioral state-related activity and soma size difference in order of recruitment. *Neuroscience* 114:23–37.
- Iwasaki H, Kani K, Maeda T (1999) Neural connections of the pontine reticular formation, which connects reciprocally with the nucleus prepositus hypoglossi in the rat. *Neuroscience* 93:195–208.
- Jonas P (2000) The Time Course of Signaling at Central Glutamatergic Synapses. *News Physiol Sci* 15:83–89.
- Jonas P, Major G, Sakmann B (1993) Quantal components of unitary EPSCs at the mossy fibre synapse on CA3 pyramidal cells of rat hippocampus. *J Physiol (Lond)* 472:615–663.
- Jones BE (1991) Paradoxical sleep and its chemical/structural substrates in the brain. *Neuroscience* 40:637–656.
- Jones BE (1998) The neural basis of consciousness across the sleep-waking cycle. *Adv Neurol* 77:75–94.
- Jones BE (2003) Arousal systems. *Front Biosci* 8:s438–451.
- Jouvet M (1962) [Research on the neural structures and responsible mechanisms in different phases of physiological sleep]. *Arch Ital Biol* 100:125–206.
- Jo Y-H, Role LW (2002) Cholinergic modulation of purinergic and GABAergic co-transmission at in vitro hypothalamic synapses. *J Neurophysiol* 88:2501–2508.
- Kamiya H, Zucker RS (1994) Residual Ca<sup>2+</sup> and short-term synaptic plasticity. *Nature* 371:603–606.
- Kandel ER, Tauc L (1966) Anomalous rectification in the metacerebral giant cells and its consequences for synaptic transmission. *J Physiol (Lond)* 183:287–304.
- Kandel ER, Tauc L (1966) Input organization of two symmetrical giant cells in the snail brain. *J Physiol (Lond)* 183:269–286.
- Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Uchigashima M, Watanabe M (2009) Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev* 89:309–380.
- Karlsson KAE, Gall AJ, Mohns EJ, Seelke AMH, Blumberg MS (2005) The neural substrates of infant sleep in rats. *PLoS Biol* 3:e143.
- Kayama Y, Ogawa T (1987) Electrophysiology of ascending, possibly cholinergic neurons in the rat laterodorsal tegmental nucleus: comparison with monoamine neurons. *Neurosci Lett* 77:277–282.
- Kirschuk S, Jüttner R, Grantyn R (2005) Time-matched pre- and postsynaptic changes of GABAergic synaptic transmission in the developing mouse superior colliculus. *J Physiol* 563:795–807.
- Kita H, Armstrong W (1991) A biotin-containing compound N-(2-aminoethyl)biotinamide for intracellular labeling and neuronal tracing studies: comparison with biocytin. *J Neurosci Methods* 37:141–150.
- Kobayashi M, Hamada T, Kogo M, Yanagawa Y, Obata K, Kang Y (2008) Developmental profile of GABAA-mediated synaptic transmission in pyramidal cells of the somatosensory cortex. *Eur J Neurosci* 28:849–861.
- Kohlmeier KA, Christensen MH, Kristensen MP, Kristiansen U (2013) Pharmacological evidence of functional inhibitory metabotropic glutamate receptors on mouse arousal-related cholinergic laterodorsal tegmental neurons. *Neuropharmacology* 66:99–113.
- Kubin L (2001) Carbachol models of REM sleep: recent developments and new directions. *Arch Ital Biol* 139:147–168.
- Lai YY, Clements JR, Wu XY, Shalita T, Wu JP, Kuo JS, Siegel JM (1999) Brainstem projections to the ventromedial medulla in cat: retrograde transport horseradish peroxidase and immunohistochemical studies. *J Comp Neurol* 408:419–436.
- Lapper SR, Bolam JP (1991) The anterograde and retrograde transport of neurobiotin in the central nervous system of the rat: comparison with biocytin. *J Neurosci Methods* 39:163–174.
- Lawrence JJ (2008) Cholinergic control of GABA release: emerging parallels between neocortex and hippocampus. *Trends Neurosci* 31:317–327.
- Léna C, Changeux JP (1997) Role of Ca<sup>2+</sup> ions in nicotinic facilitation of GABA release in mouse thalamus. *J Neurosci* 17:576–585.
- Leonard CS, Llinás R (1994) Serotonergic and cholinergic inhibition of mesopontine cholinergic neurons controlling rem sleep: An in vitro electrophysiological study. *Neuroscience* 59:309–330.
- Liang C-L, Marks GA (2009) A novel GABAergic afferent input to the pontine reticular formation: the mesopontine GABAergic column. *Brain Res* 1297:32–40.
- Liang C-L, Marks GA (2014) GABAA receptors are located in cholinergic terminals in the nucleus pontis oralis of the rat: implications for REM sleep control. *Brain Res* 1543:58–64.
- Lieske SP, Ramirez J-M (2006) Pattern-specific synaptic mechanisms in a multifunctional network. II. Intrinsic modulation by metabotropic glutamate receptors. *J Neurophysiol* 95:1334–1344.
- Lin J-W, Faber DS (2002) Modulation of synaptic delay during synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 25:449–455.
- Li X, Rainnie DG, McCarley RW, Greene RW (1998) Presynaptic nicotinic receptors facilitate monoaminergic transmission. *J Neurosci* 18:1904–1912.
- López-Rodríguez F, Kohlmeier K, Morales FR, Chase MH (1994) State dependency of the effects of microinjection of cholinergic drugs into the nucleus pontis oralis. *Brain Res* 649:271–281.
- Luebke JI, Greene RW, Semba K, Kamondi A, McCarley RW, Reiner PB (1992) Serotonin hyperpolarizes cholinergic low-threshold burst

- neurons in the rat laterodorsal tegmental nucleus in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:743–747.
- Luebke JI, McCarley RW, Greene RW (1993) Inhibitory action of muscarinic agonists on neurons in the rat laterodorsal tegmental nucleus in vitro. *Journal of Neurophysiology* 70:2128–2135.
- Lu J, Sherman D, Devor M, Saper CB (2006) A putative flip-flop switch for control of REM sleep. *Nature* 441:589–594.
- Lukas RJ, Changeux JP, Le Novère N, Albuquerque EX, Balfour DJ, Berg DK, Bertrand D, Chiappinelli VA, Clarke PB, Collins AC, Dani JA, Grady SR, Kellar KJ, Lindstrom JM, Marks MJ, Quik M, Taylor PW, Wonnacott S (1999) International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* 51:397–401.
- Luppi P-H, Clément O, Fort P (2013) Paradoxical (REM) sleep genesis by the brainstem is under hypothalamic control. *Curr Opin Neurobiol* 23:786–792.
- Luppi P-H, Clément O, Sapin E, Peyron C, Gervasoni D, Léger L, Fort P (2012) Brainstem mechanisms of paradoxical (REM) sleep generation. *Pflügers Arch* 463:43–52.
- Luppi P-H, Gervasoni D, Verret L, Goutagny R, Peyron C, Salvert D, Leger L, Fort P (2006) Paradoxical (REM) sleep genesis: the switch from an aminergic-cholinergic to a GABAergic-glutamatergic hypothesis. *J Physiol Paris* 100:271–283.
- Lydic R (1989) Central pattern-generating neurons and the search for general principles. *FASEB J* 3:2457–2468.
- MacDermott AB, Role LW, Siegelbaum SA (1999) Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release. *Annu Rev Neurosci* 22:443–485.
- Madison DV, Lancaster B, Nicoll RA (1987) Voltage clamp analysis of cholinergic action in the hippocampus. *J Neurosci* 7:733–741.
- Maguire J (2014) Stress-induced plasticity of GABAergic inhibition. *Front Cell Neurosci* 8:157.
- Mallick BN, Kaur S, Saxena RN (2001) Interactions between cholinergic and GABAergic neurotransmitters in and around the locus coeruleus for the induction and maintenance of rapid eye movement sleep in rats. *Neuroscience* 104:467–485.
- Maloney KJ, Mainville L, Jones BE (2000) c-Fos expression in GABAergic, serotonergic, and other neurons of the pontomedullary reticular formation and raphe after paradoxical sleep deprivation and recovery. *J Neurosci* 20:4669–4679.
- Marchiafava PL, Rizzolatti G, Sprague JM (1968) Studies on corticotectal activity in the unanesthetized mid-pontine cat. Effects of cortical cooling and ablation. *Arch Ital Biol* 106:21–40.
- Marder E (1988) Modulating a neuronal network. *Nature* 335:296–297.
- Marder E (1991) Modifiability of pattern generation. *Curr Opin Neurobiol* 1:571–576.
- Marks GA, Birabil CG (1998) Enhancement of rapid eye movement sleep in the rat by cholinergic and adenosinergic agonists infused into the pontine reticular formation. *Neuroscience* 86:29–37.
- Marks GA, Sachs OW, Birabil CG (2008) Blockade of GABA<sub>A</sub> receptors in the rat pontine reticular formation induces rapid eye movement sleep that is dependent upon the cholinergic system. *Neuroscience* 156:1–10.
- McBain CJ, Kauer JA (2009) Presynaptic plasticity: targeted control of inhibitory networks. *Curr Opin Neurobiol* 19:254–262.
- McCarley RW (2004) Mechanisms and models of REM sleep control. *Arch Ital Biol* 142:429–467.
- McCarley RW (2007) Neurobiology of REM and NREM sleep. *Sleep Med* 8:302–330.
- McCarley RW, Hobson JA (1975) Discharge patterns of cat pontine brain stem neurons during desynchronized sleep. *J Neurophysiol* 38:751–766.
- McCormick DA, Pape HC (1990) Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. *J Physiol (Lond)* 431:291–318.
- McKenna JT, Chen L, McCarley RW (2011) Neuronal models of REM-sleep control: evolving concepts. *Rapid Eye Movement Sleep*
- Mellen NM, Thoby-Brisson M (2012) Respiratory circuits: development, function and models. *Curr Opin Neurobiol* 22:676–685.
- Mobbs P, Becker D, Williamson R, Bate M, Warner A (1994) Techniques for dye injection and cell labelling. In: *Microelectrode techniques. The Plymouth workshop handbook*. Cambridge, UK: The Company of Biologists Ltd. Citeseer, pp 361–387
- Mody I, Pearce RA (2004) Diversity of inhibitory neurotransmission through GABA(A) receptors. *Trends Neurosci* 27:569–575.
- Monti JM (2011) Serotonin control of sleep-wake behavior. *Sleep Medicine Reviews* 15:269–281.
- Müller W, Misgeld U, Heinemann U (1988) Carbachol effects on hippocampal neurons in vitro: dependence on the rate of rise of carbachol tissue concentration. *Exp Brain Res* 72:287–298.
- Netick A, Orem J, Dement W (1977) Neuronal activity specific to REM sleep and its relationship to breathing. *Brain Res* 120:197–207.
- Núñez A, Buño W, Reinoso-Suárez F (1998) Neurotransmitter actions on oral pontine tegmental neurons of the rat: an in vitro study. *Brain Res* 804:144–148.
- Núñez A, De la Roza C, Rodrigo-Angulo ML, Buño W, Reinoso-Suárez F (1997) Electrophysiological properties and cholinergic responses of rat ventral oral pontine reticular neurons in vitro. *Brain Res* 754:1–11.
- Núñez A, Rodrigo-Angulo ML, De Andrés I, Reinoso-Suárez F (2002) Firing activity and postsynaptic properties of morphologically identified neurons of ventral oral pontine reticular nucleus. *Neuroscience* 115:1165–1175.
- Orio P, Madrid R, de la Peña E, Parra A, Meseguer V, Bayliss DA, Belmonte C, Viana F (2009)



- Characteristics and physiological role of hyperpolarization activated currents in mouse cold thermoreceptors. *J Physiol (Lond)* 587:1961–1976.
- Paxinos G, Watson C (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Fourth Edition, 4 edition. Academic Press, San Diego
- Piccioito MR, Higley MJ, Mineur YS (2012) Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron* 76:116–129.
- Ramirez J-M, Tryba AK, Peña F (2004) Pacemaker neurons and neuronal networks: an integrative view. *Curr Opin Neurobiol* 14:665–674.
- Reinoso Suárez F (2007) [Modulation by the GABA of the ventro-oral-pontine reticular REM sleep-inducing neurons]. *An R Acad Nac Med (Madr)* 124:397–411; discussion 411–413.
- Reinoso Suárez F (2010) [REM sleep modulation by non-GABAergic neurons of the hypothalamus and basal forebrain]. *An R Acad Nac Med (Madr)* 127:309–324; discussion 324–326.
- Reinoso-Suárez F, de Andrés I, Rodrigo-Angulo ML, Garzón M (2001) Brain structures and mechanisms involved in the generation of REM sleep. *Sleep Med Rev* 5:63–77.
- Rose HJ, Metherate R (2005) Auditory thalamocortical transmission is reliable and temporally precise. *J Neurophysiol* 94:2019–2030.
- de Rover M, Lodder JC, Kits KS, Schoffelmeer ANM, Brussaard AB (2002) Cholinergic modulation of nucleus accumbens medium spiny neurons. *Eur J Neurosci* 16:2279–2290.
- de la Roza C, Reinoso-Suárez F (2006) GABAergic structures in the ventral part of the oral pontine reticular nucleus: An ultrastructural immunogold analysis. *Neuroscience* 142:1183–1193.
- Sakai K (1988) Executive mechanisms of paradoxical sleep. *Arch Ital Biol* 126:239–257.
- Sakai K, Crochet S, Onoe H (2001) Pontine structures and mechanisms involved in the generation of paradoxical (REM) sleep. *Arch Ital Biol* 139:93–107.
- Sakai K, Koyama Y (1996) Are there cholinergic and non-cholinergic paradoxical sleep-on neurones in the pons? *Neuroreport* 7:2449–2453.
- Sakai K, Sastre J, Kanamori N, Jouvet M (1981) State-specific neurons in the ponto-medullary reticular formation with special reference to the postural atonia during paradoxical sleep in the cat. In: *Brain mechanisms and perceptual awareness*. New York: Raven Press, pp 405–429
- Sanchez R, Leonard CS (1996) NMDA-receptor-mediated synaptic currents in guinea pig laterodorsal tegmental neurons in vitro. *J Neurophysiol* 76:1101–1111.
- Sanford LD, Tang X, Xiao J, Ross RJ, Morrison AR (2003) GABAergic regulation of REM sleep in reticularis pontis oralis and caudalis in rats. *J Neurophysiol* 90:938–945.
- Sastre JP, Sakai K, Jouvet M (1981) Are the gigantocellular tegmental field neurons responsible for paradoxical sleep? *Brain Res* 229:147–161.
- Schulz PE, Cook EP, Johnston D (1994) Changes in paired-pulse facilitation suggest presynaptic involvement in long-term potentiation. *J Neurosci* 14:5325–5337.
- Semba K (1993) Aminergic and cholinergic afferents to REM sleep induction regions of the pontine reticular formation in the rat. *J Comp Neurol* 330:543–556.
- Semba K, Fibiger HC (1992) Afferent connections of the laterodorsal and the pedunculopontine tegmental nuclei in the rat: a retro- and anterograde transport and immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 323:387–410.
- Semba K, Reiner PB, Fibiger HC (1990) Single cholinergic mesopontine tegmental neurons project to both the pontine reticular formation and the thalamus in the rat. *Neuroscience* 38:643–654.
- Sherman SM (2001) Tonic and burst firing: dual modes of thalamocortical relay. *Trends in Neurosciences* 24:122–126.
- Shiromani PJ, Armstrong DM, Bruce G, Hersh LB, Groves PM, Gillin JC (1987) Relation of pontine choline acetyltransferase immunoreactive neurons with cells which increase discharge during REM sleep. *Brain Res Bull* 18:447–455.
- Shiromani PJ, Kilduff TS, Bloom FE, McCarley RW (1992) Cholinergically induced REM sleep triggers Fos-like immunoreactivity in dorsolateral pontine regions associated with REM sleep. *Brain Res* 580:351–357.
- Shiromani PJ, McGinty DJ (1986) Pontine neuronal response to local cholinergic infusion: relation to REM sleep. *Brain Res* 386:20–31.
- Shouse MN, Siegel JM (1992) Pontine regulation of REM sleep components in cats: integrity of the pedunculopontine tegmentum (PPT) is important for phasic events but unnecessary for atonia during REM sleep. *Brain Res* 571:50–63.
- Siegel JM (2000) Brainstem mechanisms generating REM sleep. In: *Principles and Practice of Sleep Medicine*, third. Philadelphia, W.B. Saunders, pp 112–133
- Siegel JM, Tomaszewski KS, Nienhuis R (1986) Behavioral states in the chronic medullary and midpontine cat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 63:274–288.
- Siegel JM, Wheeler RL, McGinty DJ (1979) Activity of medullary reticular formation neurons in the unrestrained cat during waking and sleep. *Brain Res* 179:49–60.
- Sparks, Harris-Warrick (1997) Motor systems. *Curr Opin Neurobiol* 7:777–780.
- Steriade M, Datta S, Paré D, Oakson G, Curró Dossi RC (1990) Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems. *J Neurosci* 10:2541–2559.
- Stevens DR, Birnstiel S, Gerber U, McCarley RW, Greene RW (1993) Nicotinic depolarizations of rat medial pontine reticular formation neurons studied in vitro. *Neuroscience* 57:419–424.
- Stevens DR, McCarley RW, Greene RW (1992) Serotonin1 and serotonin2 receptors

- hyperpolarize and depolarize separate populations of medial pontine reticular formation neurons in vitro. *Neuroscience* 47:545–553.
- Stone T (1985) Microiontophoresis and Pressure Ejection. IBRO Handbook Series: Methods in the Neurosciences, Vol. 8. J. Wiley
- Thakkar MM, Strecker RE, McCarley RW (1998) Behavioral state control through differential serotonergic inhibition in the mesopontine cholinergic nuclei: a simultaneous unit recording and microdialysis study. *J Neurosci* 18:5490–5497.
- Thakkar M, Portas C, McCarley RW (1996) Chronic low-amplitude electrical stimulation of the laterodorsal tegmental nucleus of freely moving cats increases REM sleep. *Brain Res* 723:223–227.
- Thomson AM (2000) Molecular frequency filters at central synapses. *Progress in Neurobiology* 62:159–196.
- Torterolo P, Vanini G (2010) [New concepts in relation to generating and maintaining arousal]. *Rev Neurol* 50:747–758.
- Torterolo P, Yamuy J, Sampogna S, Morales FR, Chase MH (2001) GABAergic neurons of the laterodorsal and pedunculopontine tegmental nuclei of the cat express c-fos during carbachol-induced active sleep. *Brain Res* 892:309–319.
- Ulrich D, Bettler B (2007) GABA(B) receptors: synaptic functions and mechanisms of diversity. *Curr Opin Neurobiol* 17:298–303.
- Van Dort CJ, Zachs DP, Kenny JD, Zheng S, Goldblum RR, Gelwan NA, Ramos DM, Nolan MA, Wang K, Weng F-J, Lin Y, Wilson MA, Brown EN (2015) Optogenetic activation of cholinergic neurons in the PPT or LDT induces REM sleep. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:584–589.
- Vanini G, Wathen BL, Lydic R, Baghdoyan HA (2011) Endogenous GABA levels in the pontine reticular formation are greater during wakefulness than during rapid eye movement sleep. *J Neurosci* 31:2649–2656.
- Vanni-Mercier G, Sakai K, Lin JS, Jouvet M (1989) Mapping of cholinceptive brainstem structures responsible for the generation of paradoxical sleep in the cat. *Arch Ital Biol* 127:133–164.
- Vidal C, Changeux JP (1993) Nicotinic and muscarinic modulations of excitatory synaptic transmission in the rat prefrontal cortex in vitro. *Neuroscience* 56:23–32.
- Wang H-L, Morales M (2009) Pedunculopontine and laterodorsal tegmental nuclei contain distinct populations of cholinergic, glutamatergic and GABAergic neurons in the rat. *European Journal of Neuroscience* 29:340–358
- Watson CJ, Lydic R, Baghdoyan HA (2011) Sleep Duration Varies as a Function of Glutamate and GABA in Rat Pontine Reticular Formation. *J Neurochem* 118:571–580.
- Webster HH, Jones BE (1988) Neurotoxic lesions of the dorsolateral pontomesencephalic tegmentum-cholinergic cell area in the cat. II. Effects upon sleep-waking states. *Brain Res* 458:285–302.
- Weng FJ, Williams RH, Hawryluk JM, Lu J, Scammell TE, Saper CB, Arrigoni E (2014) Carbachol excites sublaterodorsal nucleus neurons projecting to the spinal cord. *J Physiol (Lond)* 592:1601–1617.
- Wonnacott S (1997) Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci* 20:92–98.
- Xi M-C, Morales FR, Chase MH (2004) Interactions between GABAergic and cholinergic processes in the nucleus pontis oralis: neuronal mechanisms controlling active (rapid eye movement) sleep and wakefulness. *J Neurosci* 24:10670–10678.
- Yamuy J, Mancillas JR, Morales FR, Chase MH (1993) C-fos expression in the pons and medulla of the cat during carbachol-induced active sleep. *J Neurosci* 13:2703–2718.
- Zhang L, Warren RA (2002) Muscarinic and nicotinic presynaptic modulation of EPSCs in the nucleus accumbens during postnatal development. *J Neurophysiol* 88:3315–3330.
- Zhang SJ, Huguenard JR, Prince DA (1997) GABAA Receptor-Mediated Cl<sup>-</sup> Currents in Rat Thalamic Reticular and Relay Neurons. *Journal of Neurophysiology* 78:2280–2286.
- Zhong C, López-Hernández GY, Talmage DA, Role LW (2014) Presynaptic Nicotinic Acetylcholine Receptors and the Modulation of Circuit Excitability. In: Lester RAJ (ed) *Nicotinic Receptors*. Springer New York, pp 137–167
- Zhou F-M, Wilson C, Dani JA (2003) Muscarinic and nicotinic cholinergic mechanisms in the mesostriatal dopamine systems. *Neuroscientist* 9:23–36.
- Zhou Y-H, Sun L-H, Liu Z-H, Bu G, Pang X-P, Sun S-C, Qiao G-F, Li B-Y, Schild JH (2010) Functional impact of the hyperpolarization-activated current on the excitability of myelinated A-type vagal afferent neurons in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 37:852–861.